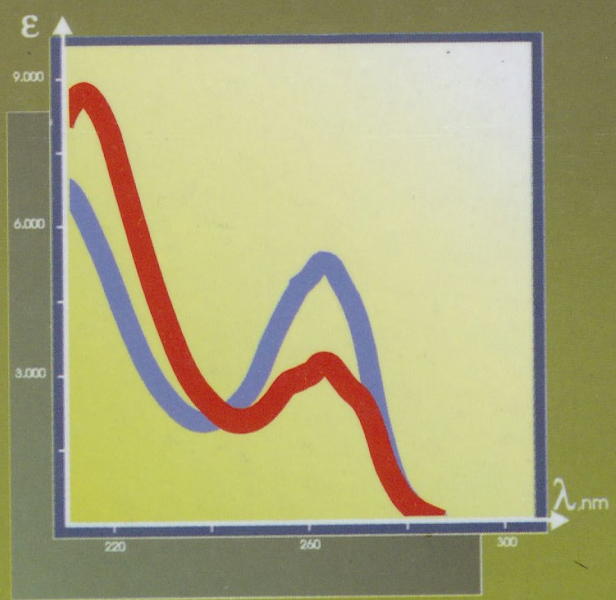
Görög Sándor

SPEKTROFOTOMETRIÁS GYÓGYSZERANALÍZIS



AKADÉMIAI KIADÓ · BUDAPEST

Spektrofotometriás gyógyszeranalízis

A könyv szponzorai

A Magyar Gyógyszergyártók Országos Szövetségének szervezésében a következő gyógyszeripari vállalatok nyújtottak szponzori támogatást a könyv megjelentetéséhez:

Alkaloida Vegyészeti Gyár Rt.
Biogal Gyógyszergyár Rt.
Chinoin Gyógyszer és Vegyészeti Termékek Gyára Rt.
EGIS Gyógyszergyár Rt.
Phylaxia-Sanofi Rt.
Reanal Finomvegyszergyár
Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Rt.

További szponzorok:

Gyógynövény Kutató Intézet Rt.
Magyar Gyógyszerész Kamara

2817

Spektrofotometriás gyógyszeranalízis

Az ultraibolya-látható spektrofotometria gyógyszer-analitikai alkalmazásai

Görög Sándor

az MTA levelező tagja

(Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Rt., Budapest)

MTAK 0 00002 79635 2

1828

Akadémiai Kiadó · Budapest

696646

Közreműködők

Géherné Glücklich Judit (4.4. fejezet)
(Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Rt.)

Kovácsné Hadady Katalin (10.3. fejezet, 10.14. fejezet)
(Biogal Gyógyszergyár Rt.)

Milch György (10.4. fejezet, 10.7. fejezet, 10.8. fejezet)
(Chinoin Gyógyszer és Vegyészeti Termékek Gyára Rt.)

MAGYAR
TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
KÖNYVTÁRA

ISBN 963 05 6509 9

Kiadja az Akadémiai Kiadó
Budapest 1117, Prielle Kornélia u. 19—35.

Első magyar nyelvű kiadás: 1993

Copyright © Görög Sándor, 1993

Minden jog fenntartva, beleértve a sokszorosítás, a nyilvános előadás, a rádió- és televízióadás, valamint a fordítás jogát, az egyes fejezeteket illetően is.

Printed in Hungary

M. TUD. AKADÉMIA KÖNYVTÁRA
Könyvleltár 1254.../19 ...94... sz.

Előszó

„Habent sua fata libelli." Ennek a könyvnek sorsa akkor kezdődött, amikor megtisztelő felkérést kaptam a Szász György által szerkesztett „Gyógyszerészi Kémia" tankönyvben (Medicina, Budapest 1983) az „Ultraibolya és látható spektrofotometria" c. fejezet megírására. Ennek során jelentősen túlléptem a számomra biztosított ívkeretet, s így a megírt anyag egy része kárbaveszni látszott. Ekkor született meg bennem az elhatározás, hogy ebből az anyagból kiindulva könyvet írok a spektrofotometriás gyógyszeranalízisről. Elhatározásomat motiválta az a felismerés, hogy ilyen témájú és a kor követelményeinek megfelelő tárgyalásmódú könyv nemcsak a hazai, hanem a nemzetközi szakirodalomban is hiányzik, sőt a hazai szakirodalomban a spektrofotometriás analízis általános vonatkozásait tárgyaló könyvek is hiányoznak, illetve néhány (kitűnő) egyetemi jegyzetre korlátozódnak.

A könyv hosszú időre elnyúló megírása során csak megerősödött az a meggyőződésem, hogy ez a sokak szerint már elavult, fejlődésre képtelen technika nemcsak a mai napig is alapvetően fontos módszere a gyógyszer-analitikának, hanem elsősorban a HPLC technikával és automatikus elemzőkkel való összekapcsolása révén, valamint a komputerizálás eredményeképpen lehetőségei jelentősen kitágultak, ill. napjainkban is tágulnak. Ez egyrészről azzal járt, hogy az anyag végleges formába való rendezése során azt igen nagyszámú új irodalmi adattal ki kellett bővíteni, másrészről a spektrofotometria egyes területein bekövetkezett gyors fejlődés és szemléletváltozás következtében az anyagot új fejezetek beiktatásával, ill. már megírt fejezetek teljes újraírásával korszerűsíteni kellett.

Őszintén remélem, hogy könyvem hasznos segítséget fog nyújtani azoknak az analitikusoknak, akik az ultraibolya-látható spektrofotometriás módszert, annak régi és új lehetőségeit alkalmazzák a hatósági és ipari gyógyszerellenőrzésben, a gyógyszerkutatásban és gyógyszerek biológiai mintákban való meghatározásában. Azt is remélem, hogy a könyv hasznos alapvető ismereteket nyújt azok számára is, akik a spektrofotometriát más területekről származó analitikai problémák megoldására kívánják felhasználni.

Végezetül őszinte köszönetemet fejezem ki mindazoknak, akik hozzásegítettek a könyv megírásához, ill. megjelentetéséhez. Ez utóbbihoz fontos anyagi támogatást nyújtott a Magyar Tudományos Akadémia Kémiai Tudományok Osztálya, valamint számos szponzor, akiknek listáját külön közöljük. Köszönet illeti meg azokat a kollégáimat is, akik néhány alfejezet megírásában nyújtottak fontos segítséget (névso-

rukat ugyancsak külön közöljük). A könyv lektorai, Burger Kálmán akadémikus és Láng László, a kémiai tudomány doktora számos igen hasznos tanáccsal járultak hozzá a könyv végső formájának kialakításához. A könyvben leírt saját kísérleti munka elvégzése, a nagyszámú spektrum gondos felvétele Rényei Márta tudományos főmunkatárs, valamint Balogh Gáborné és Farkas Jánosné vegyésztechnikusok kitűnő munkáját dicséri. Köszönettel tartozom dr. Gazdag Máriának és dr. Horváth Péternek a hasznos konzultációkért, Doktor Nándornénak és Virágné Elsässer Erzsébetnek a kézirat elkészítésében nyújtott segítségükért, végül pedig, de nem utolsósorban Nagy Tibornak (Akadémiai Kiadó) a gondos szerkesztői munkáért.

Budapest, 1993. január *Görög Sándor*

Tartalomjegyzék

1.	**Bevezetés**	13
1.1.	Történeti áttekintés	13
1.2.	A spektrofotometria helye a korszerű gyógyszeranalízisben	15
1.3.	A spektrofotometriás gyógyszeranalízis irodalma	17
1.4.	Könyvünk célkitűzései	17
	Irodalom	18
2.	**Fényabszorpció (és reflexió) mérésével összefüggő kérdések**	20
2.1.	Alapfogalmak	20
2.2.	A fényelnyelés mechanizmusa az ultraibolya és látható tartományban	21
2.3.	Az abszorbancia és a Lambert—Beer-törvény	24
2.4.	A spektrofotométer főbb részei	27
2.4.1.	Fényforrások	27
2.4.2.	Monokromátorok	28
2.4.3.	A küvettatartó a küvettákkal	33
2.4.4.	Detektorok	34
2.4.5.	Kijelzők	35
2.5.	Egysugármenetes spektrofotométerek	35
2.6.	Kétsugármenetes spektrofotométerek	37
2.7.	A fényabszorpció mérése	40
2.8.	A fényabszorpció mérésének hibaforrásai	41
2.9.	A résszélesség hatása az abszorbanciára	43
2.10.	A szórt fény hatása az abszorbanciára	47
2.11.	Spektrumok felvétele	51
2.11.1.	Spektrumok felvételének jelentősége	51
2.11.2.	A spektrumok felvételének technikája	52
2.11.3.	A spektrumok megadásának módjai	53
2.11.4.	A spektrumot befolyásoló tényezők	54
2.12.	A spektrofotométerek kalibrálása	57
2.12.1.	A hullámhossz-skála kalibrálása	57
2.12.2.	Az abszorbanciaskála kalibrálása	58
2.13.	A fényreflexió mérése	58
	Irodalom	62

3. Kvalitatív analízis. Összefüggés gyógyszervegyületek szerkezete és spektruma között 63

3.1. A szerkezet—spektrum összefüggés tanulmányozásának jelentősége. Spektrumgyűjtemények 63

3.2. Az abszorpciós sávok jellemzése 64

3.2.1. A sávok eredete és helyzete 65

3.2.2. A sávok intenzitása 65

3.2.3. A sávok alakja. Oldószerhatás 66

3.3. Telített vegyületek. Auxokrómok 69

3.4. Kromofor csoportok 70

3.5. Konjugált kettős kötéseket tartalmazó rendszerek 73

3.6. Aromás vegyületek 80

3.7. Szubsztituálatlan és auxokróm csoporttal szubsztituált fenilgyűrűt tartalmazó származékok 82

3.8. Kromofor csoporttal konjugált benzolszármazékok 89

3.9. Diszubsztituált benzolszármazékok 92

3.10. Többszörösen szubsztituált benzolszármazékok 94

3.11. Öttagú heterociklusok 95

3.12. Hattagú heterociklusok 98

3.13. Kondenzált heterociklusok 103

3.13.1. Kinolin- és izokinolinszármazékok 104

3.13.2. Indolszármazékok 105

3.13.3. Benzazepinek és diazepinek 108

3.13.4. Purin- és pterinvázas vegyületek 109

3.13.5. Fenotiazinszármazékok 110

3.13.6. Egyéb származékok 110

3.14. Színezékek 112

3.15. Fémkomplexek 112

3.16. Szterikus gátlások 113

3.17. A pH hatása a spektrumokra 115

3.17.1. Általános irányelvek 115

3.17.2. Savjellegű vegyületek spektrumának pH-függése 117

3.17.3 Bázisjellegű anyagok spektrumának pH-függése 119

3.17.4 Sav-bázis disszociációs állandó meghatározása 122

Irodalom 124

4. Kvantitatív analízis saját fényelnyelés alapján 126

4.1. Egykomponensű rendszerek analízise 126

4.1.1. Meghatározás a Lambert—Beer-törvény alapján 126

4.1.2. Szelektivitási problémák 128

4.2. Eltérések a Lambert—Beer-törvénytől 130

4.3. Háttérkorrekciós módszerek 132

4.3.1. A spektrumháttér és korrekciójának jelentősége 132

4.3.2. Az alapvonal módszer és más egyszerű algebrai-geometriai módszerek 133

4.3.3. Az ortogonális polinomok módszere 136

4.3.4. A kompenzációs módszer 138

4.4. Többkomponensű rendszerek spektrofotometriás elemzése 140

4.4.1. Meghatározások egyenletrendszerek segítségével 140

4.4.2. Többkomponensű rendszerek analízise lineáris kombinációval 145

4.4.3. Egyéb számítógépes módszerek 152
4.5. Derivatív spektrofotometria 153
4.5.1. A módszer elvi alapjai 153
4.5.2. A módszer alkalmazási területei 153
4.5.3. Differencia-derivatív spektrofotometria 165
4.5.4. Gyakorlati alkalmazások 170
4.6. Egyéb módszerek 171
4.6.1. A ráció módszer kétkomponensű rendszerek vizsgálatára 171
4.6.2. Kéthullámhosszas spektrofotometria 174
4.6.3. Precíziós spektrofotometria 175
Irodalom 175

5. Spektrofotometriás módszerek összekapcsolása kromatográfiás technikákkal 179
5.1. Spektrofotometriás és kromatográfiás módszerek összekapcsolásának jelentősége 179
5.2. Spektrofotometriás mérés oszlopkromatográfiás elválasztás után 180
5.3. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia 182
5.3.1. Általános kérdések. Kvantitatív analízis 182
5.3.2. Az elválasztott komponensek szerkezetének felderítése 187
5.3.3. Csúcs homogenitási (csúcs tisztasági) vizsgálatok 192
5.3.4. Származékképzési reakciók 196
5.4. Spektrofotometriás mérés vékonyréteg-kromatogramról való elúció után 196
5.5. Vékonyréteg-denzitometria 199
Irodalom 202

6. Kémiai reakciókra alapozott módszerek 204
6.1. Kémiai reakciók alkalmazását szükségessé tevő tényezők a spektrofotometriás gyógyszeranalízisben 204
6.2. A reakció kiválasztásának szempontjai 205
6.3. A módszer optimalizálásának szempontjai 207
6.3.1. Az oldószer, az oldatösszetétel és a hígítás 208
6.3.2. Reagenskoncentráció 208
6.3.3. Az oldat pH-ja 209
6.3.4. A hőmérséklet 210
6.3.5. A reakcióidő. A termék stabilitása 210
6.3.6. A reakció kvantitatív lejátszódása 211
6.3.7. Összehasonlító oldatok 211
6.3.8. A Beer-törvény érvényessége 211
6.3.9. Standardok alkalmazása 212
6.3.10. Hibaanalízis 213
6.4. Egy gyakorlati példa: a reakció kiválasztása és optimalizálása prednizolon-21-mezilát meghatározására; a módszer alkalmazása mazipredonban szennyezésként való meghatározására 214
6.4.1. Az analitikai feladat 214
6.4.2. A reakció kiválasztásának szempontjai 215
6.4.3. A módszer optimális körülményeinek meghatározása 216
6.4.4. Prednizolon-21-mezilát meghatározása 220
6.4.5. Prednizolon-21-mezilát szennyezés meghatározása mazipredonban 221
6.5. A spektrofotometriás mérések és módszerek validálása 222

6.5.1. Bevezetés 222
6.5.2. Az abszorbancia meghatározásának validálása 223
6.5.3. A spektrofotometriás módszerek validálása 223
6.5.4. A kémiai reakciókra alapozott spektrofotometriás módszerek validálásának külön szempontjai 226
Irodalom 227

7. Származékképzési reakciók kémiai és spektroszkópiai jellemzése 228
7.1. Bevezetés 228
7.2. Reverzíbilis sav-bázis reakciók 228
7.3. Acilezési reakciók 229
7.4. Kondenzáció 231
7.5. Redoxireakciók 234
7.6. Sav katalizálta átrendeződési, eliminációs és hasítási reakciók 238
7.7. Fémkomplexek képződése 242
7.8. Ionpárképzés 245
7.9. Töltésátviteli komplexek képződése 249
7.10. Kinetikus módszerek 251
7.11. Enzimes reakciók 254
Irodalom 257

8. Differencia-spektrofotometria 262
8.1. Általános kérdések 262
8.2. Sav-bázis egyensúlyokra alapozott módszerek 265
8.3. Sav, ill. bázis katalizálta irreverzíbilis reakciókra alapozott módszerek 271
8.4. Redoxireakciókra alapozott módszerek 273
8.5. Egyéb reakciókra alapozott módszerek 278
Irodalom 283

9. Gyógyszerek spektrofotometriás meghatározása különféle mátrixokban 285
9.1. Bevezetés 285
9.2. Gyógyszer-alapanyagok 285
9.2.1. A hatóanyag-tartalom meghatározása 285
9.2.2. Szennyezések meghatározása 288
9.3. Tabletták és kapszulák 288
9.3.1. A hatóanyag-tartalom meghatározása 289
9.3.2. „Content uniformity" vizsgálatok 291
9.3.3. Kioldódási vizsgálatok 291
9.3.4. Kioldódási sebesség meghatározása 291
9.4. Kúpok 293
9.5. Injekciók, szolúciók és egyéb folyékony gyógyszerformák 294
9.6. Kenőcsök és krémek 295
9.7. Stabilitási vizsgálatok 297
9.8. Gyógyszerek, ill. metabolitjaik meghatározása biológiai mintákban 300
9.9. Gyógyszerek meghatározása drogextraktumokban 304
9.10. A spektrofotometriás mérések automatizálása 306
Irodalom 312

10. Néhány fontosabb gyógyszercsalád spektrofotometriás analízise 317
10.1. Bevezetés 317
10.2. Fenil-alkil-aminok és oxi-fenil-alkil-aminok 319
10.2.1. Meghatározás saját fényelnyelés alapján 319
10.2.2. Kémiai reakciókra alapozott módszerek 323
Irodalom 327
10.3. Szalicilsav és származékai 330
10.3.1. Meghatározás saját fényelnyelés alapján 330
10.3.2. Kémiai reakciókra alapozott módszerek 331
Irodalom 333
10.4. Szulfonamidok 334
10.4.1. Meghatározás saját fényelnyelés alapján 334
10.4.2. Kémiai reakciókra alapozott módszerek 336
Irodalom 338
10.5. Egyéb fenol- és anilinszármazékok 340
10.5.1. Bevezetés 340
10.5.2. Paracetamol (acetaminofen) és fenacetin 340
10.5.3. Anilin alapú helyi érzéstelenítők és rokon vegyületek 343
10.5.4. További anilinszármazékok 344
10.5.5. β-Receptor blokkolók 346
10.5.6. Néhány további fenolszármazék 347
Irodalom 349
10.6. Alkaloidok és rokon vegyületek 352
10.6.1. Meghatározás saját fényelnyelés alapján 352
10.6.2. Kémiai reakciókra alapozott módszerek 358
Irodalom 363
10.7. Barbiturátok, tiobarbiturátok és hidantoinok 366
10.7.1. Meghatározás saját fényelnyelés alapján 366
10.7.2. Kémiai reakciókra alapozott módszerek 369
Irodalom 369
10.8. Pirazolszármazékok 370
10.8.1. Meghatározás saját fényelnyelés alapján 370
10.8.2. Kémiai reakciókra alapozott módszerek 373
Irodalom 375
10.9. Benzdiazepinek 377
10.9.1. Meghatározás saját fényelnyelés alapján 377
10.9.2. Kémiai reakciókra alapozott módszerek 380
Irodalom 382
10.10. Fenotiazin-származékok 383
10.10.1. Meghatározás saját fényelnyelés alapján 383
10.10.2. Kémiai reakciókra alapozott módszerek 386
Irodalom 389
10.11. Egyéb heterociklusos származékok 390
10.11.1. Furánszármazékok 390
10.11.2. Imidazolin- és imidazolszármazékok 393
10.11.3. Piridinvázas antituberkulotikumok 395
10.11.4. Néhány további piridinszármazék 397
10.11.5. Piperidin, piperazin és egyéb telített gyűrűk származékai 398
10.11.6. Triciklusos antidepresszánsok és rokon vegyületek 400

10.11.7. Antimikrobiális hatású kinolin- és akridinszármazékok 402
10.11.8. Egyéb kondenzált heterociklusok 404
Irodalom 408
10.12. Aminosavak és származékaik, peptidek és fehérjék 414
10.12.1. Meghatározás saját fényelnyelés alapján 414
10.12.2. Kémiai reakciókra alapozott módszerek aminosavak analízisében 417
10.12.3. Kémiai reakciókra alapozott módszerek aminosavszármazékok, peptidek és fehérjék analízisében 418
Irodalom 423
10.13. Szteroid hormonok 424
10.13.1. Meghatározás saját fényelnyelés alapján 424
10.13.2. Kémiai reakciókra alapozott módszerek 427
Irodalom 435
10.14. Antibiotikumok 438
10.14.1. Szénhidrát antibiotikumok 438
10.14.2. Makrociklusos laktám antibiotikumok 440
10.14.3. Kinon antibiotikumok 442
10.14.4. Aminosav, peptid antibiotikumok 444
10.14.5. Aromás antibiotikumok 448
Irodalom 449
10.15. Vitaminok 455
10.15.1. A-vitamin 455
10.15.2. B-vitaminok 456
10.15.3. C-vitamin (aszkorbinsav) 462
10.15.4. D-vitamin 465
10.15.5. E-vitamin (tokoferol) 466
10.15.6. K-vitaminok 467
10.15.7. Egyéb vitaminok 469
Irodalom 471
10.16. Fémek és néhány más elem meghatározása gyógyszerekben 474
10.16.1. Bevezetés 474
10.16.2. Vas meghatározása 475
10.16.3. Higany meghatározása 475
10.16.4. Bizmut meghatározása 477
10.16.5. Egyéb fémek meghatározása 477
10.16.6. Néhány más elem meghatározása 479
Irodalom 482
10.17. Néhány további vegyületcsoport 483
10.17.1. Felületaktív kvaterner ammóniumvegyületek és rokon származékok 483
10.17.2. Glicerin és származékai 485
10.17.3. Cukrok, cukor-alkoholok, poliszaccharidok 486
10.17.4. Szívglikozidok 489
Irodalom 492

Tárgymutató 494

1. Bevezetés

1.1. Történeti áttekintés [26, 27]

Mivel a gyógyszervegyületek túlnyomó többsége színtelen, az érdeklődés fényelnyelési sajátságaik iránt csak akkor élénkülhetett meg, amikor a múlt század második felében felismerték, hogy számos alkaloid és más vegyület jellegzetes színű származékokat ad különböző szervetlen reagensekkel való kezelés hatására. Ezek a felfedezések, amelyek elsősorban a törvényszéki toxikológia területén hoztak nagy fejlődést, természetesen csupán kvalitatív (legfeljebb félkvantitatív) kimutatási módszerek voltak, az idő szerint ui. nem voltak meg a módszerek egzakt kvantitatív meghatározássá való továbbfejlesztésének technikai-műszeres feltételei.

A XX. század első két évtizede hatalmas előrelépést hozott az optikai műszerek fejlődésében. Ez megteremtette az alapot a spektrofotometriás gyógyszeranalízis kialakulásához mind a kvalitatív, mind pedig a kvantitatív elemzés területén. Bár az ultraibolya és látható spektrumok felvételének műszeres feltételei már az 1910-es években megvoltak, és ebben az időben már számos gyógyszervegyület spektrumát fel is vették, a meglehetősen nehezen kezelhető spektrofotométerek még nem terjedtek el a gyógyszer-analitikai gyakorlatban. Annál szélesebb körben alkalmazták a különböző szűrős fotométereket. Ezek közül a legismertebb, a Pulfrich-fotométer fényforrásából kilépő fénynyalábot két egyenlő intenzitású sugárnyalábra osztjuk; ezek áthaladnak a vizsgálandó oldatot, ill. tiszta oldószert tartalmazó küvettán. Egy alkalmas színszűrőn való átjutás után az oldószeren áthaladó fénynyaláb intenzitását addig csökkentjük egy abszorbanciára kalibrált diafragma segítségével, amíg az megegyezik az oldaton keresztül haladt fény intenzitásával. Az egyenlő fényintenzitás beállítását a vizsgáló a szeme segítségével végezte el. A későbbiek során a mérés kényelmesebbé és pontosabbá tétele céljából forgalomba kerültek ennek, ill. többé-kevésbé hasonló elven dolgozó számos más fotométernek az emberi szemet a mérésből kiküszöbölő, objektív, fotocellás változatai. Közös tulajdonsága volt azonban ezeknek a készülékeknek, hogy csak látható fénnyel dolgoztak. Így természetesen gyógyszer-analitikai felhasználásuknak alapfeltétele volt a gyógyszervegyületek átalakítása színes származékká.

Ennek megfelelően az 1920-as, 30-as években kiterjedt kutatás indult meg a már korábban ismert kvalitatív analitikai célokat szolgáló színreakciók továbbfejlesztésére kvantitatív fotometriás módszerekké, ill. új színreakciókon alapuló módszerek kidolgozására. Ezeknek a kutatásoknak eredményeképpen a fotometria a gyógyszeranalitika első nagy hatékonyságú műszeres ágazata lett, és ez valósággal forradalmi

változást hozott az addig gyakorlatilag csak a titrimetriára és gravimetriára korlátozódó mérési lehetőségekben. Ebben a korszakban írták le számos (a későbbiek során többször is korszerűsített) módszer első kvantitatív analitikai változatát, mint pl. szalicilsav meghatározását vas (III)komplexe formájában [10], aromás aminok, pl. prokain meghatározását diazotálás és β-naftollal való kapcsolás után [14], aminosavak meghatározását 1,2-naftokinon-4-szulfonsavval való reakció után [7], alkaloidok meghatározását pikrátjuk formájában [19] stb.

A spektrofotometriás gyógyszeranalízis fejlődésének fontos mérföldköve volt a gyakorlati feladatok megoldására is alkalmas, könnyen kezelhető Beckman DU ultraibolya-látható spektrofotométer bevezetése az 1940-es évek elején, majd (más, hasonló készülékekkel együtt) elterjedése a II. világháborút követő években. Ezzel megnyílt a lehetőség a gyógyszerek nagy többségének kvalitatív és kvantitatív meghatározására az ultraibolya tartományban, előzetes kémiai átalakítás nélkül, a kémiai reakció után kialakított színes termékek mérését pedig a korábbinál egzaktabb alapokra lehetett helyezni: ettől az időszaktól számíthatjuk a mai értelemben vett spektrofotometriás gyógyszeranalízis kialakulását.

Ez a módszer hamarosan a gyógyszer-analitika legnagyobb teljesítőképességű, leggyakrabban alkalmazott módszere lett. Tömegesen jelentek meg egyre egzaktabb kémiai alapokon álló egyre szelektívebb és érzékenyebb módszerekről szóló publikációk. Ezek a csúcspontot az 1950-es években érték el. Később, elsősorban a kromatográfiás technikák térhódítása miatt, a kutatók érdeklődése némileg csökkent a spektrofotometria iránt, a gyakorlatban azonban — amint azt a következő fejezetben részletesen kifejtjük — az változatlanul a gyógyszer-analitika egyik alapvetően fontos módszere maradt.

Ami a módszer fejlődését illeti, megállapíthatjuk, hogy az utolsó 30—40 évben alapvető, új helyzetet teremtő változások nem történtek. (Az ezt közvetlenül megelőző korból származó és néhány laboratóriumban még mindig üzemelő Beckman, Hilger, Unicam stb. spektrofotométerekkel ma is a jelenkori gyógyszer-analitika feladatai jelentős részének megoldására alkalmas adatokhoz lehet jutni.)

A műszerek fejlődése a gyorsabb, kényelmesebb, szelektívebb, pontosabb mérési lehetőségek irányába mutat, továbbá lehetőséget teremt a módszer kapcsolására kromatográfiás technikákkal, ill. automatikus elemzőkkel (regisztráló, az utóbbi időben igen gyorsan regisztráló készülékek, reflexiós módszerek elterjedése kromatogramok kiértékelésére, mikroprocesszor vezérelte készülékek stb.). Hasonló célokat szolgált a méréstechnika és a hozzá csatlakozó számítástechnika fejlődése (differencia és derivatív spektrofotometriás, különféle háttérkorrekciós és egyéb algebrai-számítógépes módszerek fejlesztése stb.). Mindezeket a módszereket a következő fejezetekben részletesen ismertetjük.

Végül megemlítjük, hogy a módszer különböző fejlődési fokozatait kifejező nevezéktan kezelése nem egyértelmű a szakirodalomban. Eredetileg a vizsgálandó és a standardot tartalmazó oldat színintenzitásának a higítás, ill. a rétegvastagság változtatása segítségével való összehasonlításán alapuló, nem kielégítően pontos módszert kolorimetriának, a színszűrős objektív vagy szubjektív detektálással működő műszerrel való mérést fotometriának, végül a monokromatikus fénnyel dolgozó, objektív detektorral ellátott műszer alkalmazását spektrofotometriának nevezték. Ma már a

gyógyszer-analitikában az esetek döntő többségében spektrofotometriás méréseket végeznek; a szűrős fotométerek inkább csak klinikai-toxikológiai laboratóriumokban kerülnek alkalmazásra, a kolorimetriát pedig a szó eredeti jelentése szerint már régóta nem alkalmazzák. A „kolorimetria" kifejezést viszont mind a mai napig meglehetősen széles körben használják minden olyan módszer megjelölésére, ahol a fényforrástól és a detektálástól függetlenül a mérést a meghatározandó vegyület színes származékká való átalakítására alapozzák.

1.2. A spektrofotometria helye a korszerű gyógyszeranalízisben

Bár — amint erre az előző fejezetben rámutattunk — a spektrofometriát méltán számíthatjuk a gyógyszeranalízis klasszikus módszerei közé, jelentősége mind a mai napig sem mutat jelentős csökkenést, sőt — elsősorban más módszerekkel való összekapcsolása révén — alkalmazási területe egyre szélesedik.

Ami a módszer kvalitatív analitikai alkalmazását illeti, a spektrumok felvétele, a maximum és minimum hullámhosszának megadása számos esetben fontos eszköze gyógyszervegyületek azonosításának, s ezzel a lehetőséggel még a legkorszerűbb gyógyszerkönyvek is gyakran élnek. Gyógyszer-alapanyagok fajlagos abszorbancia adatainak meghatározása kb. olyan értékű információt szolgáltat, mint az egyéb fizikai állandók mérése. Az ultraibolya-látható spektrofotometriának mint a gyógyszerkutatást alátámasztó spektroszkópiai módszerek egyikének ugyancsak számottevő a jelentősége. A spektrumok tanulmányozása bizonyos esetekben alapvetően fontos információkat szolgáltat molekulaszerkezeti problémák eldöntéséhez. Általánosságban azonban az állapítható meg, hogy az esetek nagyobb részében ezek a spektrumok csupán bizonyos funkciós csoportok, szerkezeti elemek jelenlétére utalnak, nem pedig a molekula egészére vonatkozóan nyújtanak felvilágosítást. Így a spektroszkópiának ez az ágazata potenciális gyógyszervegyületek szerkezetkutatásában a kétségkívül nagyobb teljesítőképességű infravörös, magmágneses rezonancia- és tömegspektroszkópia kiegészítő módszerének tekinthető.

A felsorolt spektroszkópiai módszerekkel ellentétben az ultraibolya-látható spektrofotometria gyógyszer-analitikai felhasználásában a kvantitatív analitikai alkalmazások rendelkeznek nagyobb jelentőséggel. Gyógyszer-alapanyagok hatóanyagtartalmának meghatározására ma is meglehetősen kiterjedten használják mind a saját fényelnyelésen, mind pedig a kémiai reakciók után mért fényelnyelésen alapuló módszereket. Mivel ezeknek a módszereknek szelektivitása általában gyengébb, mint a korszerű gáz-, ill. nagynyomású folyadékkromatográfiás módszereké, a szelektivitás növelése céljából gyakran kombinálják azokat előzetes oszlop-, ill. vékonyréteg-kromatográfiás elválasztással. További lehetőséget jelentenek a szelektivitás növelésére a különböző differencia- és differenciál-spektrofotometriás technikák, valamint matematikai módszerek alkalmazása többkomponensű, valamint „háttérrel" rendelkező anyagok vizsgálatára.

Lényegében hasonló megállapítások tehetők a spektrofotometriás módszernek kiszerelt gyógyszerkészítmények kvantitatív analízisére való alkalmazásával kapcsolatban is. Itt külön megjegyzendő, hogy a spektrofotometriás módszer jelentőségét ezen a területen nagyban növeli az a körülmény, hogy ez a módszer igen előnyösen automatizálható; a spektrofotometriás detektorral ellátott automata analizátorokat kiterjedten használják kiszerelt gyógyszerkészítmények sorozatelemzésénél, különösen tabletták „content uniformity" vizsgálatánál.

Gyógyszerkészítmények stabilitásvizsgálatára a spektrofotometriás módszer csak akkor alkalmas, ha az kielégítően szelektívvé tehető a bomlatlan hatóanyagra, ill. a bomlástermékre. Mivel ez csak szerencsés esetekben következik be, stabilitásvizsgálatokra a spektrofotometriás módszer általában csak egy kromatográfiás elválasztási lépés beiktatásával alkalmas, ezen a területen azonban ma már inkább gáz-, ill. nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás módszereket használnak.

Gyógyszerek, ill. metabolitjaik biológiai mintákból való meghatározásában a spektrofotometria lehetőségei szerényebbek, mint a gyógyszeralapanyagok és -készítmények esetében. Saját fényelnyelésen alapuló meghatározást csak kivételes esetekben lehet végezni. Megfelelő szelektivitású, megfelelően intenzív fényelnyeléssel rendelkező termékhez vezető reakció alkalmazása után megfelelően nagy dózisban alkalmazott gyógyszerek esetében a spektrofotometriás mérés számos esetben elvégezhető, ezen a területen azonban ma már a nagyobb igényű méréseket inkább kromatográfiás vagy immunanalitikai módszerekkel végzik.

A gyógyszer-analitika ismertetett területein a spektrofotometria alkalmazásának kérdésénél a következőket kell mérlegelni. A gyógyszerek minőségére, vizsgálatuk színvonalára vonatkozó igények állandó növekedése azt eredményezte, hogy azokon a területeken, ahol a spektrofotometria alkalmazása számításba jöhet, elsősorban a meghatározások szelektivitása, másodsorban érzékenysége tekintetében nőnek az igények. Amint erre az előzőekben rámutattunk, ez számos esetben azt eredményezi, hogy a spektrofotometriás módszereket szelektívebb és érzékenyebb módszerekkel váltják fel. Meg kell azonban jegyezni, hogy ezek a módszerek kivétel nélkül lényegesen drágábbak a spektrofotometriánál. Ezért elsősorban a szerényebben felszerelt munkahelyeken olyan tendenciák is érvényesülnek, hogy a növekvő igényeket a spektrofotometriás módszerek színvonalának növelésével, elsősorban a korábban alkalmazottaknál szelektívebb és érzékenyebb mérést lehetővé tevő kémiai reakciók alkalmazásával elégítsék ki. Ez a magyarázata annak, hogy ilyen módszerek irányába mind a mai napig meglehetősen intenzív kutatás folyik, a leírtak alapján azonban nem meglepő, hogy ennek a kutatásnak a súlypontja az utolsó 1-2 évtizedben áttolódott a szerényebb anyagi lehetőségekkel rendelkező országokba.

A spektrofotometriának a gyógyszeranalízisben bekövetkező bizonyos mértékű térvesztését messzemenően kompenzálja az a tény, hogy a spektrofotometria módszertana és szemléletmódja tovább él olyan nagy teljesítőképességű, modern módszerekben, mint a nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia, ahol a gyógyszer-analitikában az esetek többségében ultraibolya spektrofotométert használnak detektorként, ill. a vékonyréteg-denzitometriában, ahol a korszerű készülékek ugyancsak el vannak látva reflexiós és transzmissziós üzemmódban egyaránt alkalmazható ultraibolyalátható spektrofotometriás detektorral.

1.3. A spektrofotometriás gyógyszeranalízis irodalma

Mint az a klasszikus, de mind a mai napig széles körben használt, sőt még mindig fejlődő, fontos módszerekre jellemző, a spektrofotometriás gyógyszeranalízisnek hatalmas irodalma van. Valamennyi műszeres analitikával, szélesebb értelemben vett spektroszkópiával foglalkozó monográfia és kézikönyv tartalmaz ultraibolya-látható spektrofotometriával foglalkozó fejezetet. Ugyanígy valamennyi klinikai analitikai, gyógyszer-analitikai könyv is hosszabb-rövidebb fejezetekben foglalkozik a spektrofotometria, ill. a kolorimetria alkalmazásaival. Ezeknek a fejezeteknek felsorolása nem képezheti ennek az összeállításnak feladatát. Felsoroljuk azonban azokat az 1960 óta megjelent könyveket, amelyek tárgyköre általános ultraibolya-látható spektrofotometria ugyan, de valamennyi tartalmaz bőséges szerves- és gyógyszer-analitikai anyagot [1—6, 8, 9, 13, 15, 16, 18, 21, 23, 25].

Az egyes spektrofotometriás technikákra (pl. kolorimetria), ill. egyes vegyületcsaládokra specializált további nagyszámú könyv adatait a megfelelő fejezetek irodalomjegyzékében lehet megtalálni.

Ami az irodalmi publikációkat illeti, a közvetlenül vagy közvetve spektrofotometriás gyógyszer-analitikai tárgyúnak tekinthető közlemények száma a kezdetektől napjainkig meghaladja a húszezret. A korai időszakban publikált cikkek megoszlottak elsősorban a különböző nemzeti Gyógyszerészeti Társaságok folyóiratai, valamint a nemzetközi analitikai folyóiratok (Analytical Chemistry, Zeitschrift für Analytische Chemie, Analytica Chimica Acta stb.), ill. klinikai-biokémiai alkalmazások területén a Journal of Biological Chemistry, Biochemical Journal stb. között.

Az újabb idők publikációi közül az Analytical Chemistry már csak elvileg új módszereket közöl. A többi nemzetközi folyóirat közül mind az új módszerek bevezetése, mind pedig az alkalmazások területén kitüntetett a szerepe a Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, az Analyst és a Journal of Pharmaceutical Sciences folyóiratoknak. Szerephez jut még a Journal of the Association of Official Analytical Chemist, az Analytical Letters és más folyóiratok is. Változatlanul igen sok publikáció jelenik meg nemzeti gyógyszerészeti lapokban is, a korábban leírtaknak megfelelően azonban a számbeli súlypont erősen eltolódott a kínai, indiai, orosz, ukrán, lengyel stb. folyóiratok irányába. A klinikai-biokémiai területen jelentős publikációs fórum a Clinical Chemistry és még számos további folyóirat.

1.4. Könyvünk célkitűzései

Amint az az előző alfejezet összeállításából látható, a spektrofotometriás tárgyú könyvek igen nagy száma és a gyógyszer-analitikai vonatkozású irodalom rendkívüli méretei ellenére sem található a spektrofotometriás szakirodalomban egyetlen olyan könyv sem, amelyiknek profilja tiszta gyógyszer-analitika lenne és vállalná ez utóbbi valamennyi aspektusának tárgyalását. (A tiszta gyógyszer-analitikai profillal rendel-

kező fotometriás könyvek — bár a maguk területe régebbi irodalmának még ma is felbecsülhetetlen értékű összefoglalásai — szinte kizárólag a színreakciókra koncentrálnak, s így szemléletük ma már erősen túlhaladottnak tekinthető [11, 12, 17, 20, 22]). Ha ehhez még hozzávesszük azt a tényt, hogy a magyar szakirodalomban még sokkal nagyobb a hiány: a spektrofotometria klasszikus könyveinek egyikét sem fordították le magyarra, s ilyen könyv magyar szerzőtől sem került publikálásra,* akkor érzékelhető, hogy hazai viszonylatban különösen nagy az az űr, amelynek betöltését a jelen könyv szerzője célul tűzte ki.

Célkitűzésünk olyan könyvet adni az olvasó kezébe, amely rövid összefoglalás formájában tárgyalja az ultraibolya-látható spektrofotometria alapjait is, mégpedig a gyógyszer-analitikus szemével, a leírtakat illusztráló példákat erről a területről választva. A fő fejezetek azonban már a kifejezett gyógyszer-analitikai problémákra koncentrálnak mind a minőségi elemzés (szerkezet-spektrum összefüggések), mind pedig a kvantitatív analízisre szolgáló technikák vonatkozásában. Külön fejezetek foglalkoznak gyógyszerek különböző mátrixokban való meghatározásának speciális problémáival, valamint azokkal a lehetőségekkel, amiket a kromatográfiás és spektrofotometriás módszerek összekapcsolása jelent a gyógyszer-analitikus számára. Súlyt fektettünk a kémiai reakciókra alapozott módszerek kémiai alapjainak bemutatására is, végül a könyv leghosszabb fejezete áttekintést ad a legfontosabb gyógyszercsaládok spektrofotometriás meghatározási lehetőségeiről, kiemelve az utolsó 10 év fejleményeit.

Könyvünk tárgyalásmódjával a gyakorlatban dolgozó analitikus igényeit tartottuk szem előtt; az elméleti és matematikai alapokat csak olyan mélységig tárgyaltuk, ami a gyakorlatban dolgozó analitikus számára is könnyen érthető, de lehetővé teszi az ismertetett elvek és technikák megfelelő színvonalú alkalmazását. Az irodalmi adatok összeválogatásánál a könyv keretei természetesen lehetetlenné tették a teljességre való törekvést. Hasonló okokból még csak meg sem kíséreltünk kézikönyvet adni az olvasó kezébe: a könyvben nem találhatók receptek és részletes leírások, amelyek alapján az olvasó egy-egy ismertetett módszert kipróbálhat. Célunk a könyvvel nem több és nem kevesebb volt, mint megismertetni az olvasót a spektrofotometria alapjaival és korszerű lehetőségeivel, segíteni eligazodását a gyógyszer-analitikai szakirodalomban, hogy ott megtalálhassa és alkalmazni tudja az optimális megoldást problémájára, vagy akár maga is kidolgozhassa a szükséges módszert.

Irodalom

1. Bauman, R. P., Absorption Spectroscopy. Wiley, New York 1962.
2. Bousquet, P., Spectroscopy and its Instrumentation. Adam Hilger Ltd., London 1971.
3. Burgess, C., Knowles, A. (ed.), Standards in Absorption Spectrometry. Chapman and Hall, London, New York 1981.

* Két kitűnő egyetemi jegyzet azonban feltétlenül említést érdemel: Láng László, Abszorpciós színképelemzés. Felsőoktatási Jegyzetellátó Vállalat, Budapest 1965; valamint Dinya Zoltán, Elektronspektroszkópia. Tankönyvkiadó, Budapest 1982.

4. DE GALAN, L., Analytical Spectrometry. Adam Hilger Ltd., London 1971.
5. DERKOSCH, J., Absorptionsspektralanalyse in ultravioletten, sichtbaren und infraroten Gebiet. Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt 1967.
6. EDISBURY, J. R., Practical Hints on Absorption Spectrometry. Hilger and Watts, London 1966.
7. FOLIN, O., J. Biol. Chem. **51,** 377, 386 (1922).
8. HAMPEL, A., Absorptionsspektroskopie in ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich, Vieweg, Braunschweig 1964.
9. JAFFÉ, H. H., ORCHIN, M., Theory and Application of Ultraviolet Spectroscopy. Wiley-Interscience, New York 1962.
10. JONES, A. J., Chemist and Druggist **91,** 402 (1919).
11. KAKAC, B., VEJDELEK, Z. J., Handbuch der Kolorimetrie I, II (Kolorimetrie in der Pharmazie), III (Kolorimetrie in der Biologie, Biochemie und Medizin). Gustav Fischer Verlag, Jena 1962—1966.
12. KAKAC, B., VEJDELEK, Z., J., Handbuch der photometrischen Analyse, Organische Verbindungen, Verlag Chemie, Weinheim 1977.
13. KNOWLES, A., BURGESS, C., (ed.) Practical Absorption Spectrometry. Chapman and Hall, London, New York 1984.
14. LAUFFS, A. Apotheker-Ztg. **42,** 621 (1927).
15. NOWICKA-JANKOWSKA, T., GORCZYNSKA, K., MICHALIK, A., WIETESKA, E., Analytical Visible and Ultraviolet Spectrometry. Elsevier, Amsterdam 1986.
16. PERKAMPUS, H.-H., UV-VIS-Spektroskopie und ihre Anwendungen. Springer Verlag, Berlin 1986.
17. PESEZ, M., POIRIER, P., BARTOS, J., Pratique de l'Analyse Organique Colorimetrique, Masson, Paris 1966.
18. RAO, C. N. R., Ultraviolet and Visible Spectroscopy, Chemical Application. Butterworth, London 1975.
19. ROJAHN, C. A., SEIFERT, R., Arch. Pharm. **268,** 499 (1930).
20. SAWICKI, E., Photometric Organic Analysis, I, II. Wiley-Interscience, New York 1970.
21. SCHWEDT, G. (ed.), Photometrische Analyseverfahren. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1988.
22. SNELL, F. D., SNELL, C. T., SNELL, C. A. Colorimetric Methods of Analysis, III, IV (Organic Compounds), IIIA, IVA. van Nostrand, Princeton 1948—1970.
23. SOMMER, L., Analytical Absorption Spectrophotometry in the Visible and Ultraviolet. Akadémiai Kiadó, Budapest—Elsevier, Amsterdam 1989.
24. STEARNS, E. I., The Practice of Absorption Spectrophotometry. Wiley-Interscience, New York 1969.
25. STERN, E. E., TIMMONS, C. J., Gillam and Stern's Introduction to Electronic Absorption Spectroscopy in Organic Chemistry. Edward Arnold Ltd., London 1970.
26. SZABADVÁRY F., Az analitikai kémia módszereinek kialakulása. Akadémiai Kiadó, Budapest 1960; History of Analytical Chemistry. Pergamon Press, Oxford 1966.
27. THORBURN BURNS, D., „Aspects of the development of colorimetric analysis and quantitative molecular spectroscopy in the ultraviolet-visible region", in BURGESS, C., MIELENZ K. D., (ed.) Advances in Standards and Methodology in Spectrophotometry. Elsevier, Amsterdam 1987, 1—19.
28. VEJDELEK, Z. J., KAKAC, B., Farbreaktionen in der spektrophotometrischen Analyse organischer Verbindungen, I, II. Gustav Fischer Verlag, Jena 1969—1973, Ergänzungsband, I, II, 1980—1982.

2. Fényabszorpció (és reflexió) mérésével összefüggő kérdések*

2.1. Alapfogalmak

Könyvünk tárgyát a fény és anyag kölcsönhatásán alapuló spektroszkópiai módszerek közül az ultraibolya-látható abszorpciós spektroszkópia kvalitatív és kvantitatív gyógyszer-analitikai alkalmazásai képezik. Ez azt jelenti, hogy egyáltalán nem érintünk emissziós spektroszkópiai módszereket és a tárgyalást leszűkítjük arra az esetre, amikor a külső fényforrásból származó fény a vizsgálandó anyag igen híg oldatát tartalmazó küvettán halad keresztül és ott részlegesen elnyelődik. Egészen röviden azzal a módszerrel is foglalkozunk, amelynél a fénysugár gyengítése a vizsgálandó szilárd minta felületéről való visszaverődés során történik (reflexiós spektroszkópia).

A spektrofotometriás vizsgálatoknál általában a kevert fényű fényforrás által kisugárzott energiából egy a későbbiek során részletesen tárgyalandó monokromátor segítségével kivágott többé-kevésbé monokromatikus fénysugarat használunk. Ennek jellemzésére általában a hullámhosszat adják meg, elméleti spektroszkópiai munkákban azonban gyakran használják a rezgésszámot, ill. az azzal arányos hullámszámot, mivel ezek közvetlenül arányosak a sugárzás energiájával.

$$c = \nu \cdot \lambda \tag{2/1}$$

$$E = h \cdot \nu = h\frac{c}{\lambda} = 10^{-7} \cdot h \cdot c \cdot \nu^* \tag{2/2}$$

A fénysugárzás hullámhossza, rezgésszáma, hullámszáma és energiája közti összefüggést a (2/1) és (2/2) egyenletekből olvashatjuk ki, ahol c a fény sebessége, ν a rezgésszáma, λ a hullámhossza, amit nanométerben adunk meg (1 nm $= 10^{-7}$ cm), E a λ hullámhosszú fény fotonjának energiája, h a Planck-állandó, ν^* pedig a hullámszám $\left(\frac{10^7}{\lambda}\right)$. Amint látható, a sugárzás energiája fordítva arányos a hullámhosszal.

A vizsgálataink során felhasznált ultraibolya-látható tartomány az elektromágneses sugárzási spektrumban helyezkedik el. A tartomány alsó (nagy energiájú) hullámhossz határának általában kb. 190 nm-t tekintjük; közvetlenül alatta a csupán külön-

* A fejezetben tárgyalt alapfogalmak és készülékkonstrukciós kérdések vonatkozásában az 1. Fejezet irodalomjegyzékében [1—6, 8, 9, 13, 15, 16, 18, 23, 24] számon felsorolt könyvekre utalunk.

leges méréstechnikával tanulmányozható, gyógyszer-analitikai szempontból nem különösen jelentős ún. vákuum ultraibolya tartomány helyezkedik el. A tartomány felső (kis energiájú) határa az emberi szem érzékenységi határának megfelelően kb. 780 nm-nél van. Ez az érték kb. megfelel a legtöbb közhasználatú spektrofotométer felső hullámhossz-határának is. Továbbhaladva a hullámhossz-skálán a mérsékelt, bár egyre növekvő jelentőségű közeli infravörös tartományon keresztül a nagy fontosságú

2/1. táblázat

Hullámhossz, nm	400	500		600		700
Szín	ibolya	kék	zöld	sárga	narancs	vörös
Komplementer	sárga	narancs	vörös	ibolya	kék	zöld

infravörös tartományba jutunk el. A 190—780 nm tartományon belül kb. 380 nm-nél van az emberi szem érzékenységének megfelelően az ultraibolya és a látható spektrumtartomány határa, ennek azonban sem méréstechnikai, sem elméleti szempontból nincs jelentősége.

A 2/1. táblázatban feltüntettük a látható spektrumtartomány egyes színeihez rendelhető hullámhossztartományt, valamint a színek komplementerjeit is, vagyis azt a színt, amit akkor észlelünk, ha a kevert (fehér) fényből oldatunk az adott hullámhosszúságú fényt elnyeli. Ennek (az oldat természetes fényben észlelhető színének) megfigyelése alapján már hozzávetőlegesen megállapíthatjuk, milyen hullámhossztartományban várhatunk maximális fényelnyelést oldatunktól. Pl. a savas közegben narancsvörös színű metilnarancs indikátor oldata a zöldeskék színű fényt nyeli el (maximális elnyelés 500 nm körül).

2.2. A fényelnyelés mechanizmusa az ultraibolya és látható tartományban

Ha egy szerves molekula az előző fejezetben említett elektromágneses sugárzások valamelyikét elnyeli, az elnyelt energia háromféle módon növelheti a molekula energiatartalmát. A legkisebb energiájú (legnagyobb hullámhosszú) fény elnyelése a molekula forgási energiáját, a valamivel nagyobb energiájú pedig a molekulán belül végbemenő rezgések energiáját növeli meg. Ez a két fényelnyelési forma az infravörös tartományba esik.

A fentiekkel éles ellentétben a látható és ultraibolya tartományban elnyelt fényenergia hatására a molekula külső pályán elhelyezkedő egy-egy elektronja gerjesztődik magasabb, nagyobb energiájú pályára. A két pálya energianívói közötti energiakülönbséget fedezi az elnyelt fény energiája. Ezért nevezik gyakran közös néven az ultraibolya és látható spektroszkópiát elektrongerjesztéses spektroszkópiának.

Ha az egyes vegyületek fényelnyelési sajátságait elektronszerkezetükből akarjuk levezetni, figyelembe kell venni azt a tényt, hogy az elektron gerjeszthetőségét a

molekulában nemcsak az határozza meg, hogy az elektron a molekula melyik atomjához tartozik, s ott alapállapotban melyik pályán található. Egy molekulában ui. a gerjesztés szempontjából számításba jövő elektronok molekulapályákon helyezkednek el, és gerjeszthetőségüket alapvetően meghatározza környezetük a molekulában, a kötés, amiben részt vesznek stb.

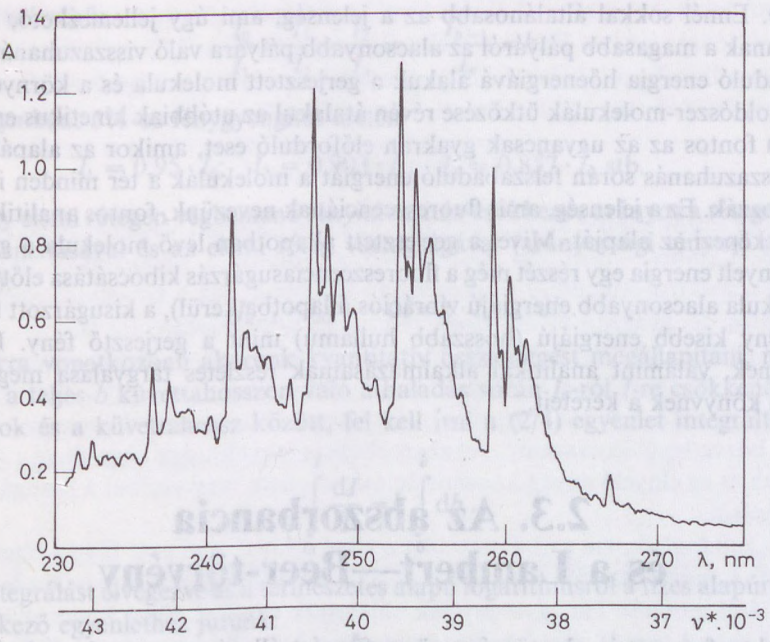
Az abszorpciós spektrum sávjainak létrejötténél az a döntő tényező, hogy az elektronpályák energianívói kvantáltak, vagyis az elektron mind alap-, mind pedig gerjesztett állapotban véges számú, határozott energiatartalommal rendelkező pályán foglalhat helyet. Természetesen az átmenetek száma az egyes energianívók között ugyancsak véges, és az egyes átmenetekhez jól definiált energia tartozik. Az abszorpciós sávok egy-egy ilyen átmenetnek felelnek meg. Az elmondottakból az következnék, hogy az abszorpciós spektrumok éles vonalakból állnak: egy-egy vonal felelne meg két pálya energianívói közti különbségnek. Ilyen spektrumot azonban csupán atomok vagy igen egyszerű molekulák gázfázisú felvételénél kaphatunk.

Szerves gyógyszervegyületek oldatspektrumai többé-kevésbé széles sávokból állnak. A vonalaknak sávvá való szélesedése az ún. rezgési és forgási energianívók következménye. Amint erre ui. már a fejezet bevezetőjében utaltunk, a molekula energiafelvétele kiterjed az elektrongerjesztésen kívül a molekula forgási, valamint a molekulán belüli atomok, ill. atomcsoportok rezgési energiájának növelésére is. Egy-egy elektrongerjesztés során mind az alapállapothoz, mind pedig a gerjesztett állapothoz számos rezgési energiaszint tartozik, egy-egy rezgési energiaszinthez pedig további forgási energiaszintek. Ez más szavakkal azt jelenti, hogy egy elektronnak magasabb pályára való gerjesztéséhez szükséges energiát kismértékben ugyan, de befolyásolja az, hogy alapállapotban, ill. gerjesztett állapotban a molekula, ill. molekularész milyen rezgési, ill. forgási energiaállapotban van.

Bár — amint erre már utaltunk — a rezgési energia megváltozásának megfelelő átmenetek az infravörös spektrumtartományba (a forgási átmenetek pedig a még kisebb energiájú távoli infravörös tartományba) esnek, ezek szuperponálódnak az ultraibolya tartományban megjelenő elektrongerjesztési spektrumvonalakra. Ez a szuperponálódás az esetek többségében a vonalnak sávvá szélesedését eredményezi, vagy inflexiók formájában jelentkezik, bizonyos esetekben azonban, különösen apoláris oldószerekben, ill. gőzfázisban felvett spektrumok esetén megjelenhet az ún. rezgési finomszerkezet, ahol a sáv egy-egy mellékmaximuma közti energiakülönbség egy-egy rezgési állapot közti energiakülönbséggel arányos. Jól tanulmányozható ez a 2/1. ábrán a benzol példáján.

A 2/1. ábrán látható, hogy az egymástól kb. 5,5—5,5 nm távolságban megjelenő mellékmaximumok különbsége az energiaarányos, tehát ez esetben jobban használható hullámszámskálán kb. 900 cm^{-1} értéknek felel meg, ami az infravörös tartomány közepe táján helyezkedik el. Megjegyzendő még, hogy gőzfázisban, igen jó felbontású készülékkel elvégezve a felvételt, megjelenik a rezgési melléksávok forgási finomszerkezete is. Itt az egyes mellékmaximumok közti 100—150 cm^{-1}-es különbség valóban a távoli infravörös tartományba esik.

Hangsúlyozni kell, hogy a rezgési finomszerkezet elmaradása, ill. az esetek többségében csupán sávszélesedés formájában való megjelenése nem a tökéletlen felvételtechnika, hanem molekulán belüli, ill. az oldószerrel való kölcsönhatások eredménye:



2/1. ábra. Benzol gőzfázisú spektruma

gyógyszervegyületek oldatspektrumait, ill. az azokból megszerezhető információkat az esetek nagy többségében alig vagy egyáltalán nem befolyásolja, ha spektrumukat az általánosan használatosnál lényegesen nagyobb felbontású készülékkel vesszük fel. (Ilyen szempontból az ultraibolya-látható spektroszkópia az infravörös spektroszkópiával együtt alapvetően különbözik a spektroszkópia más ágazataitól, elsősorban az NMR- és tömegspektroszkópiától.)

Mivel a gyógyszervegyületek túlnyomó többségében az ultraibolya-látható spektrumtartományban nem egyetlen, hanem több elektronpár is gerjeszthető, ezért spektrumuk általában nem egy sávból, hanem egy sávrendszerből áll, ahol az egyes sávok egymástól esetenként jól elválnak, gyakran azonban egymást teljesen vagy részlegesen átfedik. Bár a spektrumok kvantummechanikai alapon való pontos számítása csupán egyszerűbb molekulák esetén lehetséges, mégis részben elméleti alapon, részben pedig nagyszámú szerves vegyület elektronspektrumának tanulmányozásából számos olyan összefüggés volt megállapítható, amely lehetővé teszi gyógyszervegyületek molekulaszerkezetének a spektrum segítségével való tanulmányozását. Ezzel a kérdéssel a 3. fejezetben részletesen foglalkozunk.

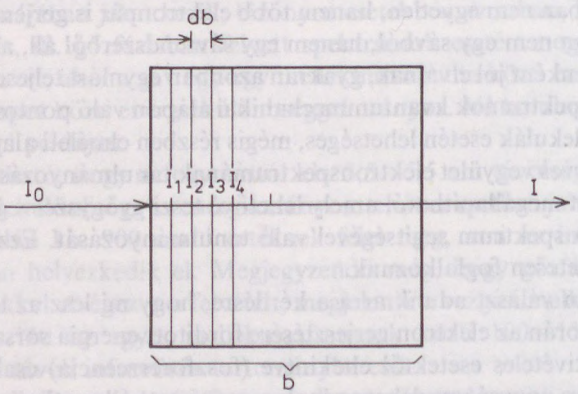
Végül röviden választ adunk arra a kérdésre, hogy mi lesz az ultraibolya-látható fény elnyelése során az elektron gerjesztésére fordított energia sorsa a gerjesztés után. A molekulák kivételes esetektől eltekintve (foszforeszcencia) csak igen rövid ideig (10^{-8} másodperc nagyságrend) maradnak a gerjesztett állapotban. Az elnyelt energia fedezheti egy fotokémiai reakció energiaszükségletét, amelyek közül a rövidhullámú (különösen a vákuum ultraibolya) tartományban a molekulák disszociációja kerül

előtérbe. Ennél sokkal általánosabb az a jelenség, ami úgy jellemezhető, hogy az elektronnak a magasabb pályáról az alacsonyabb pályára való visszazuhanása során felszabaduló energia hőenergiává alakul: a gerjesztett molekula és a környezetében levő pl. oldószer-molekulák ütközése révén átalakul az utóbbiak kinetikus energiájává. Igen fontos az az ugyancsak gyakran előforduló eset, amikor az alapállapotba való visszazuhanás során felszabaduló energiát a molekulák a tér minden irányába kisugározzák. Ez a jelenség, amit fluoreszcenciának nevezünk, fontos analitikai módszernek képezi az alapját. Mivel a gerjesztett állapotban levő molekula a gerjesztés során elnyelt energia egy részét még a fluoreszcenciasugárzás kibocsátása előtt elveszti (a molekula alacsonyabb energiájú vibrációs állapotba kerül), a kisugárzott fluoreszcenciafény kisebb energiájú (hosszabb hullámú) mint a gerjesztő fény. Ennek a jelenségnek, valamint analitikai alkalmazásainak részletes tárgyalása meghaladná ennek a könyvnek a kereteit.

2.3. Az abszorbancia és a Lambert—Beer-törvény

A spektrofotometria alaptörvénye összefüggést állapít meg az abszorbeáló oldat által okozott fénygyengítés mértéke, az oldat koncentrációja, ill. rétegvastagsága között. Az egyenlet levezetése céljából végezzük el a következő gondolatkísérletet.

A 2/2. ábrán felülnézetben ábrázolt küvettára, amely az elnyelt anyagot c koncentrációban tartalmazza, bocsássunk falára merőlegesen I_0 intenzitású, monokromatikus, párhuzamos fénysugárnyalábot. A fénysugár keresztülhalad a b hosszúságú küvettán, ahonnan I intenzitással távozik. Gondolatban osszuk fel a b távolságot db elemi rétegekre. Egy-egy rétegen áthaladva a fény intenzitása I_1, I_2, I_3 ... I_{n-1}, I_n értékre csökken. Az egyes rétegeken való áthaladás során a fénygyengülés aránya



2/2. ábra. A Lambert-törvény levezetésének sémája.

b rétegvastagságú küvettán áthaladó fénysugár intenzitásának csökkenése I_0-ról I-re

állandó mértékű:

$$\frac{I_0}{I_1} = \frac{I_1}{I_2} = \frac{I_2}{I_3} = \ldots \frac{I_{n-1}}{I_n} = k. \qquad (2/3)$$

Pl. rétegenként 5%-os fénygyengítés esetén

$$I_1 = 0{,}95 \cdot I_0; \quad I_2 = 0{,}903 \cdot I_0; \quad I_3 = 0{,}857 \cdot I_0 \text{ stb.}$$

Az egy elemi rétegen végbemenő fényintenzitás-csökkenés arányos a rétegre érkező fény intenzitásával és az elemi réteg vastagságával (arányossági tényező a fenti k állandó):

$$-(I_{n-1} - I_n) = -\mathrm{d}I = k \cdot I_{n-1} \cdot \mathrm{d}b\,. \qquad (2/4)$$

Ha arra vonatkozóan akarunk kvantitatív összefüggést megállapítani, mi lesz a viszony a teljes b küvettahosszon való áthaladás során I_0-ról I-re csökkenő fényintenzitások és a küvettahossz között, fel kell írni a (2/4) egyenlet integrált alakját:

$$\int_{I_0}^{I} \frac{\mathrm{d}I}{I} = k \int_0^b \mathrm{d}b\,. \qquad (2/5)$$

Az integrálást elvégezve és a természetes alapú logaritmusról a tízes alapúra áttérve a következő egyenlethez jutunk:

$$\log \frac{I_0}{I} = k' \cdot b\,. \qquad (2/6)$$

Ezt a törvényt, amely szerint egy elnyelő testre merőlegesen ráeső, ill. azon keresztülhaladt monokromatikus fénysugár intenzitásarányának logaritmusa nem függ a beeső fénysugár intenzitásától, viszont egyenesen arányos a test vastagságával, felfedezője, LAMBERT (1760) után Lambert-törvénynek nevezzük (a jelenséget BOUGUER már 1729-ben leírta).

A (2/6) egyenletben k' értékébe már beleolvasztottuk a természetes alapú és a tízes alapú logaritmus átszámítási faktorát, meg kell azonban jegyezni, hogy — amint erre már korábban utaltunk — az egyenlet feltételei között szerepel, hogy oldatok vizsgálata esetén ott az elnyelő anyag c koncentrációja állandó érték. BEER (1852) vizsgálta meg, hogyan függ a fénygyengítés mértéke a koncentrációtól. Ez esetben (állandónak tartva b értékét, a küvettahosszat) teljesen hasonló levezetést írhatunk fel, mint a (2/4) —(2/6) egyenletek esetében azzal a különbséggel, hogy b helyébe c-t helyettesítünk. Ez esetben úgy fogalmazhatunk, hogy az elnyelő anyag koncentrációjának $\mathrm{d}c$ értékkel való megnövelése hatására bekövetkező fényintenzitás-csökkenés arányos a fény intenzitásával és a koncentráció növekedésével.

Ha a koncentrációváltozásra a (2/5) analógiájára felírt differenciálegyenletet 0-tól c-ig integráljuk, a következő egyenletet kapjuk:

$$\log \frac{I_0}{I} = k'' \cdot c\,. \qquad (2/7)$$

Ez a Beer-törvény matematikai kifejezése. Szavakkal kifejezve azt jelenti, hogy állandó rétegvastagság mellett a küvettára ráeső és az azt elhagyó fény intenzitásarányának logaritmusa arányos az oldat koncentrációjával.

Látható tehát, hogy a log I_0/I egyrészről a rétegvastagsággal, másrészről pedig a koncentrációval arányos. Ebből következik, hogy a (2/6) és (2/7) egyenletek összevonhatók a mindkét függést kifejező (2/8) egyenletté, amelynek természetesen új arányossági tényezője *(a)* van:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = a \cdot b \cdot c \,. \qquad (2/8)$$

Ez a spektrofotometria alapegyenlete. Általában Lambert—Beer-törvényként vagy Bouguer—Lambert—Beer (BLB)-törvényként említik a szakirodalomban, mivel azonban a spektrofotometriás gyakorlatban általában csak a koncentrációfüggésnek van jelentősége, gyakran hivatkoznak rá csupán Beer-törvényként is.

Amint látható, a log I_0/I érték alapvető mennyisége a spektrofotometriának, ezért ezt külön elnevezéssel illetjük: abszorbancia *(A)* vagy a régebbi szakirodalomban extinkció *(E)*. A különböző spektrofotométereken az abszorbancia az a mennyiség, ami közvetlenül leolvasható. Az abszorbancia tehát lineáris függvénye a rétegvastagságnak és az elnyelő anyag koncentrációjának, nem függ viszont a besugárzó fény intenzitásától.

Külön kell foglalkozni a (2/8) egyenlet *a* állandójával, ami nem függ a rétegvastagságtól és a koncentrációtól, függ azonban az oldott anyag jellegén kívül a besugárzó fény hullámhosszától. Ha egységnyinek választjuk mind az oldat koncentrációját (1 g/100 ml vagy 1 mól/l), mind pedig rétegvastagságát (1 cm), akkor a (2/8) egyenlet szerint

$$A = a \,. \qquad (2/9)$$

A fentiek szerint *a* értékét kétféleképpen lehet megadni: ha a koncentrációt vegyes százalékban adjuk meg, akkor fajlagos abszorpciós koefficiensről beszélünk; jelzése $A^{1\%}_{1\,cm}$ (a régebbi irodalomban specifikus extinkció — $E^{1\%}_{1\,cm}$), ha pedig mólos koncentrációban, akkor az állandó a moláris abszorpciós koefficiens; jelzése ε (a régebbi irodalomban moláris extinkciós koefficiens).

A kétféle állandó közt az összefüggést a (2/10) egyenlet fejezi ki:

$$\varepsilon = \frac{A^{1\%}_{1\,cm} \cdot M}{10} \,, \qquad (2/10)$$

ahol M a molekulatömeg.

A Lambert—Beer-törvényt kifejező (2/8) egyenlet kulcsot ad kezünkbe a spektrofotometria kvalitatív és kvantitatív alkalmazásához egyaránt. Az egyenletben szereplő adatok közül ui. A mérhető mennyiség, b a küvetta hossza. Ha a fennmaradó két mennyiség közül $A^{1\%}_{1\,cm}$-t ismerjük, az ismeretlen c kiszámítható, vagyis a módszert koncentrációmérésre vagy pl. gyógyszeralapanyagok és kiszerelt készítmények hatóanyag-tartalmának meghatározására használhatjuk fel. Ennek a kérdésnek részleteivel valamint a Lambert—Beer-törvénytől való eltérésekkel a 4. fejezetben foglalkozunk.

Ha a (2/8) egyenletben a koncentrációt ismerjük (tiszta anyagok bemérésével és hígításával), az egyenlet lehetővé teszi $A^{1\%}_{1\,cm}$ vagy ε kiszámítását. Ezek az értékek az abszorpciós sáv maximum helyének hullámhosszán az oldott anyagra jellemző, azok azonosítására sok esetben kiválóan alkalmas fizikai állandónak tekinthetők. E kétféle abszorpciós koefficiens közül ε-t elsősorban a spektroszkópia kvalitatív anali-

tikai, szerkezetkutatási alkalmazása esetén használjuk, míg a kvantitatív analitikai alkalmazásnál főként az $A^{1\%}_{1\,cm}$-t alkalmazzuk.

Megemlítjük még, hogy különösen a régi spektroszkópiai irodalomban gyakran találkozunk a transzmittancia (T) kifejezéssel. Ennek definícióját, ill. összefüggését az abszorbanciával a (2/11) és (2/12) egyenlet tartalmazza:

$$T = \frac{I}{I_0} \tag{2/11}$$

$$A = \log \frac{1}{T}. \tag{2/12}$$

Ma is gyakran használják a transzmittanciában megadott fényáteresztő képességet elsősorban a látható spektrumtartományban, oldatok tisztaságának, ill. színtelenségének jellemzésére. Ilyen esetekben általában a százalékban kifejezett transzmittanciát ($100T$) adják meg követelményként.

2.4. A spektrofotométer főbb részei [3]

2.4.1. Fényforrások

A látható spektrumtartományban való mérés céljaira a fényforrás volfrámszálas izzólámpa. Ennek emissziója a közeli infravörös tartományban mutat maximumot, az emisszió a hullámhossz csökkenésével egyre kisebb lesz; 350 nm alatt már nem használható. Újabban egyre terjed olyan változatának használata, ahol a lámpa köpenyében levő argonhoz bizonyos mennyiségű jódgőzt kevernek (volfrám—halogén lámpa). Ez a megoldás megakadályozza a magas üzemhőmérsékleten az izzószálról elpárolgó volfrám lerakódását a köpeny hideg részeire, s így jelentősen meghosszabbítja a lámpa élettartamát.

Az ultraibolya spektrumtartományban korábban hidrogén, jelenleg szinte kizárólag deutérium kisülési csövet használunk fényforrásként, mivel ez utóbbi fényereje nagyobb és élettartama hosszabb. A mintegy 0,01 bar nyomású deutériummal megtöltött kvarccsőben az elektromos kisülés hatására ionizálódó gáz által emittált fény 375 nm alatt már folytonos spektrumot ad, ezért ez a lámpa a teljes ultraibolya tartományban használható. A látható tartományban már vonalas a színkép: a vonalak közül a 486,02 és 656,10 nm-nél megjelenő intenzív vonalak kiválóan alkalmasak a spektrofotométer hullámhossz-skálájának kalibrálására.

A teljes ultraibolya-látható tartományban dolgozó műszerek mindkét lámpával fel vannak szerelve: az egyik lámpáról a másikra való áttérés egyszerű átkapcsolással történik.

Megjegyzendő, hogy az igen nagy fényerejű xenon kisülési cső mind az ultraibolya, mind pedig a látható tartományban alkalmas fényforrás lenne. Viszonylag kis élettartama, nagy hőleadása és ózonkibocsátása miatt azonban csak olyan esetekben használják, amikor a nagy fényerőre valóban szükség van: erősen abszorbeáló oldatok

fényelnyelés-különbségének mérése, valamint elsősorban a fluorimetriás analízis.* A fenti problémák pulzáló fénykibocsátással rendelkező kisnyomású xenonlámpák bevezetésével csökkenthetők.

2.4.2. Monokromátorok

A spektrofotometriás mérésekhez (a későbbiekben tárgyalandó diódasoros készülékek kivételével) monokromatikus, ill. azt megközelítő, a lehetőség szerinti legszűkebb hullámhossztartományra korlátozódó sávszélességű fényre van szükségünk. Ennek előállítására a legegyszerűbb lehetőség vonalas emisszióval rendelkező fényforrás használata lenne, ennek gyakorlati alkalmazási lehetőségei azonban természetesen igen korlátozottak lennének. Megjegyzendő, hogy a nagynyomású folyadékkromatográfiában detektorként alkalmazott ultraibolya spektrofotométerekben igen kiterjedten használják fényforrásként a higanygőzlámpát. Ennek nagy intenzitású 253,7 nm-es vonala kiválóan alkalmas a szerves vegyületek többségének megfelelő érzékenységű detektálására. Ebben az esetben a monokromatikus fény előállításához természetesen nincs szükség monokromátorra: csupán a többi higanyvonalnak megfelelő hullámhosszúságú sugárzást kell megfelelő szűrő alkalmazásával eltávolítani a sugárnyalábból.

Megfelelő szűrők alkalmazásával a folytonos látható sugárzást kibocsátó fényforrások fényéből is ki lehet emelni egy-egy többé-kevésbé szűk hullámhossztartományt (a többi hullámhosszú fényt a szűrő elnyeli). Ha erre a célra a meghatározandó anyag abszorpciós maximumának megfelelő hullámhosszúságú fény komplementerével jellemezhető, különböző színű üvegeket használunk, a sávszélesség meglehetősen nagy, a szűrő fényáteresztő képessége pedig még a maximumhelyen is csekély. Jobb hatásfokot és szűkebb hullámhossztartományt (15—20 nm félértékszélesség) lehet elérni interferenciaszűrők alkalmazásával. Szűrőkkel vannak ellátva a kisebb igényű, színes anyagok, ill. származékok sorozatelemzésére szolgáló fotométerek. Az adott színű termék mérésére legalkalmasabb szűrőt vagy a termék abszorpciós spektrumának és a szűrők névleges hullámhosszértékének ismeretében, vagy empirikus úton választjuk ki.

Spektrumok felvétele, valamint nagyobb igényű kvantitatív mérés csupán spektrofotométerrel hajtható végre; itt a mérés során felhasznált fényt monokromátorral állítjuk elő. A kevert fényű fényforrás sugárnyalábja a monokromátor belépő résére esik. A rés előtt vagy után tükör vagy lencse segítségével párhuzamosított sugárnyaláb a diszperziós elemre jutva a hullámhossztól függő mértékű eltérítést szenved. Az eltérített fényt a monokromátor kilépő résére képezzük le. Az így nyert, a monokromatikust többé-kevésbé megközelítő fényt használjuk fel a spektrofotometriás mérésnél.

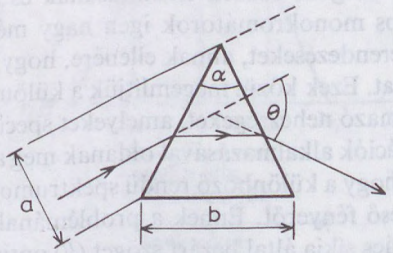
* Amint az a (2/8) egyenletből látható, a spektrofotometriában az abszorbancia nem függ a besugárzó fény intenzitásától, szemben a fluorimetriával, ahol fluoreszcenciafény intenzitása a gerjesztő fény intenzitásának lineáris függvénye, tehát az utóbbi növelése a mérés érzékenysége növelésének egyik fontos módszere.

Diszperziós elemként prizmát vagy optikai rácsot használunk. A prizmás monokromátor működése azon alapul, hogy a prizma anyagának (üveg, ill. kvarc) törésmutatója (n) a hullámhossz függvénye. A prizma diszperziója (a 2/3. ábrán látható Θ eltérítési szög változásának a hullámhossz szerinti differenciálhányadosa) a monokromátor geometriáján kívül a törésmutató diszperziójától ($dn/d\lambda$) függ:

$$\frac{d\Theta}{d\lambda} = \frac{b}{a} \cdot \frac{dn}{d}, \qquad (2/13)$$

ahol b a prizma bázishossza, a pedig a beeső sugárnyaláb átmérője.

A törésmutató diszperziója nem állandó érték, hanem csökken a hullámhossz növekedésével. Ezért a prizmás monokromátor felbontása igen jó a rövidhullámú ultraibolya tartományban, de gyenge a hosszúhullámú látható tartományban. (Ennek következménye a 2/6. ábrán látható.)



2/3. ábra. A prizma mint diszperziós elem.

α: törőszög, Θ: eltérítés szöge, a: a beeső sugárnyaláb átmérője, b: a prizma bázishossza

A leírtak jelentős hátrányt jelentenek a prizma mint diszperziós elem használatánál. Már önmagában az is kényelmetlen, hogy a diszperzió változik a hullámhosszal (a rövidebb hullámhosszaktól a hosszabbak felé haladva a hullámhosszskálán, egyre sűrűsödnek a beosztások), ehhez járul még az is, hogy a hosszúhullámú ultraibolya és a látható tartományban a felbontás lényegesen rosszabb, mint az optikai rácsot tartalmazó monokromátoroknál. Ez, valamint a diszperzió hőmérséklet-függése az oka annak, hogy lassan teljesen kiszorulnak a használatból a prizmás monokromátorok. Annak ellenére, hogy lényegesen drágábbak a prizmáknál, a legtöbb modern készülékben a monokromátor diszperziós eleme az optikai rács.

A spektrofotométerek monokromátoraiban használatos rácsok valamennyi esetben reflexiós üzemmódban dolgoznak. A rács egy simára polírozott üveglap, amelyre nagyszámú párhuzamos, egymástól egyenlő távolságra levő barázdát karcolnak (100—2500 barázda/mm). Az optikai rácsok tömeggyártása során a barázdált rácsot a hanglemezgyártás technológiájához hasonlóan másolással állítják elő. Az így nyert felületet vékony alumíniumréteggel fedik be. Az erről a felületről visszavert fény diffrakciót szenved, és ennek következtében első-, második- stb. rendű spektrumok alakjában többszörösen tartalmazza a teljes spektrumot.

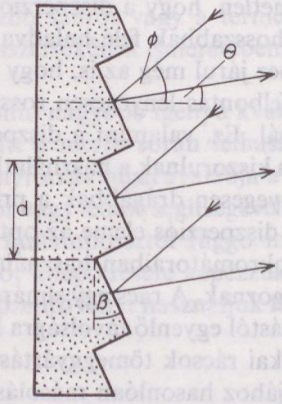
Akárcsak a prizma esetében (lásd a 2/13 egyenlet) itt is felírható a diszperzió képlete:

$$\frac{d\Theta}{d\lambda} = \frac{m}{d\cos\Theta} \sim \frac{m}{d}, \qquad (2/14)$$

ahol m a spektrum rendje (1, 2, 3 stb.), d pedig két szomszédos barázda távolsága. Az utóbbitól való fordított arányú függés azt jelenti, hogy a felbontás arányosan nő a milliméterenként felkarcolt barázdák számával, ugyanakkor viszont nem függ a rács anyagától. A cos Θ-t azért lehetett elhanyagolni, mivel az eltérítés szöge általában az egységtől csak kismértékben eltérő érték (pl. cos 10° = 0,985). Ebben az egyszerűsített formájában a (2/14) egyenlet kifejezi azt a fontos tényt, hogy — szemben a prizmánál megismertekkel — az optikai rács diszperziója független a hullámhossztól: amint az a 2/6. ábrán látható, gyakorlatilag állandó érték a teljes spektrum mentén.

A rácskészítés technológiája az utóbbi időben sokat fejlődött (holografikus, ionsugárral barázdált rácsok), így ma már nincs akadálya az igen széles tartományban igen jó és állandó felbontással dolgozó rácsok előállításának és alkalmazásának. Ennek köszönhető, hogy a rácsos monokromátorok igen nagy mértékben kiszorították a használatból a prizmás berendezéseket, annak ellenére, hogy a rácsok alkalmazása is felvet speciális problémákat. Ezek közül megemlítjük a különböző rendű spektrumok részleges átfedéséből származó nehézségeket, amelyeket speciális szűrő, második rács vagy rács-prizma kombinációk alkalmazásával oldanak meg a gyakorlatban. A másik probléma ott jelentkezik, hogy a különböző rendű spektrumok közt megoszló energia csökkenti az egy rendre eső fényerőt. Ennek a problémának megoldása céljából az egyes barázdák fala és a rács síkja által bezárt szöget (β) optimális értékűnek választják meg: ezzel elérhető, hogy pl. az összes energia 70%-a az első rendben reflektálódjék (2/4. ábra).

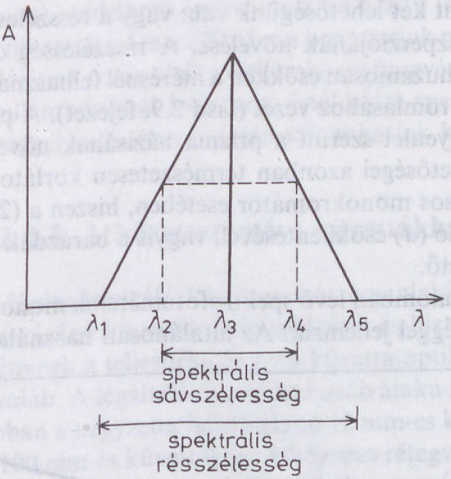
A monokromátorokat elsősorban az azt elhagyó fény spektrális tisztasága alapján értékeljük. Ezzel azt jellemezzük, mennyire közelíti meg a kilépő résen át távozó fény



2/4. ábra. A rács mint diszperziós elem.

Φ: beesési szög, Θ: visszaverődési szög, d: két barázda távolsága, β: barázda falának és a rács síkjának szöge

a monokromatikust. Ezt a belépő és kilépő rés szélessége és a monokromátor diszperziós sajátságai határozzák meg. Ha a kilépő résen távozó fénynyaláb spektrális eloszlását vizsgáljuk, igen kis résszélesség esetén a 2/5. ábrán feltüntetett idealizált háromszöghöz jutunk, ahol az egyes hullámhosszakhoz tartozó sugárzás intenzitását ábrázoltuk a hullámhossz függvényében. Ilyen szimmetrikus eloszlást akkor kapunk, ha a teljes spektrum mentén azonos diszperziójú ráccsal dolgozunk, valamint a be- és kilépő rést azonos szélességűre nyitjuk.



2/5. ábra. A spektrális sávszélesség sematikus ábrázolása

A maximális intenzitáshoz tartozó hullámhossz (λ_3) olvasható le a spektrofotométer hullámhosszskáláján, λ_1 jellemzi a kilépő résen át távozó legrövidebb, λ_5 pedig a leghosszabb hullámhosszú fényt, míg a csúcsintenzitás feléhez tartozó hullámhosszak különbsége ($\lambda_4 - \lambda_2$) a monokromátor spektrális sávszélessége. ($\lambda_5 - \lambda_1$)-et gyakran spektrális résszélességnek nevezik (ezt nm-ben adják meg szemben a mm-ben megadott mechanikus résszélességgel). A 2/5. ábrán leolvasható elemi geometriai összefüggés alapján belátható, hogy a spektrális sávszélesség által meghatározott energia ebben az ideális esetben a résen távozó összes energia 75%-a. A gyakorlatban — reális résszélesség esetén — háromszög helyett inkább trapéz közelíti meg az energia eloszlását, a fenti meggondolások azonban lényegében erre az esetre is érvényesek.

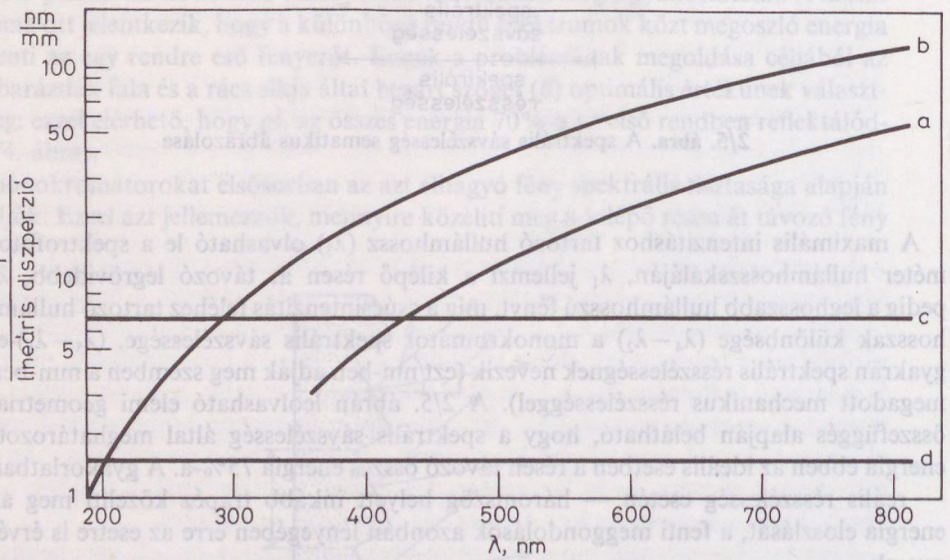
A spektrális sávszélességet a mechanikai résszélesség és a diszperziós elem lineáris diszperziója reciprokának szorzata adja meg. Az ezt kifejező (2/15) egyenlet átalakított formája a (2/13) és (2/14) egyenletekben már bevezetett szögdiszperziót tartalmazza:

$$\lambda_4 - \lambda_2 = \Delta\lambda = w \cdot \frac{\mathrm{d}\lambda}{\mathrm{d}s} = \frac{w}{f} \cdot \frac{\mathrm{d}\lambda}{\mathrm{d}\Theta}, \qquad (2/15)$$

ahol w a mechanikus résszélesség, $ds/d\lambda$ a lineáris diszperzió*, f pedig a diszperziós elemről távozó fényt a kilépő résre leképező lencse, ill. konkáv tükör fókusztávolsága.

A spektrális sávszélességgel jellemezhető spektrális tisztaságnak nagy jelentősége van spektrumok felvételénél, ill. mennyiségi méréseknél. Amint erre a 2.9. és 2.11. fejezetekben részletesen rámutatunk, túlságosan nagy spektrális sávszélességgel elvégzett mérések esetén torzult alakú spektrumot kaphatunk, ill. eltérések mutatkoznak a Beer-törvénytől. Mivel a monokromátor felbontóképessége, $d\Theta/d\lambda$ is közvetlenül összefügg a spektrális sávszélességgel $(\lambda_4 - \lambda_2)$, megállapíthatjuk, hogy mindenképpen az az előnyös, ha a méréseket kis spektrális sávszélesség mellett végezzük el. Erre a (2/15) egyenlet szerint két lehetőségünk van: vagy a résszélesség csökkentése, vagy a diszperziós elem diszperziójának növelése. A résszélesség csökkentésének határt szab az, hogy ezzel párhuzamosan csökken a mérésnél felhasznált energia mennyisége, s ez a jel—zaj viszony romlásához vezet (lásd 2.9. fejezet). A prizma diszperziójának növelésére a (2/13) egyenlet szerint a prizma bázisának növelése ad lehetőséget, a méret növelésének lehetőségei azonban természetesen korlátozottak. Ilyen mértékű korlátozás nincs a rácsos monokromátor esetében, hiszen a (2/14) egyenlet szerint a diszperzió a rácsállandó (d) csökkentésével, vagyis a barázdák sűrűségének növelésével arányosan növelhető.

A kereskedelmi forgalomban levő spektrofotométerek monokromátorait általában a spektrális sávszélességgel jellemzik. Az általánosan használatos rácsos készülékek



2/6. ábra. Különböző monokromátorok lineáris diszperziójának reciproka a hullámhossz függvényében.

a) Üvegprizmás monokromátor (Opton M4 G II); *b)* Kvarcprizmás monokromátor (Opton M4 Q III); *c)* Rácsos monokromátor (600 barázda/mm); *d)* Rácsos monokromátor (1200 barázda/mm)

* A lineáris diszperzió $ds/d\lambda$ kifejezésében ds a $d\lambda$ hullámhosszkülönbséggel jellemezhető két fénysugárnak a kilépő rés síkjára való leképezése után mért távolsága.

esetén ez állandó résszélesség mellett természetesen a teljes spektrumtartományban állandó. A forgalomban levő készülékek egy részénél a spektrális sávszélesség bizonyos határok között, tetszés szerint állítható, igen gyakran azonban meghatározott érték. Így pl. kisebb igényű, olcsóbb, csak kvantitatív analízisre használt készülékek esetén pl. 4 vagy 5 nm. Számos készülék esetén több érték állítható be, pl. 0,25, 1, 2, 4 nm. 1 nm-es spektrális sávszélességgel dolgozó készülék a legkényesebb gyógyszeranalitikai feladatok túlnyomó többségének megoldására, kitűnő minőségű spektrumok felvételére alkalmas. Ennél nagyobb felbontásra csak olyan esetekben van szükség, amilyenek a gyógyszer-analitikai és szerkezetkutatási gyakorlatban csak ritkán fordulnak elő (finomszerkezettel rendelkező spektrumok gőzfázisú felvétele stb.).

A fejezetben leírtak illusztrálására a 2/6. ábrán bemutatjuk néhány monokromátortípus lineáris diszperziójának reciprokát a hullámhossz függvényében. A (2/15) egyenlet szerint az adott hullámhossznál leolvasott értékből a spektrális sávszélességet a mechanikus résszélességgel való szorzás útján számíthatjuk ki.

2.4.3. A küvettatartó a küvettákkal

A küvetták befogadására szolgáló küvettatartót úgy alakítják ki, hogy alkalmas legyen különböző hosszúságú küvetták befogadására, és biztosítva legyen annak az igen fontos követelménynek a teljesítése, hogy a küvetta optikai felületére merőlegesen essen rá a sugárnyaláb. A legáltalánosabban hasáb alakú küvettákat használnak, közülük is leggyakrabban a négyzetes hasáb alakú 10 mm-es küvettát, de használatosak 1, 2, 5, 20, 40 sőt 100 mm-es küvetták is. A közepes rétegvastagságú küvettáknak használatosak mikro változatai is, amelyek feltöltéséhez csupán néhány tized ml oldat szükséges.

Mivel a Lambert-törvény szerint (2/6 egyenlet) az abszorbancia arányos a rétegvastagsággal, pontos és reprodukálható eredmények elérése céljából igen fontos, hogy a rétegvastagság valóban a deklarált érték legyen. 10 mm-es precíziós küvetták esetén ezt a gyártók 0,1%-os pontossággal garantálják. Kisebb rétegvastagságú küvetták esetén ez a pontosság csökken: ilyen küvetták alkalmazását a kvantitatív analízisben lehetőség szerint célszerű elkerülni.

Az ultraibolya-látható spektrofotometriában használatos küvetták üvegből vagy kvarcból készülnek. A kvarcküvetta a teljes spektrumtartományban használható. Természetes kvarcból készült küvetták kb. 210 nm-ig használhatók, a felhasználhatósági határ kb. 190 nm-ig csökkenthető tisztított (szerves szilíciumvegyületek hőbontásával előállított) kvarcból készített küvetta alkalmazásával. A látható tartományban a lényegesen olcsóbb üvegküvetták is használhatók kb. 330 nm-ig (ill. speciális optikai üvegküvetta esetén 310 nm-ig). Lényegében hasonló spektrumtartományban használhatók kisebb igényű vizsgálatokra a használat után eldobható műanyag küvetták.

Hogy az oldószergőzöknek a készülék belsejébe való bejutását, ill. a mérendő oldat bepárolódását megakadályozzuk, a küvettákat csiszolatos dugóval vagy legalább fedővel látják el.

A küvettaházat úgy képezik ki, hogy lehetőséget nyújtson több oldat gyors egymásutánban történő mérésére. Ezt kétféleképpen lehet elérni. 1: a küvettatartót úgy

képezik ki, hogy egy kar kihúzásával vagy automatizált vezérléssel több (általában három) küvettát lehessen egymás után a fénysugár útjába húzni. 2: korszerű készülékekben speciálisan kialakított küvetták lehetővé teszik a megvizsgált oldat kiürítését, a küvetta átöblítését és új oldattal való feltöltését anélkül, hogy azt a készülékből ki kellene venni.

Végül megjegyezzük, hogy a spektrofotometria számos gyakorlati alkalmazása esetén, mint pl. tabletták kioldódási vizsgálata (9.3. fejezet), automata elemzők alkalmazása (9.10. fejezet) és nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiás detektorként való alkalmazása esetén (5.3. fejezet) átfolyó küvettát alkalmazunk.

Drágább készülékek küvettaházának tartozékai közé tartozik a küvettatartó állandó hőmérsékleten tartását, hűtését, ill. fűtését lehetővé tevő egység.

2.4.4. Detektorok

Amint az a (2/8) egyenletből látható, az abszorbancia mérése fényintenzitások mérésére vezethető vissza. A fényintenzitások mérését a legegyszerűbben és legpontosabban elektromos jellé való átalakítás útján végezhetjük el. Az erre a célra szolgáló fotocella nagy feszültség alá helyezett evakuált cső, amelyben a katód olyan anyagokkal van bevonva, amelyek a megvilágítás hatására elektronokat bocsátanak ki, s ezek az anódra vándorolva a megvilágítás intenzitásával arányos intenzitású elektromos áramot hoznak létre, amely megfelelő erősítés után mérhető. Az ultraibolya tartományban, ill. a látható tartományban 620 nm-ig általában cézium-antimonid bevonattal ellátott ún. kékérzékeny cellát, magasabb hullámhosszon pedig a vörösérzékeny cézium-oxid cellát használják.

A fotoáram elektronikus erősítése természetesen a zajokat is felerősíti, így ez csak bizonyos határok közt alkalmazható. Ennek következtében a vákuum fotocella nem alkalmas igen kis fényintenzitások, ill. intenzitáskülönbségek mérésére, tehát alkalmazása esetén nagyobb spektrális sávszélességgel kell dolgozni, ami a spektrális tisztaságot rontja. Ezért fotocellát ma már csak szerényebb igényű, olcsó készülékekben használnak.

Az alkalmazásban levő spektrofotométerek döntő többségében ún. elektronsokszorozót használnak detektorként. Tulajdonképpen ez is egy speciálisan kialakított vákuumfotocella, alkalmazásával azonban sokkal nagyobb érzékenység, és így jobb spektrális tisztaság érhető el, mint a közönséges fotocellákkal. Ezt úgy érik el, hogy a fény által a fotokatódon szabaddá tett elektronok nem kerülnek közvetlenül az anódra, hanem az ún. dinódára, ahol becsapódásuk során nagyszámú szekunder elektront tesznek szabaddá. A megerősödött elektronáram újabb, egyre pozitívabb feszültség alatt álló felületekre ütközve tovább erősödik. A vákuumcsőbe megfelelő geometriával beépített és megfelelő feszültséggrádienssel ellátott 10 ilyen egység segítségével akár 10^6-szoros erősítés érhető el, ami kiválóan alkalmassá teszi az elektronsokszorozós detektorokat kis fényintenzitások és intenzitáskülönbségek detektálására igen jó spektrális tisztaság mellett.

Az utóbbi időben ismét terjed a teljes ultraibolya-látható tartományban (az elektronsokszorozónál szerényebb érzékenységgel) használható szilíciumcella alkalmazá-

sa, amelynek működése a félvezető szilícium elektromos vezetőképességének a megvilágítás hatására bekövetkező és azzal arányos megnövekedésén alapul.

A félvezető fotodiódák új alkalmazási területre találtak az alig tíz éve bevezetett ún. diódasor (diode-array) detektorban. Ezek könnyű miniatürizálhatóságát kihasználva az ilyen spektrofotométerek detektorában több száz ilyen kis cella van elhelyezve olyan módon, hogy azokat az optikai rács által felbontott fény útjába az ultraibolya tartományban pl. nm-enként, a láthatóban pedig pl. 2 nm-enként helyezzük el. Minden diódához egy kis — alapállapotban feltöltött — kondenzátor tartozik. Ez a diódára eső fény hatására annak intenzitásával arányos mértékben kisül. A kondenzátor nagy frekvenciával, szakaszosan történő újratöltéséhez szükséges árammennyiség folyamatosan mérhető, s ez megteremti az alapjait az abszorpciós spektrum folyamatosan, valamennyi hullámhosszon egyidejűleg történő regisztrálásának. Az ennek az elvnek alapján felépített spektrofotométert a 39. oldalon ismertetjük.

2.4.5. Kijelzők

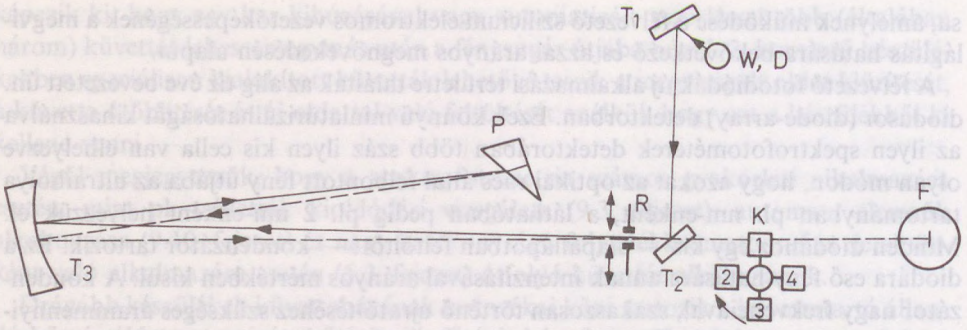
A detektorban nyert elektromos jelet a detektor típusától függő mértékben, de mindenképpen elektronikus erősítésnek kell alávetni. A nullműszeres spektrofotométerek, ahol a fotoáramot egy külső áramforrásról vett feszültséggel kompenzálták oly módon, hogy a potenciométerdobot kalibrálták abszorbanciaegységekre, ma már nehézkes kezelésük miatt kiszorulnak a gyakorlatból. A korszerű készülékek direkt abszorbancia leolvasást lehetővé tevő digitális kijelzővel épülnek fel, sőt a mikrokomputerrel összekapcsolt készülékek esetén az abszorbanciaértékeket kinyomtatva is megkaphatjuk.

A spektrumok közvetlen regisztrálására szolgáló kijelzőket a 2.6. fejezetben tárgyaljuk.

2.5. Egysugármenetes spektrofotométerek

Az abszorbancia mérésére szolgáló spektrofotométerek közül a történeti fejlődés során (amint azt már az 1.1. fejezetben is említettük) a Beckman DU készülék volt az első, úttörő jellegű, széles körben elterjedt műszer. Alapvető optikai rendszere számos, mind a mai napig használatban levő készülék felépítésének alapjául szolgált. A Beckman típusú egysugármenetes spektrofotométer működési elvét a Magyarországon nagymértékben elterjedt Spektromom műszercsalád (Magyar Optikai Művek) példáján mutatjuk be (Spektromom 201—204, ill. 195) (2/7. ábra).

Fényforrásként a *W*, ill. *D* jelzésű volfrám-, ill. deutériumlámpa szolgál; a vizsgálathoz szükséges lámpát egy kar kihúzásával, ill. betolásával állítjuk az optikai fényútba. A lámpa fényét T_1 homorú tükör segítségével párhuzamosítjuk, a T_2 síktükör segítségével az állítható szélességű belépő résre vetítjük (ami egyben kilépő résként is szolgál). A résen áthaladt fénysugarat a T_3 jelzésű homorú tükör vetíti a kvarcprizmára, amelyet a készülék hullámhosszbeállító gombjával forgathatunk. A kvarcprizma ún. Littrow-elrendezésű prizma. Ez azt jelenti, hogy a felbontás szempontjából



2/7. ábra. Spektromom 195 spektrofotométer optikai sémája (a magyarázatot lásd a szövegben)

optimális 60°-os törőszöget úgy hozzuk létre, hogy a 30°-os törőszögű prizmának túlsó felületét alumíniumréteggel vonjuk be, ahonnan a fény visszaverődik és ismét diszperziót szenved. Ennek az elrendezésnek előnye nemcsak a prizma kétszeres kihasználása, hanem az optikailag aktív kvarc kettős töréséből származó hibalehetőséget is kiküszöböljük. A fény tehát visszajut a T_3 tükörre, amely azt a kilépő résként is szolgáló R résre fókuszálja. Az innen kilépő fénysugár egy kvarclencsén, valamint egy, a szórt fény eltávolítását szolgáló szűrőn keresztül a küvettára vetítődik, majd innen végezetül a kék-, ill. vörösérzékeny fotocellára. Az összehasonlító és a mérendő oldatot tartalmazó küvettákat sorban húzzuk a fényútba. A 201—204 műszerek abszorbancia leolvasása nullműszer segítségével, a 195D készüléké pedig digitális kijelzéssel történik.

A használatban levő egysugármenetes készülékek között számos szűrős fotométert is használnak. A spektrofotométerek zömének rácsos monokromátora és elektronsokszorozós detektora van. Mivel ez idő szerint az egysugármenetes készülékeket már elsősorban nem spektrumok felvételére konstruálják, hanem kvantitatív mérések céljaira, monokromátorjuk felbontása általában nem különösebben jó (spektrális sávszélesség 2—5 nm), és az igényesebb készülékek különleges szolgáltatásai is elsősorban a gyors és pontos kvantitatív mérés céljait szolgálják (automata küvettaváltók, ürítők és újratöltők, az abszorbanciákat, ill. az abból számolható koncentrációkat tároló, ill. kinyomtató egység stb.)

Bár a 2.5. és 2.6. fejezetekben leírtak alapján az egysugármenetes készülékeket elsősorban abszorbancia mérésére használják és a spektrumok felvételét kétsugármenetes készülékekkel végzik el, a komputertechnika fejlődése lehetővé tette egysugármenetes spektrofotométerek felhasználását is erre a célra. A Beckman cég által bevezetett „stable beam" technika lényege az, hogy a különlegesen kialakított egysugármenetes készülékkel vesszük fel a vizsgálandó oldat, valamint az összehasonlító oldat spektrumait. Ez utóbbi, komputerben tárolt spektrumot az előbbiből kivonva jutunk el a spektrumhoz. A módszer előnyei a készülék optikai és mechanikai részének egyszerűsége, ami a kisebb számú optikai elem következtében a fényveszteségek csökkenését is eredményezi. Csökkenti a hibalehetőségeket az is, hogy a két oldat mérésére ugyanazt a küvettát használhatjuk.

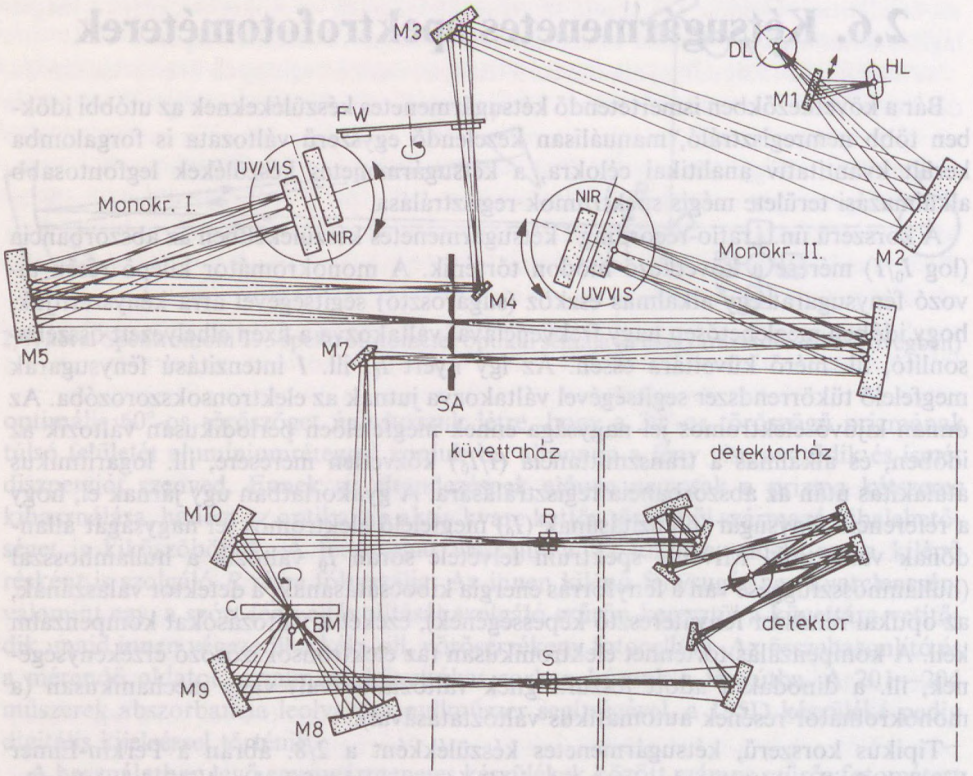
2.6. Kétsugármenetes spektrofotométerek

Bár a következőkben ismertetendő kétsugármenetes készülékeknek az utóbbi időkben több nemregisztráló, manuálisan kezelendő egyszerű változata is forgalomba került kvantitatív analitikai célokra, a kétsugármenetes készülékek legfontosabb alkalmazási területe mégis spektrumok regisztrálása.

A korszerű ún. „ratio-recording" kétsugármenetes készülékekben az abszorbancia ($\log I_0/I$) mérése a következő módon történik. A monokromátor kilépő résén távozó fénysugarat egy alkalmas eszköz (sugárosztó) segítségével arra kényszerítjük, hogy időben meglehetősen nagy frekvenciával váltakozva a fixen elhelyezett összehasonlító, ill. mérő küvettára essen. Az így nyert I_0, ill. I intenzitású fénysugarak megfelelő tükörrendszer segítségével váltakozva jutnak az elektronsokszorozóba. Az onnan kijövő elektromos jel nagysága ennek megfelelően periodikusan változik az időben, és alkalmas a transzmittancia (I/I_0) közvetlen mérésére, ill. logaritmikus átalakítás után az abszorbancia regisztrálására. A gyakorlatban úgy járnak el, hogy a referencia fénysugár intenzitásának (I_0) megfelelő elektromos jel nagyságát állandónak választjuk. Mivel a spektrum felvétele során I_0 változik a hullámhosszal (hullámhosszfüggése van a fényforrás energia kibocsátásának, a detektor válaszának, az optikai rendszer fényáteresztő képességének), ezeket a változásokat kompenzálni kell. A kompenzálás történhet elektronikusan (az elektronsokszorozó érzékenységének, ill. a dinódákra adott feszültségnek változtatásával) vagy mechanikusan (a monokromátor résének automatikus változtatásával).

Tipikus korszerű, kétsugármenetes készülékként a 2/8. ábrán a Perkin-Elmer Lambda 9, ill. az attól csak a komputerizáltság magasabb fokában különböző Lambda 19 készüléket [6] mutatjuk be.

Fényforrásként deutérium (DL), ill. halogén-volfrám (HL) lámpát használunk. Ezek fixen vannak elhelyezve. Ha a látható (ill. közeli infravörös — NIR) tartományban dolgozunk, a *HL* lámpa fényét az *M*1 tükör vetíti az *M*2 tükörre s egyben elzárja a *DL* lámpa fénysugarát. Ha az ultraibolya tartományban dolgozunk, az *ML* tükör felemelkedik és a *DL* lámpa fénye közvetlenül esik az *M*2 tükörre. Innen a fénysugár az *M*3 tükör közvetítésével esik az *M*4 majd onnan az *M*5 kollimátor tükörre. Az előbbi kettő közé van beépítve az *FW* tárcsás szűrőrendszer. Ennek automatikus forgatásával az éppen vizsgált spektrumtartománynak megfelelő szűrőn való áthaladásra kényszerítjük a fénysugarat, és így elérjük, hogy az *SA* belépő résen keresztül az *M*5 tükör közvetítésével a Monochrom I jelzésű monokromátorra már előszűrt fénysugár esik. A monokromátorban külön (holografikus) rács van az ultraibolyalátható tartomány számára (1440 barázda/mm) és egy másik rács a NIR tartomány számára (360 barázda/mm). A monokromátor Littrow elrendezésű, ami ez esetben azt jelenti, hogy a fénysugár a rácsról visszajut az *M*5 kollimátor tükörre, majd onnan a kilépő résre. Ez utóbbi egyben az elsővel azonos monokromátor (Monochr. II) belépő réseként is szolgál. (Meg kell jegyezni, hogy a felbontás javítását és a szórt fény csökkentését célzó második monokromátort csak a nagyobb igényű készülékekbe építik be: számos kitűnő rutinkészülék van forgalomban egy monokromátorral.) A két monokromátor rácsainak egymással szinkronizált elforgatása biztosítja, hogy a



2/8. ábra. Perkin-Elmer Lambda-19 spektrofotométer optikai sémája (a magyarázatot lásd a szövegben) [6]

kilépő résen át távozó fény magas fokon monokromatikus legyen. A többszörös funkciójú *SA* résegységben a rések automatikus állítása biztosítja, hogy a detektorra a spektrum felvétele során állandó energia jusson.

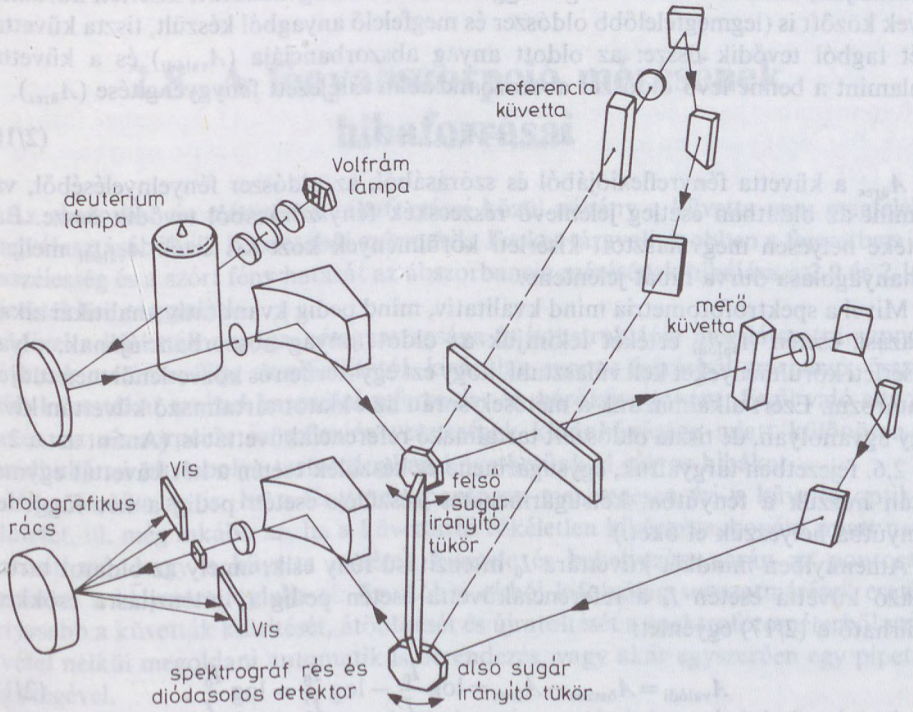
A második monokromátor kilépő réséről a monokromatikus fénysugár az *M*7 és *M*8 (toroid) tükör közvetítésével jut a *C* jelzésű fényosztóra. Ez egy motor által forgatott korong, ahol üres, ablakszerű, tükörrel fedett és a fénysugár útját lezáró (sötét) szegmensek követik egymást. Amikor az ablak szegmens kerül a fénysugár útjába, az azon áthaladva az *M*10 tükör közvetítésével az *R* referenciaküvettára esik. Amikor a fénysugár a tükör szegmensnek ütközik, akkor ez a tükör az *M*9 tükörre vetíti azt, ahonnan a fénysugár az *S* jelzésű mérőküvettára jut. A sötét szegmens minden fényt elnyel: ez úton nyerhető a sötétáram jele. A fényosztó forgási sebessége által meghatározott frekvenciával váltakozva esik a fény a referencia- és a mérőküvettára és onnan az ábrán látható tükörrendszer segítségével a detektorra, ami az ultraibolya-látható tartományban elektronsokszorozó, a NIR tartományban pedig ólom-szulfid cella.

A készülék — csakúgy mint a maga kategóriájában forgalomban levő számos más készülék is — messzemenően kihasználja a mikrokomputer—mikroprocesszoros

technológiából adódó előnyöket. Az említett szerkezeti elemek közül a lámpaátkapcsoló, a rés, a hullámhosszskálát meghatározó rácsok és a fényosztó mozgatása automatikusan történik. Megfelelő programok alkalmazásával a készülék elvégzi pl. saját hullámhosszskálájának kalibrálását a 656,1 nm-es deutérium vonalra, az alapvonal-eltolódás korrigálását a sugárosztó „tükrös" és „üres" szektorai közé beiktatott „sötét" szektorok segítségével stb. A spektrumok regisztrálását vagy a készülék beépített írószerkezetével közvetlenül, vagy pedig a komputer képernyőjén valamenynyi felvételi paraméterrel együtt történő megjelenítés után sornyomtató segítségével végezhetjük el. Számos egyéb számítástechnikai feladat elvégzése mellett a készülék megfelelő standardok alkalmazása esetén elvégzi az abszorbancia-, ill. koncentrációskála kalibrálását és ha szükséges, korrigálását is, képes derivált spektrumok felvételére is.

A forgalomban levő regisztráló spektrofotométerek túlnyomó többsége csupán a monokromátor geometriájában és felbontásában, valamint az automatizáltság és komputerizáltság fokában különbözik az ismertetett műszertől. A következőkben röviden ismertetendő Hewlett-Packard 8452 spektrofotométer „fordított" optikai rendszerével teljesen új, számos előnnyel rendelkező mérési elvet valósít meg [5].

Amint az a 2/9. ábrán látható, a fényforrások fénye monokromátorok alkalmazása nélkül kevert formában kerül a referencia-, ill. mérőküvettára. A sugárosztó ez



2/9. ábra. Hewlett-Packard 8452 spektrofotométer optikai sémája (a magyarázatot lásd a szövegben) [5]

esetben egy rezgő tükörpár, amely közül a felső tükör a rezgés során a fénysugarat váltakozva vetíti a két küvetta valamelyikére. (A hűtő ventillátor mellett ez a rezgő tükör a készülék egyetlen mozgó alkatrésze!) A küvettákon áthaladt fénysugarakat egy-egy tükörrendszer a sugárosztó rezgő tükörpárja közül az alsóra vetíti, ahonnan azok váltakozva esnek a holografikus rácsra. Az itt felbontott fény kerül a 35. oldalon ismertetett 316 mikrodiódából álló diódasor detektorra. Mivel ily módon egyszerre detektáljuk az egész spektrumot, a regisztrálás sebességét csupán az adatoknak a komputer által történő összegyűjtése és feldolgozása határozza meg. Így a spektrumnak a képernyőn való megjelenítése 1 másodpercnél rövidebb idő alatt elvégezhető. Ennek a nagy sebességnek különösen akkor van nagy jelentősége, ha átfolyó cella alkalmazásával a készüléket nagynyomású folyadékkromatográfiás (lásd 5.3. fejezet) vagy FIA (lásd 9.10. fejezet) detektorként használjuk, de sikerrel alkalmazható a diódasoros készülék minden olyan esetben, amikor a nagy felvételi sebesség és a spektrofotométer magas komputerizáltsági foka előnyös lehet [16].

2.7. A fényabszorpció mérése

Ha egy küvettába töltött oldat abszorbanciáját a 2/2. ábra és a (2/8) egyenlet szerint definiáljuk, az abszorbancia még a leggondosabban megválasztott kísérleti körülmények között is (legmegfelelőbb oldószer és megfelelő anyagból készült, tiszta küvetta) két tagból tevődik össze: az oldott anyag abszorbanciája ($A_{\text{valódi}}$) és a küvetta, valamint a benne levő oldószer abszorbanciában kifejezett fénygyengítése ($A_{\text{üres}}$).

$$A_{\text{összes}} = A_{\text{valódi}} + A_{\text{üres}} \qquad (2/16)$$

$A_{\text{üres}}$ a küvetta fényreflexiójából és szórásából, az oldószer fényelnyeléséből, valamint az oldatban esetleg jelenlevő részecskék fényszórásából tevődik össze. Bár értéke helyesen megválasztott kísérleti körülmények közt kis érték $A_{\text{valódi}}$ mellett, elhanyagolása durva hibát jelentene.

Mivel a spektrofotometria mind kvalitatív, mind pedig kvantitatív analitikai alkalmazása esetén $A_{\text{valódi}}$ értékét tekintjük az oldott anyag abszorbanciájának, olyan kísérleti körülményeket kell választani, hogy ezt egyszerűen és közvetlenül meg tudjuk határozni. Ezért alkalmazunk a mérések során az oldatot tartalmazó küvettán kívül egy ugyanolyan, de tiszta oldószert tartalmazó referenciaküvettát is. (Amint azt a 2.5. és 2.6. fejezetben tárgyaltuk, egysugármenetes készülék esetén a két küvettát egymás után húzzuk a fényútba, kétsugármenetes készülék esetén pedig a két független fényútba helyezzük el őket.)

Amennyiben mindkét küvettára I_0 intenzitású fény esik, amely az oldatot tartalmazó küvetta esetén I, a referenciaküvetta esetén pedig I_0' intenzitásra csökken, felírható a (2/17) egyenlet:

$$A_{\text{valódi}} = A_{\text{összes}} - A_{\text{üres}} = \log \frac{I_0}{I} - \log \frac{I_0}{I_0'} = \log \frac{I_0'}{I}. \qquad (2/17)$$

Amint az a (2/17) egyenletből látható, az abszorbancia mérésénél a besugárzó fény intenzitása helyett a referenciaküvetta által gyengített fény intenzitását vesszük figyelembe.

Az egyszerűbb spektrofotométerekkel 0—2 tartományban lehet mérni az abszorbanciát, a korszerű, nagyobb teljesítményű készülékekben ez a határ 0—3, sőt néhány készülék esetében 0—4. Mivel $A=4$ azt jelenti, hogy a besugárzó fény 99,99%-a elnyelődik, a megmaradó igen kis intenzitású fény méréséhez igen érzékeny készülék kell, igen magas abszorbanciák mérése esetén pedig ettől függetlenül is csak akkor kaphatunk pontos eredményt, ha a készülékben a szórt fény értéke megfelelően alacsony (lásd 2.10. fejezet).

Az az abszorbanciaérték, ahol a legnagyobb pontossággal tudunk dolgozni, vagyis az abszorbancia mérésének relatív hibája ($\Delta A/A$) minimális, a Lambert—Beer-egyenlet (2/8 egyenlet) differenciálása útján számítható ki. Félvezetős detektorok esetén, ahol a detektorzaj (ΔA) független a fényintenzitástól, ez az érték $A=0{,}43$, míg fotocellás, ill. elektronsokszorozós készülékek esetén, ahol a detektorzaj a fényintenzitás négyzetgyökével arányos, $A=0{,}86$. Mivel mindkét görbe (különösen pedig az utóbbi) meglehetősen széles minimumot ad, az abszorbanciamérés relatív hibája széles abszorbanciatartományban szorítható le 0,5% alá. A hiba további csökkentési lehetőségeiről a 4.7. fejezetben lesz szó, a fenti értékek levezetését és a kérdés részletes tárgyalását illetően pedig a bevezetésben hivatkozott monográfiákra utalunk.

2.8. A fényabszorpció mérésének hibaforrásai

Az abszorbancia mérésének hibaforrásai közül néhány a küvetta nem megfelelő megválasztásából, ill. kezeléséből származik. Ezeket tárgyaljuk ebben a fejezetben. A résszélesség és a szórt fény hatását az abszorbancia mérésének hibájára a 2.9 és 2.10. fejezetekben tárgyaljuk.

Mivel a küvették anyaga, rétegvastagsága és konstrukciója még látszatra azonos küvették esetén is függ az előállítótól, kizárólag azonos forrásból származó, összemért küvettákat szabad használni referencia- és mérőküvettaként. Ettől való eltérés esetén az abszorpciós és reflexiós veszteségek különbözősége miatt különösen a rövidhullámú ultraibolya tartományban követhetünk el súlyos hibákat.

Hiba forrása az is, ha a fény nem pontosan merőlegesen éri a küvetta optikai felületét, ill. még inkább az, ha a küvettartó tökéletlen kiképzése, kopása miatt nem biztosítható, hogy a küvetta ismételt kivétele és behelyezése során az pontosan ugyanazt a helyzetet foglalja el. Ez utóbbi okból kifolyólag sorozatmérések esetén helyesebb a küvették kiürítését, átöblítését és újratöltését a spektrofotométerből való kivétel nélkül megoldani automatikus berendezés, vagy akár egyszerűen egy pipetta segítségével.

Megfelelő küvették és küvettatartó alkalmazása esetén is komoly hibaforrást jelent a küvették nem megfelelő kezelése. A küvetta optikai felületeit óvni kell minden olyan

behatástól, ami végleges elváltozást (karcolás, erősen lúgos oldattól származó bemaródás) vagy elszennyeződést okoz. Használat után a küvettát haladéktalanul ki kell mosni azzal az oldószerrel, amivel dolgoztunk, majd vízzel vagy alkohollal. Nehezen eltávolítható szennyezés esetén semleges detergenssel való átöblítést, ill. tömény salétromsavas vagy krómkénsavas kezelést alkalmazunk. Figyelembe kell venni azt is, hogy a küvetta falán keletkező esetleges lerakódások gyakran csak az ultraibolya tartományban rendelkeznek elnyeléssel, tehát szemre kifogástalannak tűnő küvetta is hibák forrása lehet ultraibolya spektrumok felvétele esetén. Ezért a fenti kezelést időről időre célszerű elvégezni akkor is, ha a küvettákon nem látszik a szennyezettség. Ellenőrzésképpen a vizsgálat során referencia- és mérőküvettaként felhasználandó küvettát tiszta oldószerrel töltjük fel és a mérés hullámhosszán meghatározzuk a mérőküvetta látszólagos abszorbanciáját, ill. spektrumfelvétel esetén regisztráljuk a spektrum alapvonalát. Amennyiben a nyert értékek meghaladják a $\pm 0{,}003 - 0{,}005$ értéket, vagy nem összetartozó küvettákat használunk, vagy a küvetták tisztításra szorulnak. Gyakran alkalmaznak küvettakorrekciót (a fenti kísérletnél nyert abszorbanciákat korrekcióba veszik a mért értékekhez). Ez elvileg valóban megoldást jelent, mivel azonban a szennyeződésből eredő korrekció természetesen nem jól definiált érték, ezt a megoldást lehetőség szerint el kell kerülni.

Használaton kívül célszerű a küvettákat vízzel vagy alkohollal fedve tárolni. Az optikai felületeknek használat során tükörfényesnek kell lenni, a felületeket szárazra törülni azonban csak tiszta, szálmentes, puha ruhával, igen óvatosan, erős dörzsölés mellőzésével szabad. A küvetta tisztántartására és kezelésére vonatkozó számos hasznos tanács található Burgess és Knowles könyvében [2].

További hibaforrást jelent az oldószer megválasztásában elkövetett hiba. A spektrofotometriában használható oldószerek kérdésével a 2.9. és 2.11. fejezetben foglalkozunk. Bár ideális esetben az oldószer teljesen átereszti a mérési tartományban; amint az a (2/17) egyenletből következik, a mérést akkor is el lehet végezni, ha az adott hullámhosszon az oldószernek vagy az abban levő szennyezésnek bizonyos (nem túlságosan nagy) elnyelése van, tehát kisebb igényű mérések esetén nem feltétlenül szükséges az igen drága „spektroszkópiai" jelzésű oldószerek használata. Súlyos hibát követhetünk el azonban akkor, ha a referenciaküvetta feltöltésére nem ugyanabból az edényből származó oldószert használunk, mivel az oldószernek még az üvegről üvegre gyakran változó minimális szennyezettsége is jelentős fényelnyelés-különbséget okozhat. Ezt a hibaforrást az abszolút etanolos közegben gyakran előforduló problémával illusztráljuk. Ez az oldószer általában 0,01% alatti mennyiségben benzolt tartalmaz. Ennek fajlagos abszorpciós koefficiense 254 nm-nél 26. Ha az összehasonlító küvettába (10 mm) 0,005% benzolt tartalmazó etanolt öntünk, a mérendő oldat elkészítésénél pedig 0,01% benzol tartalmú etanolt használunk, a mért abszorbancia 0,13-mal lesz nagyobb, mint a valódi érték.

Ennek a kérdésnek még desztillált víznek oldószerként való alkalmazása esetén is jelentősége van, hiszen — különösen műanyag tartályban való tárolása esetén — az is számottevő mennyiségű, fényt elnyelő és szóró szennyezést tartalmazhat.

2.9. A résszélesség hatása az abszorbanciára

A monokromátor kilépő résének szélessége bizonyos körülmények közt jelentősen befolyásolhatja az abszorbanciát, s így a nem megfelelően megválasztott résszélesség komoly hibák forrása lehet.

Amint erre már a 2.4. fejezet monokromátorokkal foglalkozó alfejezetében rámutattunk, a spektrális sávszélesség egyenesen arányos a résszélességel (2/15 egyenlet). Mivel egyrészről a spektrális sávszélesség fordított arányosság szerint határozza meg a mérés spektrális tisztaságát, másrészről viszont az abszorbanciamérés jel—zaj viszonya egyenesen arányos a spektrális sávszélességgel, nyilvánvaló, hogy a spektrális sávszélesség, ill. az azt meghatározó résszélesség megválasztásánál kompromisszumra kell jutni.

A spektrális tisztaság szempontjából természetesen minél kisebb rés alkalmazása lenne az optimális, a résszélesség csökkentésével azonban romlik a jel—zaj viszony és ezzel a mérés pontossága. A következő tényezők kényszeríthetik az analitikust a résszélesség növelésére:

a) A spektrofotométer elhanyagolt állapota. Minden olyan tényező, ami csökkenti az adott résszélesség mellett a detektorra jutó fényenergiát, ebben az irányban hat. Ilyen tényező lehet a fényút elállítódása, ami azt eredményezi, hogy a fényenergiának csupán egy része jut a küvettán keresztül a detektorra. A másik lehetőség az optikai elemek (tükrök stb.) elszennyeződése, ami különösen a fényforrások viszonylag energiaszegényebb tartományában okoz gondot (elsősorban 200 nm körül, ill. alatt). Ilyen elszennyeződés különösen olyan laboratóriumokban fordul elő, ahol a spektrofotométerrel egy helyiségben kémiai munka folyik, tehát az optikai felületek vegyszergőzökkel érintkezhetnek. A szennyezett felületek időnkénti óvatos megtisztítása, ill. többéves használat után polírozása ismét biztosítja a készülék eredeti specifikációjának megfelelő mérési lehetőségeket.

b) Az oldószer megválasztásával kapcsolatos nehézségek. Amíg a látható spektrumtartományban valamennyi színtelen oldószer alkalmazható a spektrofotometriás vizsgálatoknál, az ultraibolya, különösen pedig ennek rövidhullámú tartományában már erősen leszűkül az alkalmazható oldószerek köre. A közhasználatú spektrofotométerek 190 nm körüli alsó hullámhosszhatáráig a spektrofotometriás gyógyszeranalízisben használatos oldószerek közül vízzel, metanollal, etanollal, hexánnal, ciklohexánnal, acetonitrillel lehet méréseket végezni. A 210 nm alatti tartományban mindenképpen különlegesen tiszta, „Spektroszkópiai" jelzésű oldószerekre van szükség. Az oldószer abszorpcióját itt jelentősen megnövelheti az elnyelt szén-dioxid, sőt az oxigén is. A fenti nehézségek miatt — amennyiben ezt a vizsgált anyag oldékonysága lehetővé teszi — ez esetben célszerűbb töményebb oldatban, 1 mm-es küvettában végezni a vizsgálatokat. Régebbi típusú készülékek használata esetén még ilyen körülmények között is nehézségeink lehetnek. Egyéb oldószerek felhasználhatóságának alsó gyakorlati hullámhosszhatárai a következők: dietil-éter 205 nm, dioxán 215 nm, tetrahidrofurán 240 nm, kloroform 245 nm, szén-tetraklorid 260 nm, dimetil-formamid,

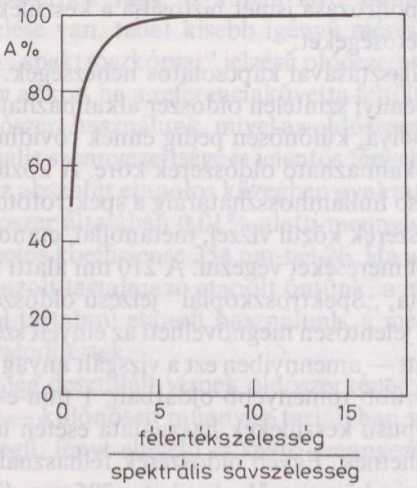
ecetsav, dimetil-szulfoxid 270 nm, benzol 280 nm, piridin 305 nm, aceton 330 nm. Ezeknek a határoknak a közelében már energiaproblémák léphetnek fel.

c) Amennyiben a meghatározást előzetes kémiai reakcióra alapozzuk (6. fejezet), a reagens feleslege okozhat komoly problémát, amennyiben jelentős az elnyelése a reakciótermék abszorpciós maximumán. Amennyiben a moláris abszorbciós koefficiensek összemérhetők, szükségessé válhat a reagens feleslegének eltávolítása a reakcióelegyből. Különösen éles formában jelentkeznek a résproblémák a kémiai reakciókra alapozott módszerek differencia-spektrofotometriás változatánál (8. fejezet).

Hogy a résszélesség növelése mekkora és milyen jellegű hibát okoz, az a spektrofotométer minőségétől és a vizsgált anyag spektrumától függ.

A spektrofotométer tulajdonságaitól való függés a monokromátor és a detektor vonatkozásában jelentkezik. A (2/15) egyenlet szerint a spektrális sávszélesség egyenesen arányos a mechanikus résszélességgel és fordítva a monokromátor lineáris diszperziójával. Ez azt jelenti, hogy pl. egy kétszer nagyobb diszperzióval rendelkező monokromátor esetén kétszeresre nyithatjuk a rést anélkül, hogy a spektrális sávszélesség növekedne a kisebb felbontású monokromátorral rendelkező készüléknél elért értékhez képest. Másrészről természetesen a detektor érzékenysége is fontos tényező: érzékenyebb detektorral rendelkező készülékkel kisebb résszélesség mellett tudunk dolgozni.

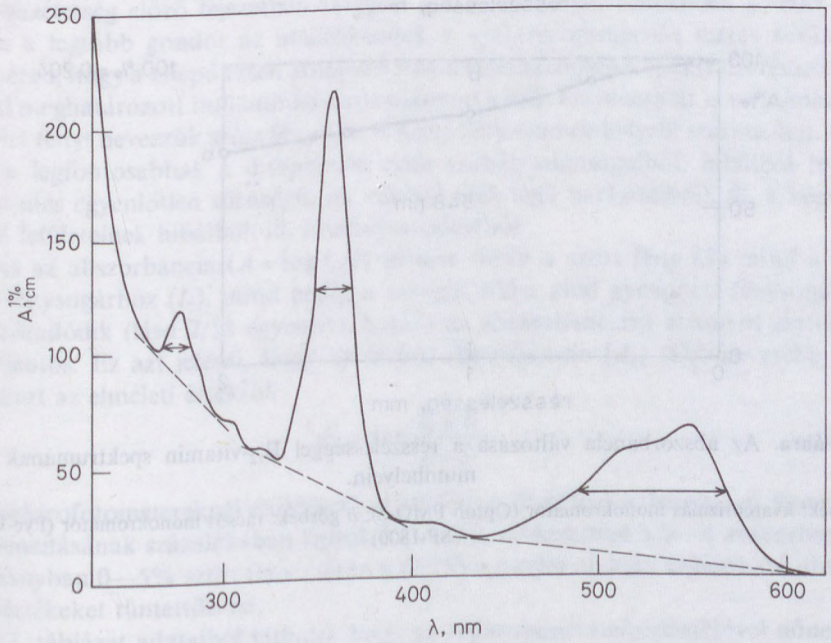
Hogy a résszélesség s ezzel a spektrális sávszélesség növelése okoz-e hibát, s ha igen, mekkorát a spektrum felvétele, ill. az abszorbancia mérése során, az a vizsgálandó anyag spektrumától, pontosabban a spektrum sávjainak élességétől függ. Ez utóbbit a sáv félértékszélességével jellemezhetjük. (A félértékszélesség a sáv maximumának jobb és bal oldalán elhelyezkedő olyan két hullámhossz különbsége, ahol az abszorbancia fele a maximumban mért értéknek. Összenőtt csúcsok esetén az abszorbanciát az alapvonaltól számítjuk, amint ez a 2/10. ábrán látható.) Elméletileg a sáv valódi



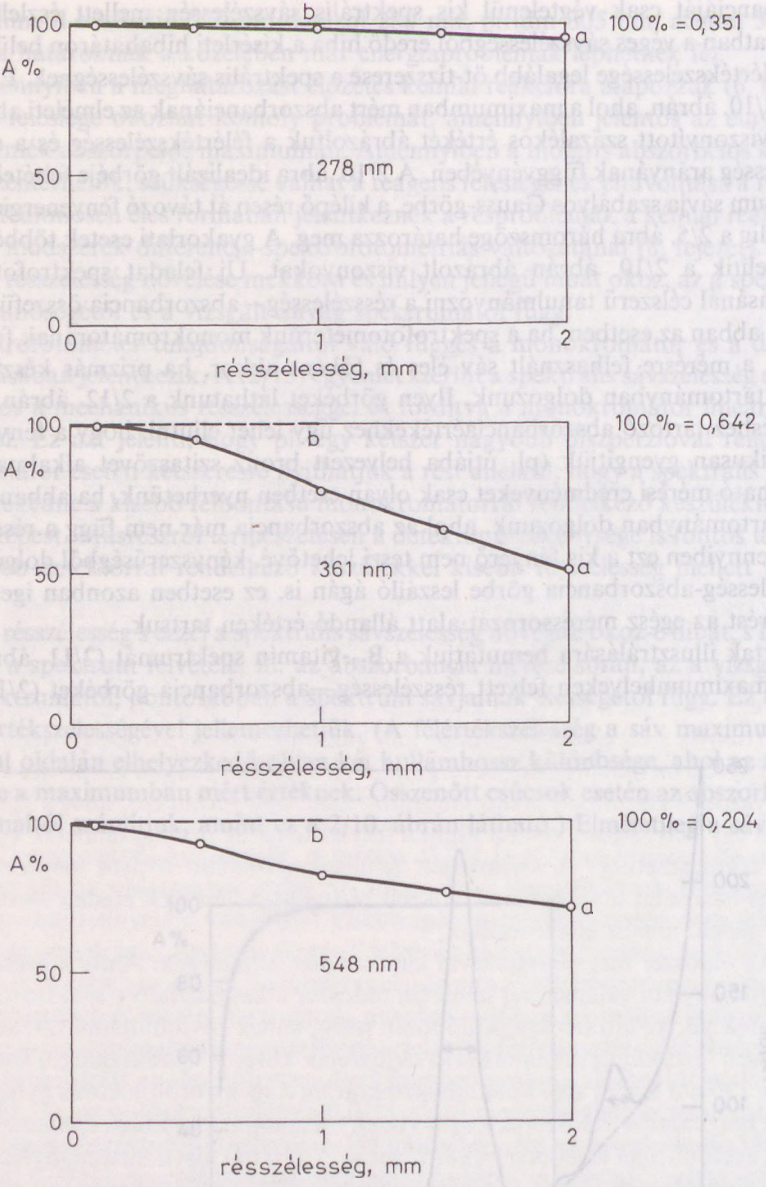
2/10. ábra. Az abszorbancia elméletihez viszonyított százalékos értéke a félértékszélesség és a spektrális sávszélesség hányadosának függvényében

abszorbanciáját csak végtelenül kis spektrális sávszélesség mellett észlelhetjük, a gyakorlatban a véges sávszélességből eredő hiba a kísérleti hibahatáron belül esik, ha a sáv félértékszélessége legalább öt-tízszerese a spektrális sávszélességnek. Ez leolvasható a 2/10. ábrán, ahol a maximumban mért abszorbanciának az elméleti abszorbanciához viszonyított százalékos értékét ábrázoltuk a félértékszélesség és a spektrális sávszélesség arányának függvényében. A 2/10. ábra idealizált görbéje feltételezi, hogy a spektrum sávja szabályos Gauss-görbe, a kilépő résen át távozó fényenergia összetételét pedig a 2/5. ábra háromszöge határozza meg. A gyakorlati esetek többé-kevésbé megközelítik a 2/10. ábrán ábrázolt viszonyokat. Új feladat spektrofotometriás megoldásánál célszerű tanulmányozni a résszélesség—abszorbancia összefüggést különösen abban az esetben, ha a spektrofotométerünk monokromátorának felbontása nem jó, a mérésre felhasznált sáv éles és főként akkor, ha prizmás készülékkel a látható tartományban dolgozunk. Ilyen görbéket láthatunk a 2/12. ábrán. Az igen széles réshez tartozó abszorbanciaértékekhez úgy lehet eljutni, hogy a fénynyalábot mechanikusan gyengítjük (pl. útjába helyezett bronz szitaszövet alkalmazásával). Megbízható mérési eredményeket csak olyan esetben nyerhetünk, ha abban a résszélesség-tartományban dolgozunk, ahol az abszorbancia már nem függ a résszélességtől. Amennyiben ezt a kis fényerő nem teszi lehetővé, kényszerűségből dolgozhatunk a résszélesség-abszorbancia görbe leszálló ágán is, ez esetben azonban igen fontos, hogy a rést az egész méréssorozat alatt állandó értéken tartsuk.

A leírtak illusztrálására bemutatjuk a B_{12}-vitamin spektrumát (2/11. ábra), valamint a maximumhelyeken felvett résszélesség—abszorbancia görbéket (2/12. ábra).



2/11. ábra. B_{12}-vitamin spektruma. Oldószer: víz



2/12. ábra. Az abszorbancia változása a résszélességgel B_{12}-vitamin spektrumának maximumhelyein.

a görbék: kvarcprizmás monokromátor (Opton PMQ-2); *b* görbék: rácsos monokromátor (Pye-Unicam SP-1800)

A görbék értékeléséhez megadjuk a 2/11. ábrából leolvasható félértékszélességeket. Ezek a 278 nm-es maximumnál 15 nm, 360 nm-nél 20 nm, végül az 549 nm-es maximumnál 80 nm. Ezek az értékek 5-, 6,7-, 27-szeresei a teljes tartományban állandó spektrális sávszélességű rácsos monokromátorral rendelkező Pye-Unicam SP-1800 készülék teljesen nyitott (1 mm-es) rése mellett nyert 3 nm-es sávszélességnek. Így nem meglepő, hogy a 2/12. ábra *a* görbéi még 1 mm-es résszélesség mellett sem mutatnak 1%-nál nagyobb csökkenést az ideális abszorbanciaértékhez képest.

Teljesen más a helyzet a prizmás Opton PMQ-2 spektrofotométer esetében (*b* görbék). 278 nm-nél, ahol a prizma felbontása még jó, 0,5 mm-ig még nem változik az abszorbancia, és teljesen nyitott (ez esetben 2 nm) rés mellett is csupán 6%-ot csökken. A 360 nm-es sáv meglehetősen éles; itt már a prizma felbontása is rosszabb; ennek megfelelően már 0,1 mm-es résszélesség mellett megindul az abszorbancia csökkenése, s ez teljesen nyitott résállásig eléri az 50%-ot. 549 nm-nél már igen gyenge a prizma felbontása (a 2/6. ábra *b* görbéjén leolvashatóan a lineáris diszperzió 28 nm/mm). Ezt némileg kiegyensúlyozza ennek a sávnak a nagy félértékszélessége. Ezért itt is 0,5 mm-nél kezd csökkenni az abszorbancia, ami teljesen nyitott résállásig 30% csökkenést mutat.

2.10. A szórt fény hatása az abszorbanciára

A résszélesség előző fejezetben tárgyalt problematikáján túlmenően a szórt fény okozza a legtöbb gondot az analitikusnak a spektrofotometriás mérés során. Ez onnan ered, hogy a kilépő résen áthaladó fény a monokromátor spektrális résszélessége által meghatározott hullámhossztartományon kívüli fényenergiát is tartalmaz; ezt a többlet fényt nevezzük szórt fénynek. A szórt fény számos helyről származhat. Ezek közül a legfontosabbak a diszperziós elem szabálytalanságaiból, hibáiból (pl. az optikai rács egyenlőtlen sűrűségű, ill. változó mélységű barázdáiból), ill. a készülék optikai felületeinek hibáiból, ill. elszennyeződéséből.

Mivel az abszorbancia ($A = \log I_0/I$) mérése során a szórt fény (S) mind a referencia-fénysugárhoz (I_0), mind pedig a vizsgált oldat által gyengített fénysugárhoz (I) hozzáadódik (lásd 2/18 egyenlet), hatása az abszorbanciára bizonyos esetekben igen jelentős. Ez azt jelenti, hogy az észlelt abszorbancia (A_e) több-kevesebb eltérést mutat az elméleti értéktől.

$$A_e = \log \frac{I_0 + S}{I + S}. \qquad (2/18)$$

A spektrofotométereknél észlelhető szórt fényt általában a besugárzó fénysugár (I_0) intenzitásának százalékában fejezik ki. A 2/2. táblázatban a 0—4 abszorbancia-tartományban 0—5% szórt fény esetén a (2/18) egyenlet alapján számítható abszorbanciaértékeket tüntettük fel.

A 2/2. táblázat adataiból látható, hogy az abszorbancia növekedésével nőnek az eltérések az észlelt és az elméleti abszorbanciértékek között. 1—5% szórt fény esetén

2/2. táblázat. A (2/18) egyenlet alapján különböző szórt fény százalékok esetén számolt abszorbanciaértékek

I_0	I	Abszorbancia I_0 százalékában mért szórt fények esetén					
		0%	0,001%	0,01%	0,1%	1%	5%
1,0	0,8	0,097	0,097	0,097	0,097	0,096	0,092
1,0	0,6	0,222	0,222	0,222	0,222	0,219	0,209
1,0	0,4	0,398	0,398	0,398	0,397	0,392	0,368
1,0	0,2	0,699	0,699	0,699	0,697	0,682	0,623
1,0	0,1	1,000	1,000	1,000	0,996	0,963	0,845
1,0	0,01	2,000	2,000	1,996	1,959	1,703	1,243
1,0	0,001	3,000	2,996	2,959	2,699	1,963	1,314
1,0	0,0001	4,000	3,959	3,699	2,959	2,000	1,321

már az abszorbanciaskála legelején is jelentős az eltérés. 0,1% szórt fény esetén kb. 1-es abszorbanciáig hanyagolható el a hiba, 0,01% esetén 2—3-ig, a számos modern készülék szolgáltatásai közt szereplő 0—4 abszorbanciaskálát azonban csak abban az esetben lehet kihasználni, ha a szórt fényt 0,001% alá szorítjuk.

A 2/2. táblázat adataiból következik, hogy a növekvő koncentrációjú oldatok abszorbanciáinak mérése során a szórt fény értékétől függő hosszúságú lineáris szakasz után az egyenesek görbébe mennek át (negatív eltérés a Beer-törvénytől — lásd 4.2. fejezet). Megjegyzendő azonban, hogy a (2/18) egyenlet és az arra alapozott számítás azt az egyszerűsítő feltételt tartalmazza, hogy a minta nem nyeli el a szórt fényt. Ha ez részlegesen elnyelődik, az eltérések kisebbek lesznek a számítottnál.

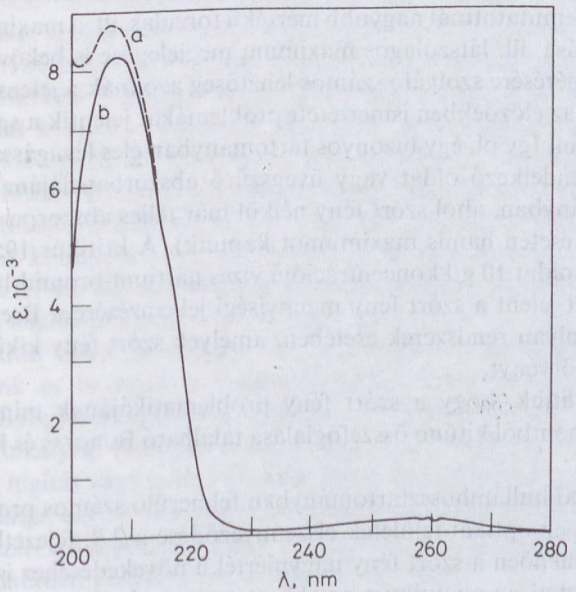
A szórt fény relatív mennyisége függ a hullámhossztól. Ez különösen a fényforrások alkalmazási tartományának határainál okoz problémát, ahol a fényintenzitás (I_0) gyorsan változik a hullámhosszal. Ilyen tartományok a volfrámlámpa esetén a 320—400 nm-es és 800 nm feletti tartomány, deutériumlámpa esetén pedig a 220 nm alatti tartomány. Az előbbiek problémája megfelelő szórt fény szűrők alkalmazásával gyakorlatilag megoldható. Mivel 220 nm felett elnyelő, alatta viszont átengedő szűrő nem áll rendelkezésre, a használatban levő spektrofotométerek nagy részénél a rövidhullámú tartományban 0,1—1% nagyságrendű szórt fénnyel kell számolni, ami 190 nm irányába rohamosan nő. Ez a gyors növekedés olyan mértékben csökkentheti az abszorbanciát a rövid hullámok irányában, hogy ez a hatás túlkompenzálhatja a rövid hullámok irányába általában emelkedő spektrumoknál az emelkedés hatását. Az ebből eredő hiba megnyilvánulási formái a következők. A 220 nm tájékán megjelenő abszorpciós sávok rövidhullámú oldalát a készülék „levágja", a sáv alakja eltorzul. Mivel ez a hatás természetesen nagyobb koncentrációnál erősebben jelentkezik, a látszólagos maximumhely függ a koncentrációtól. Különösen élesen jelentkezik ez a hatás akkor, ha olyan oldószert (pl. alkoholt) használunk, amelynek a 200 nm körüli tartományban rohamosan emelkedik az abszorbanciája a hullámhossz csökkenésével. Az említett túlkompenzálás gyakran odavezet, hogy a rövidhullámok irányában emelkedő spektrum 200 nm tájékán hamis maximumot mutat.

A hiba csökkentése érdekében célszerű (amennyiben ezt az oldékonysági viszonyok lehetővé teszik) vizes közegben és kisebb rétegvastagságú küvettával dolgozni. Mivel

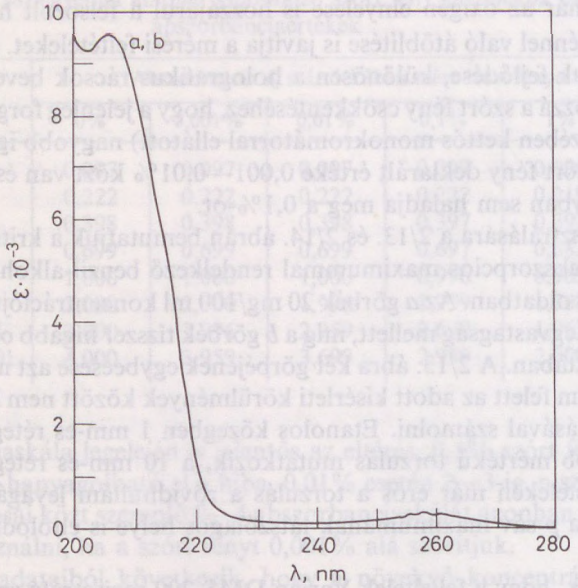
200 nm alatt már az oxigén elnyelése is hozzájárul a felsorolt hibaforrásokhoz, a készülék nitrogénnel való átöblítése is javítja a mérési feltételeket. Az optikai elemek technológiájának fejlődése, különösen a holografikus rácsok bevezetése olyan mértékben járult hozzá a szórt fény csökkentéséhez, hogy a jelenleg forgalomba kerülő (az esetek nagy részében kettős monokromátorral ellátott) nagyobb igényű spektrofotométereknél a szórt fény deklarált értéke 0,001—0,01% közt van és még a legkritikusabb tartományban sem haladja meg a 0,1%-ot.

A leírtak illusztrálására a 2/13. és 2/14. ábrán bemutatjuk a kritikus rövidhullámú tartományban abszorpciós maximummal rendelkező benzil-alkohol spektrumait vizes, ill. etanolos oldatban. Az *a* görbék 20 mg/100 ml koncentrációjú oldatok spektrumai 1 mm-es rétegvastagság mellett, míg a *b* görbék tízszer hígabb oldatok spektrumai 10 mm-es küvettában. A 2/13. ábra két görbéjének egybeesése azt mutatja, hogy vizes közegben 200 nm felett az adott kísérleti körülmények között nem kellett a szórt fény számottevő hatásával számolni. Etanolos közegben 1 mm-es rétegvastagság mellett még csak kisebb mértékű torzulás mutatkozik, a 10 mm-es rétegvastagság mellett elkészített felvételeken már erős a torzulás a rövidhullám levágás miatt, és ennek következtében a *p* sáv maximumának látszólagos helye is eltolódik 206 nm-ről 208 nm-re.

Megjegyezzük, hogy a felvételek Varian DMS-200 regisztráló spektrofotométerrel készültek, amelynek deklarált szórt fény értéke 220 nm-nél kisebb, mint 0,02%. Ennél gyengébb színvonalú (vagy megfelelő színvonalú, de gyenge műszaki állapotban levő) készülékkel, ill. saját elnyelése, ill. szennyezéseinek elnyelése miatt a rövid hullám-



2/13. ábra. Benzil-alkohol spektrumai etanolos közegben.
a) $c = 20$ mg/ml, rétegvastagság 1 mm; *b)* $c = 2$ mg/ml, rétegvastagság 10 mm



2/14. ábra. Benzil-alkohol spektrumai vizes közegben.
a) $c = 20$ mg/ml, rétegvastagság 1 mm; *b)* $c = 2$ mg/ml, rétegvastagság 10 mm

hosszak irányában meredeken emelkedő spektrummal rendelkező oldószerek felhasználása esetén a bemutatottnál nagyobb mértékű torzulás, ill. a maximumnak nagyobb mértékű eltolódása, ill. látszólagos maximum megjelenése is bekövetkezik [7].

A szórt fény mérésére szolgáló számos lehetőség azoknak a jelenségeknek mérésén alapul, amelyek az előzőekben ismertetett problémákat jelentik a spektrofotometriás mérések folyamán. Így pl. egy bizonyos tartományban éles levágással és igen intenzív abszorpcióval rendelkező oldat vagy üvegszűrő abszorbanciájának meghatározása abban a tartományban, ahol szórt fény nélkül már teljes abszorpciót kellene észlelni (erős szórt fény esetén hamis maximumot kapunk). A kritikus 195—223 nm tartományra javasolt oldat 10 g/l koncentrációjú vizes nátrium-bromid 10 mm-es küvettában. Lehetőséget jelent a szórt fény mennyiségi jellemzésére a Beer-törvénytől való eltérés mértéke olyan rendszerek esetében, amelyek szórt fény kiküszöbölése esetén követik a Beer-törvényt.

Végül megemlítjük, hogy a szórt fény problematikájának mind elméleti, mind gyakorlati szempontból kitűnő összefoglalása található Burgess és Knowles könyvében [2].

A 220 nm alatti hullámhossztartományban felmerülő számos probléma (amit még az is tetéz, hogy az optikai felületek elszennyeződése a 2.9. fejezetben leírt fényerőcsökkenésen túlmenően a szórt fény nagymértékű növekedéséhez is vezet) nagyfokú óvatosságra készteti az analitikust az ebben a tartományban mért spektroszkópiai adatok értékelésénél. Ez egyrészt azt jelenti, hogy ebben a tartományban mért abszorbanciára megbízható kvantitatív analitikai módszert nem lehet alapozni, másrészről

a kvalitatív analízisben is igen óvatosan kell kezelni az ebben a tartományban észlelt maximumokat. Ez egyrészt azért van, mert ebben a tartományban igen sok, egymástól alapvetően különböző funkciós csoport és szerkezeti elem ad abszorpciós sávot (lásd 3. fejezet), tehát az itt észlelt maximum önmagában igen csekély értékű a szerkezetkutatásban. Másrészről a korábban leírtak alapján ebben a tartományban igen könnyen fordulhat elő a szórt fény következtében maximumeltolódás, sőt hamis maximum, ami teljesen félrevezető lehet. Ha tehát ebből a tartományból feltétlenül szükségünk van mérési adatokra, csak igen jó minőségű, kettős monokromátorral ellátott készülékkel dolgozhatunk, és a szórt fényt az előzőekben leírt módon ellenőrizni kell. Igen nagyfokú óvatosságra van szükség az irodalmi adatok kezelésénél is. Az irodalomban közölt spektrumok jelentős részénél a 220 nm alatti tartomány teljesen megbízhatatlan, sok esetben nyilvánvalóan hibás.

2.11. Spektrumok felvétele

2.11.1. Spektrumok felvételének jelentősége

Amint az a 26. oldal (2/8) egyenletének tárgyalásánál megállapítottuk, a Lambert—Beer-törvény állandója, a moláris abszorpciós koefficiens függ a hullámhossztól. Ezt az összefüggést fejezik ki az abszorpciós spektrumok. Spektrumok felvételére számos esetben van szükség a spektrofotometriás gyógyszeranalízis gyakorlatában.

a) Az 1.2. fejezetben megemlített és a 3. fejezetben részletesen tárgyalt lehetőség: ultraibolya-látható spektrofotometria felhasználása potenciális gyógyszerként kipróbálásra kerülő natív és szintetikus szerves vegyületek, intermedierek, bomlástermékek és metabolitok szerkezetfelderítésében a teljes spektrumok felvételét teszi szükségessé.

b) Egyszerűbb kvalitatív analitikai feladatok: gyógyszervegyületek azonosítása ismert anyagokkal ugyancsak szükségessé teszi a spektrum felvételét, hogy azt összehasonlíthassuk standard anyag spektrumával vagy legalább a maximum és minimumhelyekre vonatkozóan rendelkezésre álló irodalmi, gyógyszerkönyvi adatokkal.

c) Ha a célunk kifejezetten csak kvantitatív analízis, akkor is gyakran szükségünk van spektrumok felvételére. A spektrum ismeretében választhatjuk ui. ki azt a hullámhosszt, amely a legalkalmasabb a kvantitatív mérésre.

d) Igen gyakran akkor is szükség van a spektrumok felvételére, ha kvantitatív analízist végzünk és ismerjük a meghatározandó komponens mérésére alkalmas hullámhosszt. Gyógyszervegyületek összetett mátrixokban való meghatározásánál (gyógyszerkészítmények, biológiai minták stb.) a meghatározandó komponens és a mintából oldás, hígítás vagy extrakció útján nyert oldat spektrumainak összehasonlítása ui. megmutatja, zavarja-e a meghatározandó anyag fényelnyelését valamely más komponens, kiszerelési segédanyag vagy szennyezés, vagyis elvégezhető-e a közvetlen mérés. Erre vonatkozó példákat a 4.3. fejezet tartalmaz.

2.11.2. A spektrumok felvételének technikája

Az abszorpciós spektrum felvételénél az első feladat az oldószer helyes megválasztása. A két mérlegelendő szempont az oldószer oldóképessége és fényáteresztő képessége. Az oldóképesség általában nem okoz gondot, hiszen a mérést híg oldatban (0,001—0,01 legfeljebb 0,1%-os koncentrációban) végezzük el, és ilyen koncentrációban a gyógyszerészetben használt anyagok többsége oldódik vízben vagy valamilyen alkoholban (metanol vagy etanol, esetleg 2-propanol). Más oldószereket (hexán, ciklohexán, éter, dioxán, kloroform stb.) ritkábban használunk.

Az oldószerek fényáteresztő képességét azzal a legalacsonyabb hullámhosszal jellemezhetjük, ahol a mérés még megbízhatóan elvégezhető. Ilyen adatokat a 2.9. fejezetben, a 43. oldalon találhatunk. A 2.9. és 2.10. fejezetek tárgyalják az összefüggést az oldószer megválasztása és a spektrum felvétele során jelentkező, a spektrális tisztasággal, ill. a szórt fénnyel kapcsolatos problémák között.

A kiválasztott oldószer felhasználásával a vizsgálandó anyagból a spektrum felvétele céljából általában kb. 0,001—0,01%-os oldatot készítünk. Gyengébben elnyelő anyagok esetén, vagy ha szükségünk van az intenzíven elnyelő anyag spektrumának kisebb intenzitású részeire is, akkor ezeket a fentinél 10—100-szor töményebb oldatból mérjük ki. Másik lehetőség a küvetta rétegvastagságának változtatása, amelynek csökkentése különösen a 200 nm körüli tartományban lehet igen hasznos a szórt fény hatásának csökkentése céljából.

A spektrumok felvételét általában kétsugármenetes, regisztráló készüléken végezzük el (2.6. fejezet). A spektrumfelvétel elindítása előtt a készülék nullázását úgy végezzük el, hogy mindkét küvettába a tiszta oldószert töltjük, vagy az összehasonlító és vizsgálandó oldatot a küvettatartóba helyezve olyan hullámhossznál nullázunk, ahol a mérendő oldat már nem rendelkezik fényelnyeléssel.

Eltekintve a diódasoros detektorral rendelkező készülékektől, ahol a teljes spektrum regisztrálása a másodperc törtrésze alatt végezhető el, a hagyományos spektrumregisztrálóval ellátott készülékeknél a teljes spektrum felvételéhez szükséges idő kb. 1 perc és egy óra között több lépcsőben változtatható. A minimális regisztrálási idő megállapítása meglehetősen komplex kérdés. Itt figyelembe kell venni a regisztráló egység időállandóját is, ami a végkitérés 98%-ának eléréséhez szükséges idő; ez korszerű készülékeken több fokozatban állítható. Az időállandó csökkentése növeli a felvételi sebességet, de ugyanakkor rontja a jel—zaj viszonyt. Ezen túlmenően az optimális felvételi sebesség függ a spektrum alakjától, a felbontással szemben támasztott igénytől (ezáltal természetesen a résszélességtől is). Keskeny sávokból álló komplex spektrumok túlságosan nagy sebességgel történő felvétele a sávrendszer torzításához, a maximumok eltolódásához vezethet. Ideálisnak az tekinthető, ha a felvételi sebesség nem haladja meg a fenti definíció szerinti időállandónak megfelelő idő (néhány tized, ill. néhány másodperc) alatt az abszorpciós sáv félértékszélességének tizedrészét.

Amennyiben nem rendelkezünk regisztráló készülékkel, teljesen azonos értékű spektrumhoz lehet eljutni egysugármenetes készülékkel is (az egyedüli nehézség az, hogy a felvételi idő sokszorosára nő). Mivel az ultraibolya-látható spektrofotometria klasszikus korszakában, a 40-es, 50-es években a rendelkezésre álló regisztráló készü-

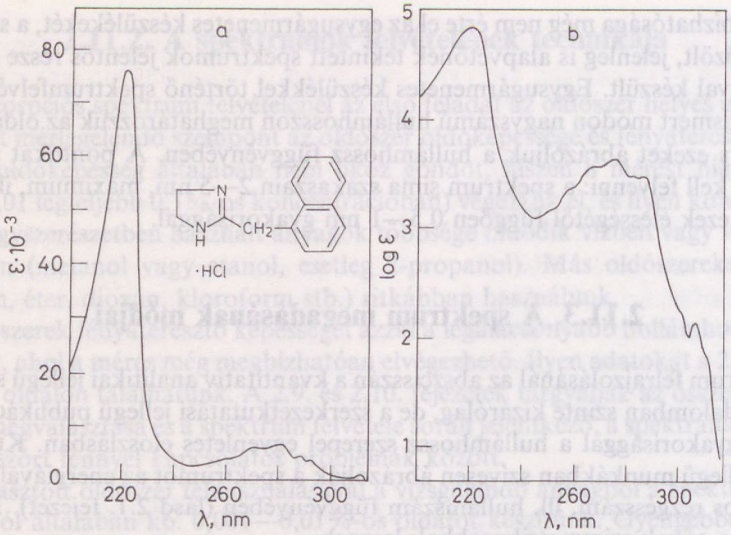
lékek megbízhatósága még nem érte el az egysugármenetes készülékekét, a szakirodalomban közölt, jelenleg is alapvetőnek tekintett spektrumok jelentős része még ezzel a technikával készült. Egysugármenetes készülékkel történő spektrumfelvétel esetén a már megismert módon nagyszámú hullámhosszon meghatározzuk az oldat abszorbanciáját, s ezeket ábrázoljuk a hullámhossz függvényében. A pontokat megfelelő sűrűséggel kell felvenni: a spektrum sima szakaszain 2—5 nm, maximum, ill. inflexió közelében ezek élességétől függően 0,5—1 nm gyakorisággal.

2.11.3. A spektrum megadásának módjai

A spektrum felrajzolásánál az abszcisszán a kvantitatív analitikai jellegű spektroszkópiai irodalomban szinte kizárólag, de a szerkezetkutatási jellegű publikációkban is nagyobb gyakorisággal a hullámhossz szerepel egyenletes eloszlásban. Kifejezetten elméleti jellegű munkákban szívesen ábrázolják a spektrumot az energiával közvetlenül arányos rezgésszám, ill. hullámszám függvényében (lásd 2.1. fejezet). Ez utóbbi esetekben a sávok szimmetrikusabbak lesznek.

Az ordinátán a fényelnyelést vesszük fel szinte kizárólag abszorbancia vagy azzal arányos mennyiségek formájában (a régi szakirodalomban számos esetben transzmittanciában megadott spektrumokat találunk). Ha közvetlenül a mért abszorbanciát ábrázoljuk a hullámhossz függvényében, feltétlenül meg kell adnunk az oldat pontos koncentrációját. Fejlettebb ábrázolási mód ennél, ha az ordinátán a fajlagos vagy moláris abszorpciós koefficienst tüntetjük fel, ez utóbbit elsősorban a szerkezet—spektrum összefüggésekkel foglalkozó irodalomban. Ez utóbbi esetben gyakran szükség van olyan kis intenzitású sávok ábrázolására is, amelyek a kvantitatív meghatározás szempontjából nem bírnak jelentőséggel. Mivel ezek intenzitása 2—4 nagyságrenddel kisebb lehet, mint a főmaximumé, ezeket a (töményebb oldatban felvett) spektrumrészleteket nem tudjuk a nagyobb intenzitású sávokkal egy görbén ábrázolni. Ezért vagy külön ábrázoljuk a különböző spektrumrészleteket változtatva az ordináta beosztását, vagy még inkább logaritmikus ábrázolást alkalmazunk, ez ui. lehetővé teszi az egymástól 2—4 nagyságrenddel különböző intenzitású sávok ábrázolását egyetlen görbén. A leírtakat a 2/15. ábrán nafazolin spektrumainak példáján mutatjuk be.

A spektrumok megadási módjával kapcsolatban lényeges kérdés az is, milyen hullámhossztartományban adjuk meg a spektrumot. Ha azt csupán saját használatra, ill. kvantitatív analitikai vizsgálat előkészítéseként vesszük fel, elegendő az utóbbi szempontból jelentős tartomány felvétele és megadása. Amennyiben azonban a felvétellel szerkezetfelderítési céljaink vannak, ill. a spektrumot az irodalomban közölni akarjuk, elvárható a teljes spektrum felvétele és megadása. A 220 nm alatti tartománnyal azonban rendkívül óvatosnak kell lenni: ezt csak akkor szabad közölni, ha a felvételi paraméterek (elsősorban a szórt fény alacsony értéke) lehetővé teszik a torzítás- és hamis maximum mentes spektrum felvételét (lásd 2.10. fejezet). Hasonlóan nagy óvatosságra van szükség a kis intenzitású ($\varepsilon < 1000$) sávok megadásánál is, mivel ezt megfelelő megbízhatósággal csak igen tiszta preparátumok esetén tehetjük meg. (Ezzel a kérdéssel a következő alfejezetben részletesebben foglalkozunk.) A leírt okok



2/15. ábra. Nafazolin-hidroklorid spektrumai. Oldószer: víz.

a) Ábrázolás moláris abszorpciós koefficiens szerint; *b)* Ábrázolás a moláris abszorpciós koefficiens logaritmusa szerint

miatt igen óvatosnak kell lenni az irodalomban közölt spektrumok értékelésével, ill. saját céljainkra való felhasználásával is, a szakirodalomban ui. részben a nem megfelelő tisztaságú anyagok, részben pedig a nem megfelelő felvételi paraméterek következtében igen nagy számban találhatunk többé-kevésbé hibás spektrumokat. Ezért célszerű a 3. fejezetben felsorolt spektrumatlaszokra, ill. más megbízható irodalomra hagyatkozni, vagy még inkább saját felvételt készíteni.

2.11.4. A spektrumot befolyásoló tényezők

Egy anyag abszorpciós spektrumát, a sávok helyzetét és intenzitását számos tényező befolyásolja. Ezeknek a tényezőknek egy részét valódi befolyásolásnak tekinthetjük, hiszen a helyesen megválasztott felvételi paraméterek sokfélesége miatt egyetlen anyaghoz többféle, egymástól többé-kevésbé különböző spektrum tartozhat. A tényezők másik része azonban helytelenül megválasztott felvételi paraméternek tekinthető, s így ezek hatását inkább a spektrum torzításának tekinthetjük. Mindkét csoportba tartozó tényezők nagyobbik részével korábbi, ill. későbbi fejezetekben foglalkozunk részletesebben: ezek esetében csupán utalunk a megfelelő fejezetre.

Befolyásoló tényezők:

a) Oldószerhatás. Mivel bizonyos esetekben a poláris és apoláris oldószerben felvett spektrumok közt jelentős különbségek vannak, s ezekből a különbségekből fontos szerkezeti következtetések vonhatók le, ezzel a kérdéssel a 3.2. fejezetben részletesebben foglalkozunk.

b) pH-hatás. Olyan anyagok spektruma, amelyek savas vagy bázikus funkciós csoportja a konjugáció viszonyában van a molekula spektrumot létrehozó elektronrendszerével, jelentős pH-függést mutat. Ezzel a kérdéssel a 3.16. fejezetben foglalkozunk részletesen. Itt csupán annyit jegyzünk meg, hogy ilyen anyagok vizsgálata esetén kvantitatív analitikai célokra, ill. a spektrum dokumentálása céljából olyan körülményeket kell biztosítani, ami vagy a teljes ionizációt, vagy az ionizáció teljes kizárását biztosítja (spektrumfelvétel apoláris oldószerben vagy poláris, elsősorban vizes oldat esetén a sav, ill. bázis erősségétől függően 0,01—1 mólos sósavas, ill. nátrium-hidroxidos közegben).

c) Az oldat koncentrációjának hatása. A 2.3. fejezetben tárgyalt meggondolások alapján a moláris abszorpciós koefficiens, s így maga az abszorpciós spektrum is független az oldat koncentrációjától. A gyógyszer-analitikai gyakorlatban ez a feltétel az esetek többségében teljesül is, vannak azonban esetek, amikor az esetleges asszociációs egyensúlyban a hígítás hatására bekövetkező eltolódás a spektrum eltolódását is eredményezi. Ilyen esetekkel, amelyek a Beer-törvénytől való eltérést eredményezik, a 4.2. fejezetben foglalkozunk.

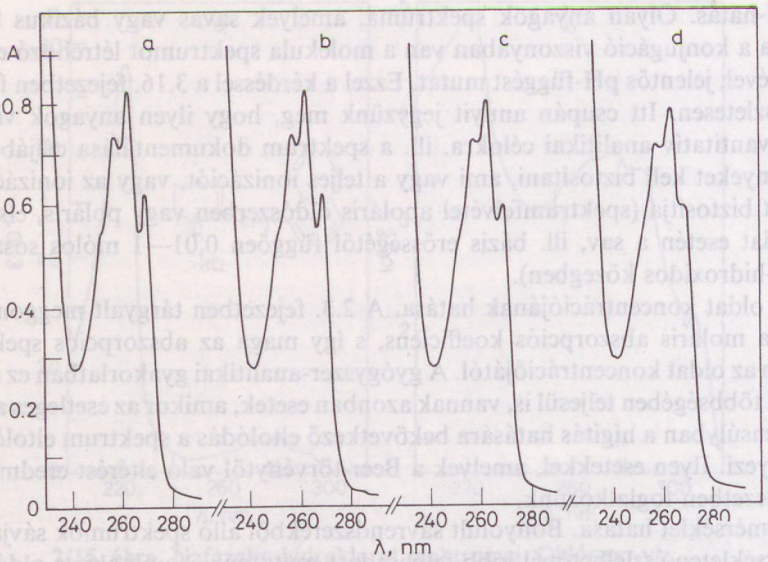
d) Hőmérséklet hatása. Bonyolult sávrendszerekből álló spektrumok sávjai a szobahőmérsékleten észlelhetőnél jobb felhasadást mutatnak, ha alkalmas oldószerben igen alacsony hőmérsékleten (pl. a cseppfolyós levegő hőmérsékletén) vesszük fel a spektrumot. A spektrumok hőmérséklet-függésének tanulmányozásából levonható szerkezeti következtetések azonban sokkal szerényebbek, mint más spektroszkópiai ágazatok (elsősorban az NMR-spektroszkópia) esetében.

Szűkebb hőmérséklet-intervallumokban is ismeretesek spektrumváltozások elsősorban asszociációs egyensúlyban levő festékek esetén [13]. Gyógyszervegyületek esetén ezek a hatások általában elhanyagolhatók, és a spektrumokat a szobahőmérséklet pontos megadása nélkül közlik. Precíziós mérések, ill. a szobahőmérséklet extrém ingadozásai esetén azonban ajánlatos alkalmazni a legtöbb korszerű készülékben rendelkezésre álló temperálható küvettatartót. Így nemcsak az esetleges csekély spektrumeltolódásokat előzhetjük meg, hanem az oldószerek hőkitágulásából származó abszorbanciakülönbségeket is kompenzáljuk.

Mint érdekességet jegyezzük meg, hogy igen intenzív hőmérsékletfüggést talált Sakai [8—12] különböző alkaloidok és rokon vegyületek tetrabróm-fenolftalein-etil-észterrel képzett ionpár-komplexei spektrumainak esetében. Mivel a különböző bázisok komplexeinek hőmérséklet-függése jelentősen különbözik egymástól és az abszorbancia—hőmérséklet összefüggés lineáris, a különböző hőmérsékleteken elvégzett spektrofotometriás mérések lehetővé teszik egyes bázisok egymás melletti meghatározását, amit fel is használtak ilyen készítmények analízisére.

A spektrumot torzító tényezők:

a) Helytelenül megválasztott résszélesség, ill. spektrális sávszélesség. Ezzel a kérdéssel a 2.4. fejezet monokromátorokkal foglalkozó alfejezetében, valamint a 2.9. fejezetben foglalkozunk részletesen. A gyógyszer-analitikai feladatok túlnyomó többségének vizsgálatára megfelelnek a 2 nm spektrális sávszélességgel dolgozó készülékek, finomszerkezettel rendelkező spektrumok esetében azonban ennél jobb felbontásra is szükség lehet, amint ezt a 2/16. ábrán flumecinol példáján bemutatjuk.



2/16. ábra. Flumecinol spektrumai különböző spektrális sávszélesség mellett. Oldószer: hexán; $c = 0{,}27$ mg/ml.

a) 0,6 nm; *b)* 1,0 nm; *c)* 2,0 nm; *d)* 3,0 nm

A kvantitatív analitikai célokra kiválóan alkalmas, 5 nm-es vagy egyes esetekben még ennél is nagyobb spektrális sávszélességgel dolgozó spektrofotométereken felvett spektrumok csak arra alkalmasak, hogy megkeressük a kvantitatív mérésre megfelelő hullámhosszakat, a spektrumok azonban dokumentálásra semmi esetre sem alkalmasak.

b) A szórt fény. Ennek spektrumtorzító hatásával a 2.10. fejezetben foglalkoztunk.

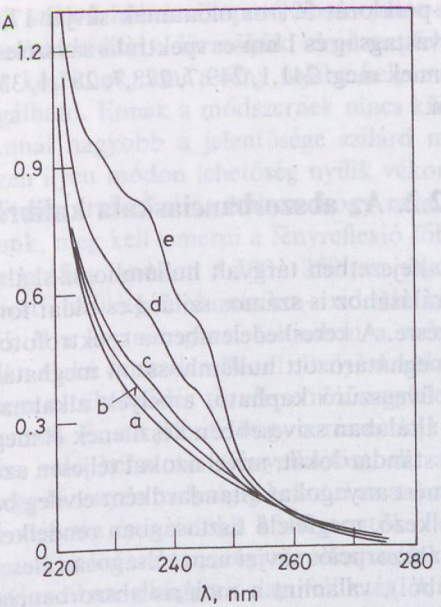
c) Helytelenül megválasztott időállandó, ill. túlságosan nagy felvételi sebesség. Lásd 52. oldal.

d) Túlságosan alacsony jel—zaj viszony. Ezzel a kérdéssel, ill. más paraméterekkel való összefüggéseivel a korábbi fejezetekben több helyen foglalkoztunk.

e) Egysugármenetes készüléken, pontonként történő spektrumfelvétel esetén torzító tényező a szükségesnél ritkábban leolvasott abszorbancia.

f) Nem megfelelően kalibrált készülék alkalmazása. Ezzel a kérdéssel a következő fejezetben foglalkozunk.

g) Nem megfelelően tiszta anyag spektrumának felvétele. Különösen kis intenzitású spektrumok, ill. a spektrumok kis intenzitású szakaszain okozhat durva hibát igen kis mennyiségű erősen abszorbeáló szennyezés jelenléte. Egy ilyen esetet mutatunk be a 2/17. ábrán, ahol látható, hogy etinodiol-diacetát spektrumában 0,1%-nyi 17α-entinil-3,5-ösztradién-17β-ol-acetát szennyezés torzító hatása már jól észlelhető, 0,5—1% szennyezés pedig már jól definiált látszólagos sávokat hoz létre etinodiol-diacetát spektrumában. A szennyezés jellegzetes spektrumát a 77. oldalon, a 3/6*a* ábrán mutatjuk be.



2/17. ábra. 17α-etinil-3,5-ösztradién-17 β-ol-acetáttal szennyezett etinodiol-diacetát spektrumai. Oldószer: etanol; $c = 0{,}998$ mg/ml.

Szennyezés: *a)* 0,085%; *b)* 0,17%; *c)* 0,43%; *d)* 0,85%; *e)* 1,7%

2.12. A spektrofotométerek kalibrálása

2.12.1. A hullámhossz-skála kalibrálása

A hullámhossz-skála pontosságát a gyártó cégek általában néhány tized nm-re garantálják. Huzamos használat után azonban szükségessé válik a leolvasott hullámhosszértékek helyességének időnkénti ellenőrzése. Erre két lehetőség áll rendelkezésre: pontosan ismert hullámhosszokon emittáló fényforrások vagy pontosan ismert hullámhosszokon elnyelő standardok alkalmazása.

Az előbbi lehetőség legegyszerűbb kihasználása a spektrofotométerek saját deutériumlámpájának 486,02 és 656,10 nm-nél található éles vonalára való kalibrálás. A széles körben használatos közepes nyomású higanygőzlámpa 253,7, 364,9, 404,5, 435,8, 546,1, 576,9 és 579,0 nm-nél megjelenő vonalai ugyancsak kitűnő lehetőséget biztosítanak a kalibrálásra.

Igen kiterjedten alkalmazzák a hullámhossz-skála ellenőrzésére a különböző ritkaföldfém-ionokat tartalmazó üvegeket (holmiumüveg, didimiumüveg), amelyek számos sávot tartalmaznak az ultraibolya és a látható tartományban. Reprodukálhatóbb és élesebb sávokat lehet nyerni oldatok alkalmazása esetén. A BURGESS [1] által

javasolt holmium(III)-perklorát 5%-os oldatának sávjai 17,5%-os perklórsavas oldatban 10 nm-es rétegvastagság és 1 nm-es spektrális sávszélesség mellett a következő hullámhosszaknál jelennek meg: 241,1, 249,7, 278,7, 287,1, 333,4, 345,5, 361,5, 385,5, 416,3, 450,8, 485,8 nm.

2.12.2. Az abszorbanciaskála kalibrálása

Akárcsak az előző alfejezetben tárgyalt hullámhossz-skála ellenőrzéséhez, az abszorbanciaskála kalibrálásához is számos szilárd és oldat formájában alkalmazható standard áll rendelkezésre. A kereskedelemben a spektrofotométerek tartozékaként, ill. önállóan számos meghatározott hullámhosszon meghatározott névleges abszorbanciával rendelkező üvegszűrő kapható, amelyek alkalmasak a kalibrálásra. Az analitikusok azonban általában szívesebben készítenek el megfelelő anyagok oldásával saját abszorbancia standardokat, mivel azokat teljesen azonos körülmények közt vizsgálhatjuk, mint a mért anyagokat. Standardként elvileg bármely megfelelő hő- és fénystabilitással rendelkező, megfelelő tisztaságban rendelkezésre álló anyag számításba jöhet, amelynek abszorpciós sávjai nem túlságosan élesek (a résszélességtől való függés elkerülése céljából), valamint a moláris abszorbancia érték nem túlságosan magas (a többszöri hígításból eredő hiba kiküszöbölése céljából). Az oldattal való kalibrálásnak az az előnye is megvan, hogy — amennyiben olyan anyagot választunk, amely követi a Beer-törvényt — különböző hígítású oldalsorozat vizsgálatával a készülék detektorának linearitását is ellenőrizhetjük.

A legáltalánosabban használt kalibráló anyag a kálium-dikromát, ami megfelelően tiszta állapotban kerül forgalomba, s így 110 °C-on 1 óráig való szárítás után felhasználható. A kalibrálás céljából általában 0,02—0,1 g/l koncentrációjú oldatokat készítenek 0,01 n kénsavban. Ilyen körülmények közt a moláris abszorbancia a 257 nm-es maximumnál 4210, 350 nm-nél pedig 3170. A savkoncentráció pontos beállítása fontos tényező, mivel az adott körülmények közt a krómsav disszociációs egyensúlyai, valamint a dimerizációs egyensúly miatt a spektrum pH-függő. Ilyen problémával nem találkozunk, ha a mérést 0,05 n kálium-hidroxidban végezzük el, ilyen körülmények között ui. már csupán CrO_4^{2-}-ionok vannak jelen az oldatban ($\varepsilon_{273}=3700$, $\varepsilon_{372}=4810$). A megadott moláris abszorbancia értékek Burgess és Knowles könyvében [5] összegyűjtött nagyszámú adat feldolgozásából származnak. Ez a könyv számos további hullámhossz és abszorbancia kalibrációs módszert is tartalmaz.

2.13. A fényreflexió mérése

Az eddigiek során kizárólag olyan esetekkel foglalkoztunk, amikor a vizsgálandó anyag oldott formában van jelen a vizsgálat során. A gyógyszer-analitikai gyakorlatban időnként szilárd halmazállapotban jelenlevő anyag vizsgálatával is foglalkozni kell. Az infravörös spektroszkópiában kialakult mérési technika alkalmazásával

felvehető szerves anyagok szilárd halmazállapotú abszorpciós spektruma is [14]. A vizsgálandó anyagot kálium-kloriddal eldörzsöljük, majd megfelelő nyomás alkalmazásával átlátszó pasztillát készítünk, ami a fény útjába helyezve a küvettában levő oldathoz hasonlóan vizsgálható. Ennek a módszernek nincs különösebb gyógyszeranalitikai jelentősége. Annál nagyobb a jelentősége szilárd minták fényreflexiója tanulmányozásának, hiszen ilyen módon lehetőség nyílik vékonyréteg-kromatogramok kvalitatív és kvantitatív értékelésére. Ahhoz, hogy ezzel a kérdéssel az 5.5. fejezetben foglalkozhassunk, meg kell ismerni a fényreflexió főbb törvényeit.

A vékonyréteg-kromatográfiás lapokon a 100—250 μm vastagságú réteg 10 μm nagyságrendű szemcseméretű szilikagél, alumínium-oxid stb. szemcsékből áll, amelyek felületén helyezkedik el a kromatogram foltjaiban a vizsgálandó elválasztott anyag. A réteg szabálytalan alakú és rendezetlenül elhelyezkedő szemcséiről a rétegre eső fény természetesen nem a tükröződés törvényeinek megfelelően verődik vissza, hanem diffúz reflexiót szenved. Ez azt jelenti, hogy a részecskéken való (többszörös) fényvisszaverődés, azokba való behatolás (fényelhajlás), ill. a részecskék közötti fényelhajlás során a fény egy bizonyos mélységig behatol az anyagba, majd onnan, ill. a legnagyobb behatolási mélység és a felület közti pontok valamelyikéről a fenti jelenségek következtében, amit közös néven fényszóródásnak tekinthetünk, visszafordul és a tér különböző irányaiban elhagyja a lap felületét. A visszasugárzott fény intenzitása és az intenzitás térbeli eloszlása függ a besugárzás szögétől. Amennyiben a besugárzás a lapra merőleges, a reflektált fény intenzitása maximális és megközelítően félgömbszimmetrikus, ezért általában merőleges besugárzás mellett végezzük a vizsgálatokat. Meg kell jegyezni, hogy a vékonyréteg-kromatográfiában az alkalmazott rétegek vastagsága kisebb, mint a fent említett maximális behatolási mélység. Ez azt jelenti, hogy a fény jelentős része eljut a réteg túlsó oldalára. Amennyiben tehát látható fényben dolgozunk, és a réteget üveg vagy átlátszó és színtelen műanyag lap hordozza, transzmissziós üzemmódban is dolgozhatunk. Ez esetben a rendszer többékevésbé követi a Lambert—Beer-törvényt, és így ez a vizsgálat alapját képezheti kvalitatív és kvantitatív méréseknek is (lásd 5.5. fejezet).

Ami az abszorbeáló anyag jelenlétében reflektált fény intenzitását illeti, arra közvetlenül nem alkalmazható a Lambert—Beer-törvény. Az összefüggést a reflektált fény intenzitása (R_∞)*, valamint a rendszer abszorpciós (K) és szórási (S) koefficiensei között a Kubelka—Munk-egyenlet [4] fejezi ki:

$$\frac{K}{S} = \frac{(1-R_\infty)^2}{2R_\infty}. \qquad (2/19)$$

Míg S értéke csupán a részecskék számától, méretétől, alakjától és törésmutatójától függ, és független a felületén levő kismennyiségű, kromatográfiásan elválasztott anyagtól, addig K értéke függ az utóbbi mennyiségétől, moláris abszorpciós koefficiensétől (így természetesen a hullámhossztól is).

* A ∞ index azt fejezi ki, hogy az összefüggés arra az esetre vonatkozik, amikor a réteg olyan vastag, hogy a teljes reflektált fénymennyiség diffúz reflexiót szenved, kizárva a réteg hátlapjáról való visszaverődést.

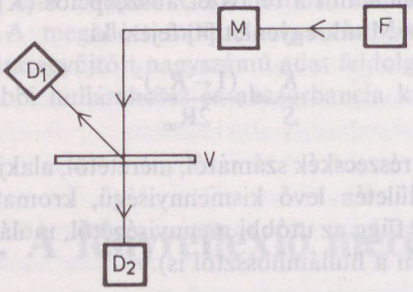
A transzmittancia analógiájára (2/11 egyenlet), ami az elnyelő testről (oldat, vékonyréteg stb.) távozó, legyengített és a testre beeső eredeti fénysugár intenzitásainak hányadosa, bevezethető a reflektancia (R) fogalma is:

$$R = \frac{I_R}{I_0}, \qquad (2/20)$$

ahol I_R a diffúzan reflektált fénysugár intenzitása, I_0 pedig a mintára beeső fénysugár intenzitása.

A reflektancia mérésével kapcsolatban sok az analógia a transzmittanciával, de jelentős különbségek is vannak. Amíg a transzmittancia mérése során a teljes legyengített fénysugár eljut a detektorra, addig a reflektancia mérése során a már leírt meggondolások alapján a lapra merőlegesen besugárzott fényből reflektált hányad félgömbszimmetrikusan minden irányban sugárzik, s így a 2/18. ábrán feltüntetett szokásos elrendezésben a lapra 45°-os szögben elhelyezett detektor az összes visszavert fénynek csak egy tört részét érzékeli. R azonban így is meghatározható, ha úgy járunk el, hogy I_R mérését megelőzően a kromatogram elválasztott anyagot nem tartalmazó, „üres" részét helyezzük a besugárzó fénycsík alá, és I_0-nak a fentiekkel teljesen azonos elrendezés mellett a detektorra jutó fénysugár intenzitását tekintjük. Ilyen módon kompenzálunk minden olyan fénygyengítő hatást is, ami nem a kromatogramon elválasztott, mérendő anyagtól származik, így elsősorban az adszorbensek 400 nm alatt a hullámhosszal erősen csökkenő reflektanciájából származó hatást. Ez a megközelítés analógnak tekinthető a transzmittancia, ill. abszorbancia mérése során az oldószer saját fényelnyelésének kiejtését eredményező eljárással (lásd 2/17 egyenlet), amikor is a mérés során a tiszta oldószert tartalmazó küvettára nullázunk.

Szilárd minták diffúz reflexiójának tanulmányozására számos, kereskedelemben kapható spektrofotométert láttak el ezt lehetővé tevő adapterrel. Kromatogramok értékelésére azonban speciális (elsősorban sokkal nagyobb érzékenységű) műszerre van szükség, hiszen az ott elválasztott mikrogramm, ill. szubmikrogramm nagyságrendű mennyiségek detektálása különösen az ultraibolya tartományban, ahol az



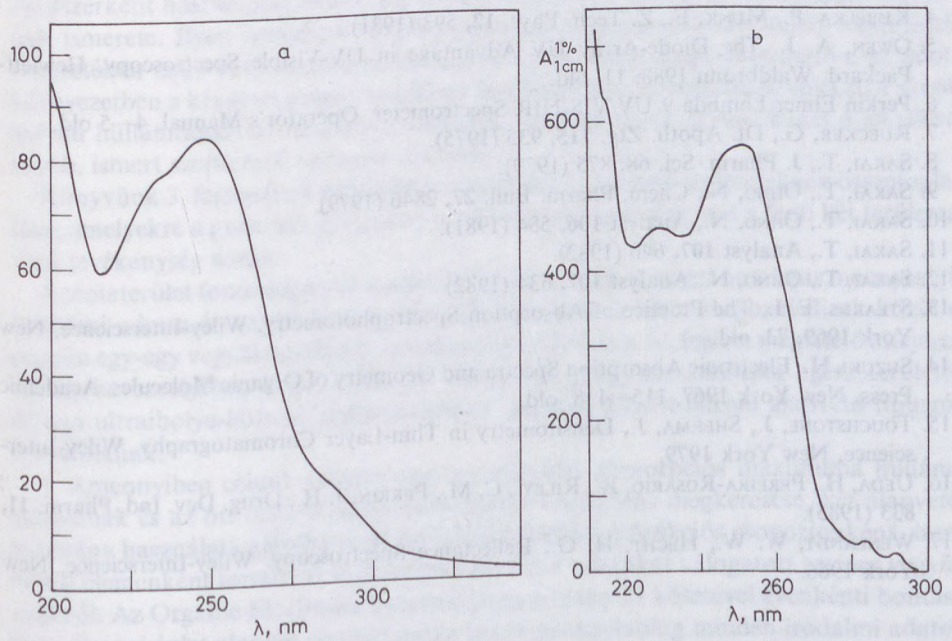
2/18. ábra. Reflexiós és transzmissziós üzemmódban dolgozó kromatogram spektrofotométer optikai sémája.

F: fényforrás; *M:* monokromátor; *V:* vékonyréteg-kromatogram; D_1: reflexiós üzemmód detektora; D_2: abszorpciós üzemmód detektora

adszorbensek reflexiója erősen csökken, igen nagy érzékenységű detektorra és kedvező jel—zaj viszonyt nyújtó optikai és elektronikus rendszerre van szükség.

A kromatogramok tanulmányozására szolgáló denzitométerek (amelyeket a legfejlettebbek esetében egyre gyakrabban kromatogram-spektrofotométernek neveznek), a 2.4. fejezetben ismertetettekkel lényegében megegyező elemekből épülnek fel. Fényforrásként deutérium-, higany- és volfrámlámpákat használnak; számos olcsó fényszűrős készülék mellett prizmás, ill. rácsos monokromátorral ellátott készülékek állnak rendelkezésre. A detektor általában elektronsokszorozó. Reflektancia mérésére általában a 2/18. ábrán megadott elrendezést használják, a fejlettebb készülékek azonban fel vannak szerelve transzmittancia és fluoreszcencia, sőt a fenti három mennyiség közül 2-2 szimultán mérésére is. Forgalomban vannak egysugármenetes és kétsugármenetes készülékek is.

Pontonkénti regisztrálás alkalmazásával még a megfelelő monokromátorral ellátott egysugármenetes készülékekkel is lehetséges akár nanogramm nagyságrendű mennyiségben elválasztott anyagok reflexiós spektrumainak felvétele, a kétsugármenetes készülékek esetében azonban ez kényelmesebben és pontosabban végezhető el. A reflexiós spektrumok szoros korrelációban vannak az oldatfázisban felvett abszorpciós spektrumokkal (lásd a 2/19. ábra példáján). Ennek természetesen igen nagy a jelentősége az elválasztott anyagok, szennyezések, bomlástermékek szerkezetének felderítésében. Még nagyobb azonban a jelentősége a kromatogramok kvantitatív értékelésének. Az elmúlt években számos kísérlet történt a Kubelka—Munk-egyenlet



2/19. ábra. Cinnarizin reflexiós és abszorpciós spektrumainak összehasonlítása.
a) Reflexiós spektrum, *b)* abszorpciós spektrum, oldószer: etanol

átalakítására kromatogramok értékelésének céljaira, ill. a koncentráció—jel függvényének számítógépes linearizálására. A modern vékonyréteg-kromatográfiás technikák és a korszerű, nagy érzékenységű denzitométerek lehetővé teszik nanogramm nagyságrendű anyagmennyiségek vizsgálatát. Ebben a koncentrációtartományban igen gyakran jó közelítésben lineáris összefüggés érhető el a foltban levő anyag mennyisége és annak a kromatográfiás csúcsnak magassága vagy görbe alatti területe között, amit úgy kapunk, hogy az üres kromatogramszakaszra nullázott készülék fényforrása alatt egy motor segítségével elhúzzuk a foltot tartalmazó kromatogramszakaszt, és a reflektanciát regisztráljuk. A kérdés részleteivel és gyakorlati alkalmazásaival az 5.5. fejezetben foglalkozunk.

Az utóbbi fejezet irodalmán túlmenően a reflexiós spektroszkópia elméleti alapjait illetően elsősorban WENDLANT és HECHT [17], valamint STEARNS [13] monográfiájára, az elméletnek kromatogramokra való alkalmazásával kapcsolatban pedig a TOUCHSTONE és SHERMA [15] által szerkesztett könyvre utalunk.

Irodalom

1. BURGESS, C., UV Spec. Grp. Bull **5,** 77 (1977).
2. BURGESS, C., KNOWLES, A., Standards in Absorption Spectrometry. Chapman and Hall, London, New York 1981.
3. KNOWLES, A., BURGESS, C. (ed.), Practical Absorption Spectrometry. Chapman, London—New York 1984.
4. KUBELKA, P., MUNK, F., Z. Tech. Phys. **12,** 593 (1931).
5. OWEN, A. J., The Diode-Array UV Advantage in UV-Visible Spectroscopy, Hewlett-Packard, Waldbronn 1988, 11. old.
6. Perkin Elmer Lambda 9 UV/VIS/NIR Spectrometer. Operator's Manual, 4—5 old.
7. RUECKER, G., Dt. Apoth. Ztg. **115,** 935 (1975).
8. SAKAI, T., J. Pharm. Sci. **68,** 875 (1979).
9. SAKAI, T., OHNO, N., Chem. Pharm. Bull. **27,** 2846 (1979).
10. SAKAI, T., OHNO, N., Analyst **106,** 584 (1981).
11. SAKAI, T., Analyst **107,** 640 (1982).
12. SAKAI, T., OHNO, N., Analyst **107,** 634 (1982).
13. STEARNS, E. I., The Practice of Absorption Spectrophotometry. Wiley-Interscience, New York 1969, 73. old.
14. SUZUKI, H., Electronic Absorption Spectra and Geometry of Organic Molecules. Academic Press, New York 1967, 115—118. old.
15. TOUCHSTONE, J., SHERMA, J., Densitometry in Thin-Layer Chromatography. Wiley-Interscience, New York 1979.
16. UEDA, H., PEREIRA-ROSARIO, R., RILEY , C. M., PERRIN, J. H., Drug. Dev. Ind. Pharm. **11,** 833 (1985).
17. WENLANDT, W. W., HECHT, H. G., Reflectance Spectroscopy. Wiley-Interscience, New York 1966.

3. Kvalitatív analízis. Összefüggés gyógyszervegyületek szerkezete és spektruma között

3.1. A szerkezet—spektrum összefüggés tanulmányozásának jelentősége. Spektrumgyűjtemények

A gyakorlatban dolgozó gyógyszer-analitikusnak két szempontból is fontos, hogy ismerje a szerkezet—spektrum összefüggések alapjait.

a) Amint arra már az 1.2. fejezetben is rámutattunk, a nagyobb teljesítőképességű spektroszkópiai módszerek, az infravörös, mágneses rezonancia és tömegspektroszkópia, valamint a röntgendiffraktometria mellett az ultraibolya-látható spektroszkópia is fontos kiegészítő (bizonyos esetekben alapvetően fontos) információkat szolgáltat a gyógyszerkutatás termékeinek és intermedierjeinek, gyógyszerek izolált szennyezéseinek, bomlástermékeinek stb. szerkezetfelderítéséhez.

b) Amennyiben a spektrofotometriát kizárólagosan csak kvantitatív analitikai módszerként használjuk, akkor is fontos a szerkezet—spektrum összefüggés alapjainak ismerete. Ilyen ismeretek birtokában ui. a meghatározandó anyag képletének ismeretében nagy valószínűséggel megjósolhatjuk, hogy meghatározható-e az adott környezetben a kérdéses anyag: rendelkezik-e megfelelő intenzitású sávokkal, a sávok milyen hullámhossztartományban várhatók, várható-e ott zavaró hatás a jelenlevő egyéb, ismert szerkezetű anyagok részéről.

Könyvünk 3. fejezetének célkitűzése azoknak az alapvető ismereteknek összefoglalása, amelyekre a gyakorló gyógyszer-analitikusnak szüksége van a fenti két területen való tevékenység során.

A tématerület fontosságának megfelelően ezt a tevékenységet hatalmas mennyiségű irodalmi adatra és nagyszámú gyűjteményes munkára lehet alapozni. Ezek közül a csupán egy-egy vegyületcsaládra vonatkozó munkákat a 10. fejezet megfelelő alfejezeteinek bevezetőjében ismertetjük. A szerves és gyógyszer-analitika egész területét átfogó ultraibolya-látható spektroszkópiai munkák között három alapvető típusról beszélhetünk.

1. Amennyiben célunk csupán egy-egy vegyület abszorpciós maximuma hullámhosszának és az ott mért moláris abszorpciós koefficiens megkeresése, két alapvető kiadvány használata ajánlható. Hirayama [13] könyve funkciós csoportonként, szerkezeti elemenként tartalmaz táblázatos formában adatokat válogatott szerves vegyületekről. Az Organic Electronic Spectral Data a maga 27 kötetével évenkénti bontásban, összegképlet alapján csoportosítva közöl gyakorlatilag minden irodalmi adatot [20].

2. A teljes spektrumokat közlő atlaszok és sorozatok közül mind a válogatás

gondosságát, mind az eredmények megbízhatóságát és kezelhetőségét illetően kiemelkedik LÁNG 24 kötetes sorozata [17], amely a többi között igen nagyszámú gyógyszer, ill. gyógyszer-analitikai szempontból fontos egyéb vegyület spektrumait is tartalmazza. Az UV Atlas of Organic Compounds [21], a SADTLER [25] és a HERSHENSON [12] spektrumgyűjtemények is számos, gyógyszer-analitikai szempontból is fontos adatot tartalmaznak. A gyógyszerekre specializált összeállítások közül kiemelkedik DIBBERN [9] háromkötetes atlasza, amely valamennyi fontosabb gyógyszer spektrumát és táblázatos összegyűjtött spektrumadatait tartalmazza. Elsősorban a toxikológiai analízis igényeit szem előtt tartva szerkesztették könyveiket SUNSHINE [30] és CLARKE [8]. Ezek ugyancsak számos hasznos adatot tartalmaznak.

3. A szerkezet—spektrum összefüggésekkel foglalkozó nagyszámú monográfia közül kiemeljük SCOTT [26], RAO [24], valamint STERN és TIMMONS [28] műveit, mivel ezek tárgyalásmódja áll a legközelebb a gyakorlati gyógyszer-analitikus igényeihez. Számos monográfia foglalkozik a kérdéskör elméleti alapjaival is [4, 5, 14, 31].

Könyvünk keretei természetesen nem teszik lehetővé az erről a szakterületről publikált hatalmas számú közlemény feldolgozását. Feltétlenül említést érdemel azonban KRÁCMAR és KRÁCMAROVÁ „Ultraibolya spektrofotometria a gyógyszerellenőrzésben" c. sorozata, amely valamennyi fontosabb gyógyszervegyületről közöl értékelt spektrumot. A Die Pharmazie és a Ceskoslovenska Farmacie c. folyóiratokban megjelent 51 közlemény közül a rövidség kedvéért itt csak a sorozat első és utolsó tagjának adatait közöljük [15, 16].

A könyvünk 3. fejezetében bemutatott spektrumok közül azok, amelyek ábraszövege nem tartalmaz irodalmi hivatkozást, túlnyomó részben a laboratóriumunkban működő Varian DMS-200, kisebb részben pedig (régebbi felvételek) Pye-Unicam SP-1800 spektrofotométeren készült felvételek. (Ez vonatkozik a könyv többi fejezetének néhány spektrumára is.) A szövegben megadott maximum és abszorpciós koefficiens adatok — amennyiben azt külön nem jelezzük — a [8, 13, 26, 28, 30] számon hivatkozott művekből származnak.

Ami a szerkezet—spektrum összefüggések tárgyalásmódját illeti, az alapvetően kvalitatív és empirikus lesz. Az egzakt matematikai alapokon álló kvantumkémiai tárgyalásmódot egyrészt azért mellőztük, mivel ez túllépné könyvünk kereteit, célkitűzéseinket pedig ezzel a leegyszerűsített tárgyalásmóddal is el lehetett érni. Másrészt megállapítható, hogy az egzakt kvantumkémiai kezelés csak egyszerűbb molekulák esetén ad meggyőző eredményeket. A gyógyszermolekulák túlnyomó részére jellemző bonyolultabb szerkezet kvantitatív kezeléséhez szükséges matematikai apparátus rohamosan nő a szerkezet bonyolultságával, s így ezek az eredmények a gyakorlati analitikus számára nehezen hozzáférhetőek.

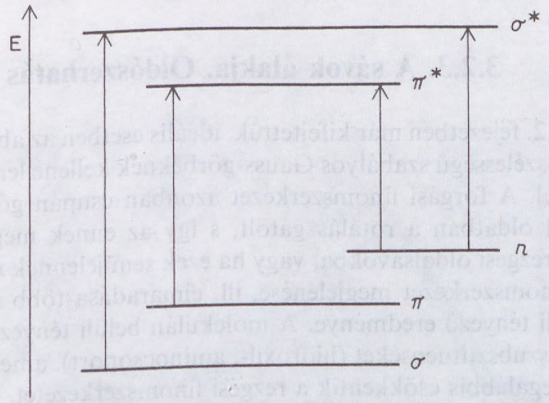
3.2. Az abszorpciós sávok jellemzése

A szerkezet—spektrum összefüggés alapjainak megismerése céljából át kell tekintenünk azokat a tényezőket, amelyek összefüggésbe hozhatók a vizsgált molekulában jelenlevő szerkezeti elemekkel. Ezek: a sáv létrejöttében szerepet játszó elektronok jellege, a sáv helyzete, intenzitása és alakja.

3.2.1. A sávok eredete és helyzete

A 2.2. fejezetben általánosságban már megtárgyaltuk ultraibolya-látható spektrumok létrejöttét elektronoknak a fény hatására magasabb energiájú pályára való gerjesztése révén. Szerves vegyületekben a gerjesztés szempontjából számításba vehető elektronok lehetnek egyes kötéseket létrehozó σ molekulapályán levő, kis energiatartalmú, erősen kötött, nehezen gerjeszthető elektronok, szén—szén, ill. szén—hetero atom közti kettős, ill. hármas kötéshez tartozó nagyobb energiatartalmú, lazábban kötött, könnyebben gerjeszthető π-elektronok, valamint heteroatomok (oxigén, kén, nitrogén, halogének stb.) kötésben nem levő, magános elektronpárjai (n elektronok).

A fényelnyelés során ez a háromféle elektron a nagyobb energiájú σ^* vagy π^* molekulapályákra gerjesztődhet. Az átmenetek energiaviszonyairól a 3/1. ábra ad sematikus képet. A legnagyobb energia a $\sigma-\sigma^*$ átmenet során abszorbeálódik: az ilyen átmenetek a vákuum ultraibolya tartományba esnek. A kisebb energiakülönbséggel végbemenő $\pi-\pi^*$ átmenetek a rövidhullámú, míg a még kisebb energiájú $n-\pi^*$ átmenetek a hosszúhullámú ultraibolya tartományban észlelhető sávok alakjában jelennek meg. A szén—heteroatom egyes kötéssel rendelkező molekulák gerjesztése során keletkező $n-\sigma^*$ sáv az ultraibolya tartomány különböző helyein jelenhet meg. A sávok megjelenési helyét (hullámhosszát) természetesen befolyásolja az érintett elektronpár környezete a molekulában, ill. azon kívül, különösen pedig konjugációs hatások (lásd 3.5. fejezet).



3/1. ábra. Különböző típusú elektrongerjesztések energiasémája

3.2.2. A sávok intenzitása

Míg a sáv hullámhosszát az elektron alapállapota és gerjesztett állapota közti energiakülönbség határozza meg, addig a sáv intenzitása függ az időegység alatt bekövetkező elektronátmenetek számától, ez pedig egyrészről attól függ, milyen nagy az ütközési keresztmetszete a fotont abszorbeáló molekularészletnek, másrészről mi

a valószínűsége annak, hogy a fotonnal való ütközés során valóban gerjesztés játszódik le. Ezt fejezi ki a (3/1) egyenlet:

$$\varepsilon = k \cdot P \cdot a, \qquad (3/1)$$

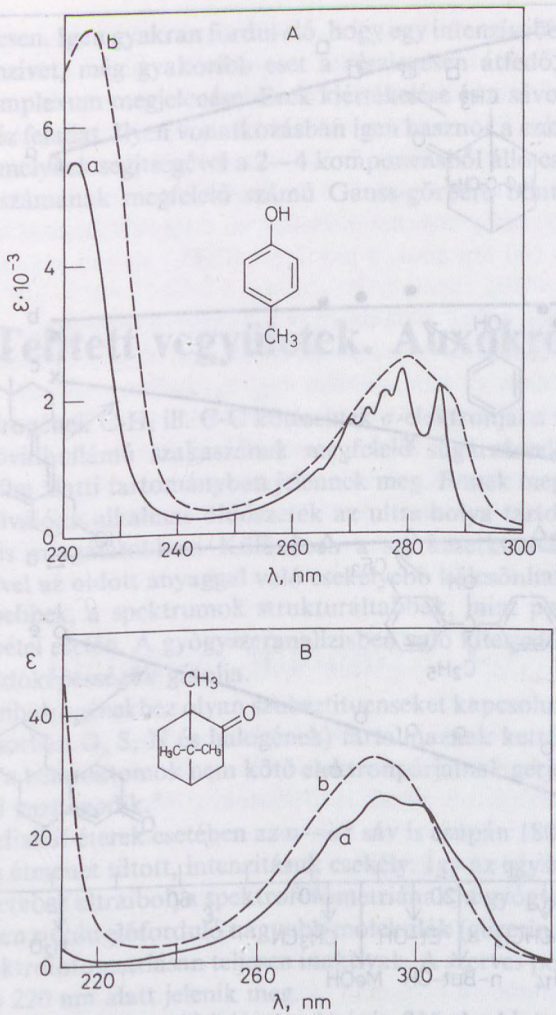
ahol ε a moláris abszorpciós koefficiens (lásd 26. oldal), k arányossági tényező, amelynek értéke kb. 10^{20}, P az átmenet valószínűsége (értéke 0 és 1 közt változhat), a pedig az említett ütközési keresztmetszet, ami egy átlag abszorbeáló molekula esetében 10^{-15} cm^2 nagyságrendben mozog. Ha P értékét egységnek vesszük (valamennyi ütközés abszorpcióhoz vezet), a moláris abszorpciós koefficiensre 10^5 nagyságrendű értéket kapunk. A spektroszkópiai gyakorlatban észlelt legnagyobb moláris abszorpciós koefficiensek valóban néhány százezres értékek. ε értékének szóródása az egyes és százezres nagyságrend között elsősorban P változásából következik. A tízezernél nagyobb moláris abszorpciós koefficienssel rendelkező sávokat tekintik általában intenzív sávoknak, az ezer és tízezer köztieket közepes, az ezernél kisebb intenzitásúakat pedig gyenge sávoknak. A gyenge sávok ($P<0{,}01$) általában ún. tiltott sávok, vagyis a kvantumkémia kiválasztási szabályai szerint tiltott elektronátmenetnek felelnek meg.

3.2.3. A sávok alakja. Oldószerhatás

Amint azt a 2.2. fejezetben már kifejtettük, ideális esetben az abszorpciós sávoknak igen kis félérték-szélességű szabályos Gauss-görbéknek kellene lenni rezgési és forgási finomszerkezettel. A forgási finomszerkezet azonban csupán gőzfázisban tanulmányozható, mivel oldatban a rotálás gátolt, s így az ennek megfelelő melléksávok beleolvadnak a rezgési oldalsávokba, vagy ha ezek sem jelennek meg, a főmaximumba. A rezgési finomszerkezet megjelenése, ill. elmaradása több molekulán belüli és molekulán kívüli tényező eredménye. A molekulán belüli tényezők közül megemlíthetjük a poláris szubsztituenseket (hidroxil-, aminocsoport), amelyek általában megszüntetik vagy legalábbis csökkentik a rezgési finomszerkezetet. A molekulán kívüli tényezők közül a hőmérséklet jelentős csökkentése elősegíti a finomszerkezet megjelenését. Ennél lényegesebb az oldószer hatása. Az oldott molekulával kölcsönhatásba nem lépő, apoláris oldószerek kedveznek a finomszerkezet megjelenésének, míg a poláris oldószerekben az gyakran inflexiókká degradálódik vagy teljesen beleolvad a fősávba. Ennek illusztrálására a 3/2. ábrán bemutatjuk *p*-krezol és kámfor spektrumait apoláris és poláris oldószerekben.

Az ismertetett hatáson túlmenően az oldószerhatás bizonyos sávok eltolódását is eredményezheti, és ennek az eltolódásnak iránya értékes adatokat szolgáltathat az elektronátmenetnek a sávhoz való hozzárendeléséhez.

Az eltolódások jellemzésére szolgáló kifejezések a következők. Ha egy sáv a környezet megváltozásának vagy egy kémiai reakciónak hatására a hosszabb hullámok irányába tolódik el, batokróm, ha a rövidebbek irányába, hipszokróm, ha az intenzitása növekszik, hiperkróm, ha csökken, akkor hipokróm eltolódásról beszélünk. Így pl. az $n-\pi^*$ átmenetnek megfelelő sáv hipszokróm eltolódást szenved, ha az oldószer polaritását növeljük, ugyanakkor a $\pi-\pi^*$ átmenetnek megfelelő sáv esetében bato-

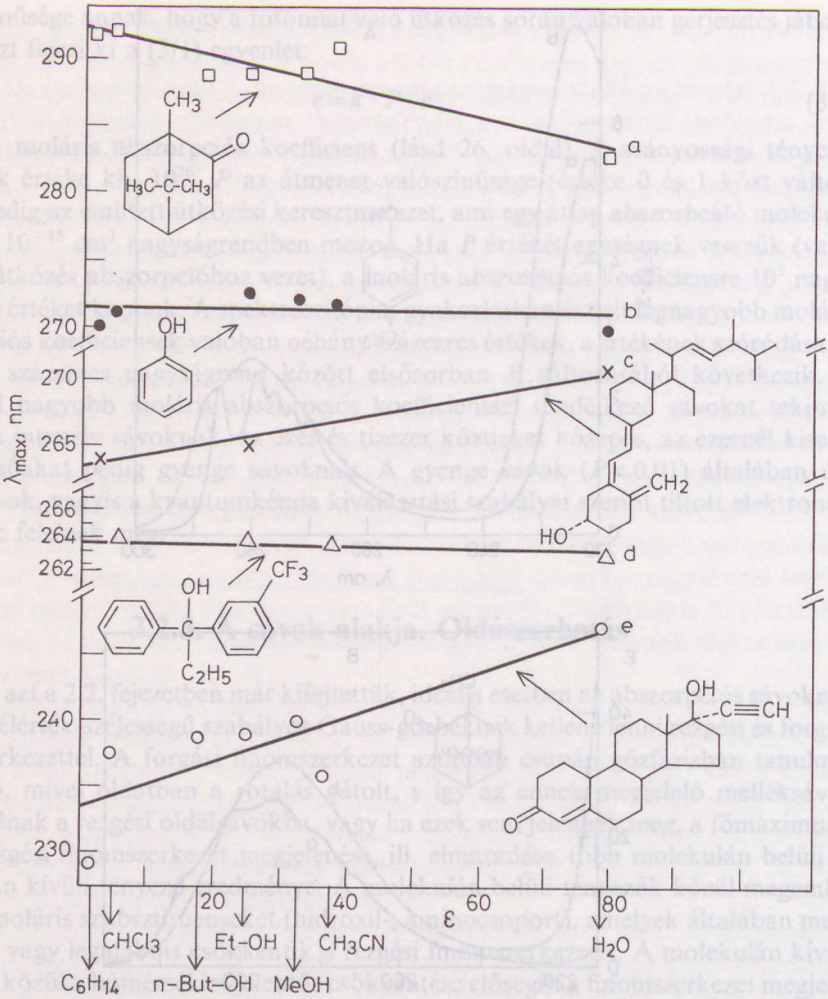


3/2. ábra. Az oldószer hatása abszorpciós sávok finomszerkezetére.

A) p-Krezol. Oldószer: *a)* izooktán; *b)* etanol (N. D. COGGLESHALL, E. M. LANG, J. Am. Chem. Soc. **70,** 3283 (1948)). *B)* Kámfor. Oldószer: *a)* hexán; *b)* metanol

króm eltolódást észlelünk. Ez utóbbi alól kivétel is van: éppen a nagy fontosságú aromás vegyületek 260 nm körüli sávja, amely nem mutat számottevő oldószerhatást.

A fentieket a 3/3. ábrán mutatjuk be. Látható kámfor $n-\pi^*$ sávjának hipszokróm eltolódása az oldószer dielektromos állandója növekedésének hatására, továbbá a 3 konjugált kettős kötést tartalmazó D_2-vitamin és az α, β-telítetlen ketoncsoportot tartalmazó noretiszteron $\pi-\pi^*$ sávjainak gyenge, ill. igen erős batokróm eltolódása hasonló változás hatására. Látható az is, hogy a poláris szubsztituenst nem tartalma-



3/3. ábra. Az oldószer hatása abszorpciós sávok helyzetére: néhány vegyület abszorpciós maximumának hullámhossza az oldószer dielektromos állandójának függvényében.

a) Kámfor; *b)* fenol; *c)* D_2-vitamin; *d)* flumecinol; *e)* noretiszteron

zó aromás flumecinol és az auxokróm hidroxilt tartalmazó fenol spektrumainak maximumhelyei nem mutatnak említésre méltó oldószerhatást.

Az eddig leírtakból következik, hogy szerves vegyületek spektrumai általában többé-kevésbé kiszélesedett sávokból állnak (félértékszélesség 20—40 nm). Mivel még egy közepesen bonyolult szerkezetű gyógyszermolekula is az esetek nagy részében több, az ultraibolya-látható tartományban gerjeszthető elektront tartalmaz, ill. egy adott kötési rendszerhez tartozó elektronok többféleképpen gerjeszthetők, egy anyag spektruma általában több sávból áll, s ezek a széles sávok csak ritkán válnak el

egymástól tökéletesen. Igen gyakran fordul elő, hogy egy intenzívebb sáv teljesen elfed egy kevésbé intenzívet, még gyakoribb eset a részlegesen átfedő, csúcsokból álló aszimmetrikus komplexum megjelenése. Ezek kiértékelése és a sávok hozzárendelése gyakran igen nehéz feladat. Ilyen vonatkozásban igen hasznos a számítógépes konvolúciós technika, amelynek segítségével a 2—4 komponensből álló csúcskomplexumot a komponensek számának megfelelő számú Gauss-görbére bonthatjuk szét (lásd 4.4.3. fejezet) [6].

3.3. Telített vegyületek. Auxokrómok

Telített szénhidrogének C-H, ill. C-C kötéseinek σ-elektronjai a vákuum ultraibolya tartomány rövidhullámú szakaszának megfelelő sugárzással gerjeszthetők; a $\sigma-\sigma^*$ sávok 160 nm alatti tartományban jelennek meg. Ennek megfelelően a telített szénhidrogének kiválóan alkalmas oldószerek az ultraibolya tartományban végzett spektrofotometriás vizsgálatokhoz. Különösen a szerkezetkutatásban célszerű az alkalmazásuk, mivel az oldott anyaggal való csekélyebb kölcsönhatásuk eredményeként a sávok élesebbek, a spektrumok strukturáltabbak, mint poláris oldószerben való spektrumfelvétel esetén. A gyógyszeranalízisben való kiterjedtebb alkalmazásukat korlátozott oldóképességük gátolja.

Ha a telített szénhidrogénekhez olyan szubsztituenseket kapcsolunk, amelyek heteroatomokat (elsősorban O, S, N és halogének) tartalmaznak kettős kötések nélkül, akkor a spektrum a heteroatomok nem kötő elektronpárjainak gerjesztéséhez rendelhető $n-\sigma^*$ sávval gazdagodik.

Alkoholok, ill. dialkil-éterek esetében az $n-\sigma^*$ sáv is csupán 180 nm körül jelenik meg, s mivel ez az átmenet tiltott, intenzitásuk csekély. Így az egyszerű alkoholok és éterek is jó oldószerei az ultraibolya spektrofotometriának, a gyógyszerészeti gyakorlatban meglehetősen ritkán előforduló nagyobb molekulák (glicerin, mentol, különféle cukrok stb.) spektrofotometriásan teljesen inaktívak. A szerves peroxidok abszorpciós maximuma is 220 nm alatt jelenik meg.

Alkil merkaptánok, dialkil-szulfidok $n-\sigma^*$ sávja 215 nm alatt van, intenzitásuk azonban már nagyobb: a moláris abszorpciós koefficiens eléri az ezres nagyságrendet. Az S—S kötést tartalmazó diszulfidok, különösen ezek gyűrűs származékai már hosszabb hullámoknál nyelnek el (350 nm-ig), a sávok intenzitása azonban csekély (százas nagyságrendű).

Telített primer, szekunder és tercier aminok 190 és 200 nm között rendelkeznek közepes intenzitású $n-\sigma^*$ sávval ($\varepsilon \sim 1000$—4000). Gyűrűs tercier amin származékok esetén a sáv 215 nm-ig tolódhat el. A gyógyászatban használt származékok közül pl. a hexametiléntetramin abszorpciós maximuma 195 nm-nél van ($\varepsilon = 1370$), míg az 1-amino-adamantáné 194 nm-nél ($\varepsilon = 870$).

Megjegyzésre érdemes, hogy a leírtak a szabad bázisokra érvényesek. Amennyiben a nitrogén kötetlen elektronpárját sóképzéssel lekötjük (spektrumfelvétel savas közegben), erőteljes hipszokróm és hipokróm eltolódás következik be.

Alkil-halogenidek $n-\sigma^*$ sávjának hullámhossza függ a halogén jellegétől. A rend-

szám növekedésével nő az atomrádiusz és csökken az elektronegativitás; ezzel párhuzamosan az n elektronok könnyebben gerjeszthetők lesznek. Ennek megfelelően a monofluor- és klór-alkánok abszorpciós maximumai még a vákuum ultraibolya tartományban vannak, a metil-bromidé viszont már 204 nm-nél ($\varepsilon = 200$), a metil-jodidé pedig 258 nm-nél ($\varepsilon = 365$). Erőteljes batokróm eltolódás tapasztalható az egy szénatomhoz kapcsolódó halogének számának növelésével. Ez kloroform és szén-tetraklorid esetében még csak azt eredményezi, hogy ezeket nem lehet oldószerként használni 245, ill. 260 nm alatt, a jodoform (CHJ_3) viszont már sárga színű anyag ($\lambda_{max} = 349$ nm; $\varepsilon = 230$).

A fenti, heteroatomokat tartalmazó telített szubsztituenseket auxokróm csoportoknak nevezzük. Ennek az elnevezésnek eredete az, hogy ezek a csoportok, amelyek — amint azt tárgyaltuk — önmagukban vagy egyáltalán nem, vagy csak igen csekély mértékben képviselnek spektrofotometriás aktivitást, jelentős mértékben befolyásolni képesek festékek színét. Erre a hatásra, aminek alapja az auxokróm csoport heteroatomja kötetlen elektronpárjának kölcsönhatása az aromás gyűrűvel vagy más konjugált rendszerekkel, a következő fejezetekben gyógyszervegyületek ultraibolya-spektrumainak tárgyalása kapcsán is számos példát fogunk bemutatni.

3.4. Kromofor csoportok

Míg az eddigiekben tárgyalt, mind a kvalitatív, mind pedig a kvantitatív analízis szempontjából alárendelt jelentőségű csekély spektrofotometriás aktivitások σ- és n-elektronok gerjesztéséhez voltak rendelhetők, a következőkben tárgyalandó kromofor csoportok közös jellemzője, hogy szén—szén, szén—hetero atom vagy hetero atom—hetero atom kettős kötéseket tartalmaznak. Az ilyen csoportokat tartalmazó vegyületek spektrumában ennek megfelelően megjelennek az $n - \pi^*$ és a $\pi - \pi^*$ sávok. Amennyiben ezek izoláltan fordulnak elő a szerves molekulában, csupán csekély intenzitású sávokat lehet hozzájuk rendelni az analitikai szempontból jelentős, hosszabb hullámú ultraibolya tartományban. A „kromofor" elnevezés arra utal, hogy ezeknek a csoportoknak konjugációja már intenzív spektrumokat eredményez az ultraibolya, sőt a látható tartományban is.

A kromoforok közül a legnagyobb jelentősége a szén—szén kettős kötésnek van. Etilén gőzfázisban 170 nm körül rendelkezik intenzív ($\varepsilon \sim 10\,000$) $\pi - \pi^*$ sávval, amihez 200 nm körül még egy további, egy nagyságrenddel kisebb intenzitású, tiltott átmenetnek megfelelő sáv csatlakozik. Ez utóbbi a szubsztituált származékokban általában már nem ismerhető fel. Szubsztitúció hatására ez említett intenzív sáv batokróm eltolódást szenved. Alkilszubsztitúció, ill. a kettős kötésnek ciloalkén formában való megjelenése általában 180—200 nm-ig tolja el a maximumot. Az izolált kettős kötést tartalmazó szterinek (koleszterin és rokonvegyületek) maximuma pl. 193 és 205 nm között jelentkezik ($\varepsilon = 6000$—$12\,000$) [10]. Az alkilszubsztitúciónál nincs jelentősen nagyobb hatása a klór- és alkoxiszubsztitúciónak sem. Nitrogén-szubsztitúció erőteljesebb batokróm eltolódást eredményez. Ezt az en-amin típusú

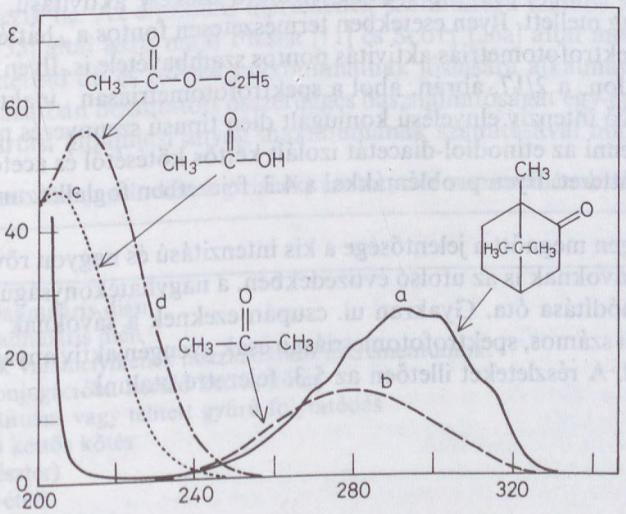
1-(1-piperidil)-butén-1 példájával illusztráljuk, amelynek abszorpciós maximuma 228 nm-nél jelenik meg ($\varepsilon = 10\,000$).

Figyelmet érdemel, hogy a két π-elektronpárt tartalmazó acetilén sávrendszere a még távolibb vákuum ultraibolya tartományban van, mint az etiléné; ennek következtében az etinil vegyületek még 200 nm tájékán is alig mutatnak spektrofotometriás aktivitást. Ugyanez vonatkozik a szén—nitrogén hármas kötést tartalmazó nitrilekre is: az acetonitril kiváló oldószere a rövidhullámú ultraibolya spektrofotometriás vizsgálatoknak.

A szén—szén kettős kötés mellett a gyógyszervegyületek másik fontos kromofor csoportja a szén—oxigén kettős kötést tartalmazó karbonilcsoport. A karbonilszármazékok spektrumában a legjellegzetesebb az igen kis intenzitású $n-\pi^*$ sáv. (Az $n-\sigma^*$ sáv 190 nm körül, a $\pi-\pi^*$ sáv pedig a vákuum ultraibolya tartományban van.)

A 3/4. ábrán néhány jellegzetes karbonilvegyület spektrumát mutatjuk be az $n-\pi^*$ sávokkal. Jellegzetes, hogy a gyűrűfeszülés miatt az aliciklusos keton, kámfor sávja hosszabb hullámnál jelenik meg, mint az acetoné, és az alkalmazott hexános közegben inflexiók formájában finomszerkezet is megjelenik, csakúgy mint az ábrán fel nem tüntetett acetaldehid esetében ($\lambda_{max} = 293$ nm; $\varepsilon = 12$). A finomszerkezet poláris oldószerekben eltűnik. (Az oldószerhatásra vonatkozó további adatok a 3.2. fejezetben és a 3/3. ábrán találhatók.)

Ugyancsak látható a 3/4. ábrán az, hogy auxokróm csoportok csatlakozása a karbonilcsoporthoz (karboxil- és észtercsoportok) igen erőteljes hipszokróm eltolódást eredményez. Hasonló hatások érvényesülnek a 3/4. ábrán nem látható származékoknál is, amelyeknek abszorpciós maximumai a következők: acetil-klorid (hexánban) 220 nm, acetamid (metanolban) 207 nm, ecetsavanhidrid (hexánban) 223 nm. Ennek oka az, hogy az alapállapotban levő *n* elektronok energianívóját az auxokróm



3/4. ábra. Karbonilvegyületek spektrumai. Oldószer: hexán.

a) Kámfor; *b)* aceton; *c)* ecetsav; *d)* etil-acetát

csoport elektronjaival való kölcsönhatás nem változtatja meg, a gerjesztés után elfoglalt π^*-pálya energianívóját viszont megemeli.

Amennyiben a karbonilcsoport oxigénatomját kénre cseréljük, valamennyi sáv igen erős batokróm eltolódást szenved. Tiokámfor ciklohexánban felvett spektrumán pl. az $n-\pi^*$ sáv 493 nm-nél jelenik meg (log $\varepsilon = 1{,}09$), míg az $n-\sigma^*$ és a $\pi-\pi^*$ sávok megjelenési helye 244, ill. 214 nm (log $\varepsilon = 4{,}06$, ill. 3,62). Alifás szulfoxidok 215 nm körül rendelkeznek közepes intenzitású sávval, míg az analóg szulfonok nem rendelkeznek számottevő elnyeléssel az ultraibolya tartományban.

A nitrogéntartalmú kromoforok közül megemlítjük a nitrocsoportot, amelynek $n-\pi^*$ sávja 270 nm körül jelenik meg igen kis intenzitással. Azo-metán 347 nm-nél, diazo-metán pedig 400 nm-nél ad igen gyenge $n-\pi^*$ sávot ($\varepsilon = 5$, ill. 3). Mint érdekességet jegyezzük meg, hogy még ez az igen gyenge szín is elég ahhoz, hogy a zsírsavak és epesavak gázkromatográfiás elemzése során gyakran alkalmazott diazo-metános észterképzési reakció során a reagens feleslegbe kerülését annak sárga színe alapján észlelhessük.

Az auxokróm és izolált kromofor csoportokat tartalmazó vegyületek spektrumaival kapcsolatban általánosságban a következőket állapíthatjuk meg. Bár a leírt spektrumadatoknak és összefüggéseknek van bizonyos jelentőségük ezeknek a vegyületeknek szerkezetfelderítésében, különösen pedig a bonyolultabb szerkezetű anyagok spektrumainak értelmezésében, ahol ezek a csoportok képezik az építőköveit a spektrofotometriás aktivitást hordozó szerkezeteknek, önmagukban azonban ezek a vegyületek az esetek többségében a gyakorlati gyógyszer-analitikus számára spektrofotometriásan inaktívnak tekinthetők, hiszen számottevő fényelnyelést általában csak 220 nm alatt mutatnak. Ezeknek a viszonylag csekély fényelnyeléseknek tanulmányozása a fentieken túlmenően két okból is fontos. Egyrészről gyakran fordul elő, hogy igen kis mennyiségű spektrofotometriásan aktív anyagot kell meghatározni 2—4 nagyságrenddel nagyobb mennyiségben jelenlevő csekély aktivitású, „inaktívnak" tekinthető anyag mellett. Ilyen esetekben természetesen fontos a „háttérként" jelentkező csekély spektrofotometriás aktivitás pontos számbavétele is. Ilyen példát láthattunk a 57. oldalon, a 2/17. ábrán, ahol a spektrofotometriásan „inaktív" etinodiol-diacetátban levő intenzív elnyelésű konjugált dién típusú szennyezés mérésénél korrekcióba kell venni az etinodiol-diacetát izolált kettős kötésétől és acetoxicsoportjaitól származó hátteret. Ilyen problémákkal a 4.3. fejezetben foglalkozunk részletesebben.

Másrészről igen megnőtt a jelentősége a kis intenzitású és nagyon rövid hullámoknál megjelenő sávoknak is az utolsó évtizedekben, a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia térhódítása óta. Gyakran ui. csupán ezeknek a sávoknak a segítségével tudjuk elvégezni számos, spektrofotometriásan csak gyengén aktív anyag detektálását UV-detektorral. A részleteket illetően az 5.3. fejezetre utalunk.

3.5. Konjugált kettős kötéseket tartalmazó rendszerek

Amennyiben a 3.4. fejezetben ismertetett kromofor csoportok izolálva vannak egymástól (legalább két egyes kötés választja el őket egymástól), általában nem alakul ki kölcsönhatás köztük: a vegyület spektruma megközelítőleg a kromoforok spektrumainak összege lesz. Nem okoz számottevő spektrumeltolódást és intenzitásnövekedést a kettős kötések kumulált formában való megjelenése sem. A C=C=O kötési rendszert tartalmazó dietil-ketén pl. 227 és 375 nm-nél rendelkezik abszorpciós sávokkal ($\varepsilon = 360$, ill. 20), míg a N=C=N rendszert tartalmazó dietil-karbodiimid 230 és 270 nm-nél ($\varepsilon = 200$, ill. 25).

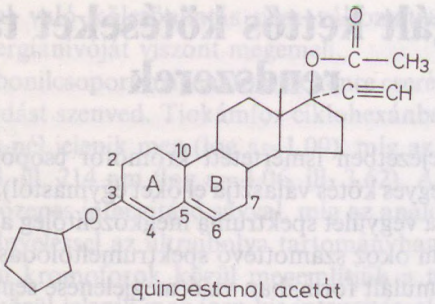
Alapvetően új helyzet áll azonban elő, amennyiben a kettős kötések a konjugáció viszonyába kerülnek egymással: váltakozva fordulnak elő egyes és kettős kötések. Ez esetben a π-pályák delokalizációja következik be: többé-kevésbé egyenletes eloszlású π-elektronfelhő alakul ki a konjugációs lánc mentén. Ez a kémiai reaktivitásban jelentkező közismert különbségeken túlmenően az elektronok könnyebb gerjeszthetőségét is magával hozza: a konjugáció következtében a sávok erőteljes batokróm és számos esetben hiperkróm eltolódása is bekövetkezik.

A legegyszerűbb konjugált dién, az 1,3-butadién spektrumában a $\pi - \pi^*$ sáv 217 nm-nél jelenik meg nagy intenzitással ($\varepsilon = 21\,000$). Megjegyzendő, hogy ez esetben a két kettős kötés helyzete a C_2—C_3 kötésre vonatkoztatva *transz.* *cisz*-Diének lényegesen magasabb hullámhossznál rendelkeznek maximummal, az intenzitás viszont kisebb, 1,3-ciklohexadiénnek pl. 256 nm-nél van a maximuma ($\varepsilon = 8000$). Ha ehhez a két alaptípushoz további konjugált kettős kötések, ill. auxokróm csoportok, sőt egyszerű alkilcsoportok vagy telített gyűrű folytatások csatlakoznak, batokróm eltolódás következik be. Az eltolódás mértékének számítására számos lehetőség van. A WOODWARD [33] által leírt, majd FIESER [11] és SCOTT [26a] által módosított szabály különösen szteroid di- és triének maximumainak jóslására alkalmas.

A 3/1. táblázatban bemutatott összefüggés használhatóságát egy-egy gyógyszer, ill. gyógyszergyártási kiindulási anyag maximumának számításával mutatjuk be.

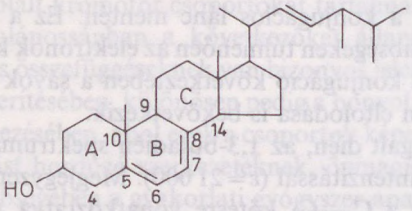
3/1. táblázat. Konjugált diének (triének) abszorpciós maximumának számítása [26a]

	λ_{max}, nm
Alap heteroannuláris dién	214
Alap homoannuláris dién	253
A fenti értékek valamelyikéhez hozzáadandó inkrementumok:	
További, konjugációba kerülő kettős kötés	30
Alkilszubsztituens vagy telített gyűrű folytatódás	5
Exociklusos kettős kötés	5
OAc (enol-észter)	0
OAlk (enol-éter)	6
SAlk (tio-enoléter)	30
F, Cl, Br	5
$NAlk_2$	60



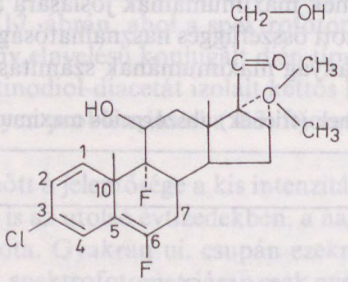
quingestanol acetát

3,5-heteroannuláris dién		214 nm
2—3, 5—10, 6—7 egyes kötés	3 × 5 =	15 nm
5—6 kettős kötés (*A* gyűrűre vonatkoztatva exociklusos)		5 nm
3-ciklopentenil-oxi-csoport		6 nm
	Számított:	240 nm
	Mért:	242 nm



ergoszterin (pro-vitamin D_2)

5,7-homoannuláris dién		253 nm
4—5, 5—10, 8—9, 8—14 egyes kötés	4 × 5 =	20 nm
5—6 kettős kötés (*A* gyűrűre vonatkoztatva exociklusos)		5 nm
7—8 kettős kötés (*C* gyűrűre vonatkoztatva exociklusos)		5 nm
	Számított:	283 nm
	Mért:	282 nm



RGH-1113

1,3-homoannuláris dién		253 nm
5—6 kettős kötés		30 nm
1—10, 5—10, 6—7 egyes kötés	3 × 5 =	15 nm
5—6 kettős kötés (*A* gyűrűre vonatkoztatva exociklusos)		5 nm
3-Cl, 6-F	2 × 5 =	10 nm
	Számított:	313 nm
	Mért:	312 nm

Kettőnél több konjugált szén—szén kettős kötést tartalmazó vegyületek spektrumában a beépülő újabb kettős kötések természetesen további batokróm eltolódást okoznak. Kb. 7 kettős kötésig a 3/1. táblázatban egy-egy újabb kettős kötés beépülésére megadott 30 nm-es batokróm eltolódás megközelítőleg érvényes, 7 felett az inkrementum már csökken, amint az a 3/2. táblázat adataiból látható. Ugyanitt látható az intenzitások jelentős növekedése is. A 3/2. táblázat adataiból, valamint szubsztituált poliének spektrumadataiból megállapítható, hogy $n = 5$—6 felett a vegyületek már színesek. A karotinoidok és rokonvegyületek színe ahol n 11-ig nőhet, sárgától pirosig változik.

3/2. táblázat. A $H(CH=CH)_nH$ általános képletű poliének spektrumának leghosszabb hullámú sávja. Oldószer: 2,2,4-trimetil-pentán [27]

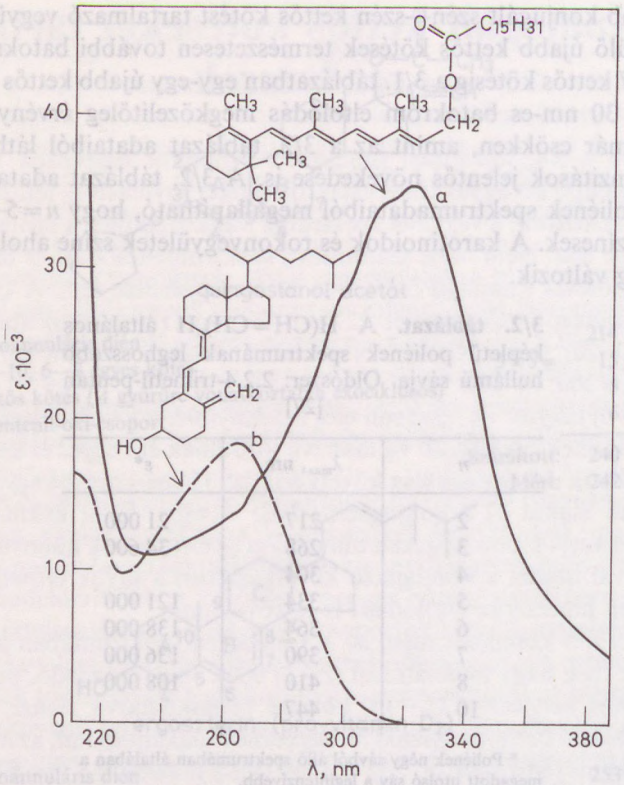
n	λ_{max}, nm	ε*
2	217	21 000
3	268	34 600
4	304	
5	334	121 000
6	364	138 000
7	390	136 000
8	410	108 000
10	447	

* Poliének négy sávból álló spektrumában általában a megadott utolsó sáv a legintenzívebb.

Fontos megjegyezni, hogy a természetes poliének túlnyomó részénél a lánc konfigurációja mind a kettős kötésekre, mind pedig a köztük levő egyes kötésekre vonatkozóan a stabilis *transz* konfiguráció. Csupa-*transz* konfigurációjú diének és poliének spektruma általában finomszerkezetet mutat; a különböző táblázatos összeállításokban (így pl. a 3/2. táblázatban is) a legmagasabb hullámhosszat szokták megadni.

A 3/2. táblázatban összegyűjtött adatok természetesen csupán tájékozódás céljait szolgálják. Amennyiben polién típusú gyógyszerek spektrumának maximumhelyét, a sáv alakját, ill. intenzitását kívánjuk értelmezni, figyelembe kell venni a batokróm eltolódást okozó alkilszubsztitúciókat, hipszokróm és hipokróm eltolódásokat, valamint a finomszerkezet megszűnését eredményező szterikus hatásokat (mint pl. a csupa-*transz* lánc megszakítása egy *cisz*-kötés által stb.). Szterikus okokra vezethető vissza pl. az is, hogy a 3/5. ábrán bemutatott két polién típusú vitamin spektrumai mind az A-, mind pedig a D_3-vitamin esetében rövidebb hullámhossznál mutatnak maximumot, mint az várható lenne, az intenzitások is kisebbek a vártnál, végül a D-vitamin esetében teljesen, az A-vitamin esetében pedig részlegesen eltűnik a finomszerkezet.

Ugyancsak a finomszerkezet megszűnését eredményezi poláris szubsztituensek bevitele a kettős kötés szénatomjára, amint azt a 3/6. ábrán szteroid 3,5-diének esetén láthatjuk.



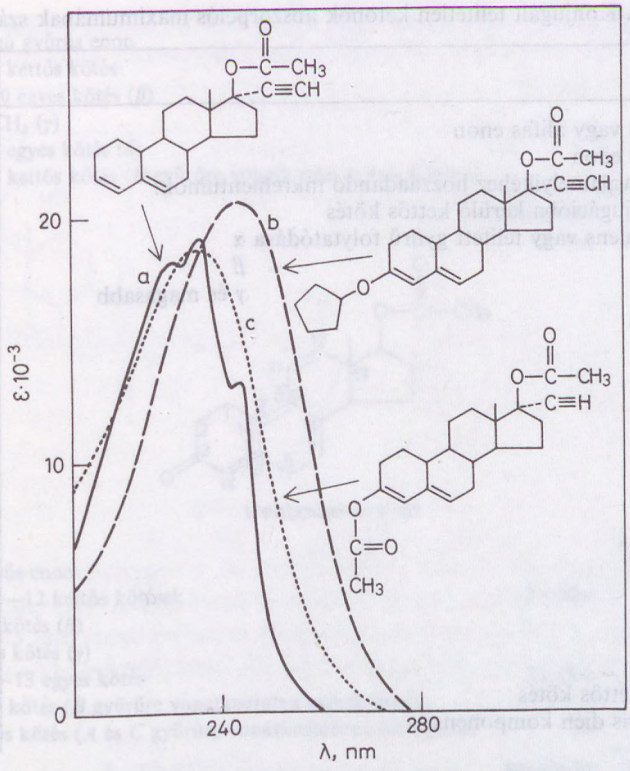
3/5. ábra. Polién típusú gyógyszerek spektrumai. Oldószer: metanol.

a) A-vitamin-palmitát; *b)* D_3-vitamin

Gyógyszervegyületek körében igen nagy a jelentősége annak az esetnek, amikor a szén—szén kettős kötéssel a karbonilcsoport kerül a konjugáció viszonyába. A legegyszerűbb α, β-telítetlen aldehid, ill. keton, az akril-aldehid, ill. metil-vinil-keton spektrumaiban mind a $\pi-\pi^*$, mind pedig az $n-\pi^*$ sávok jelentős batokróm eltolódást szenvednek a konjugáció hatására. Az akril-aldehid maximumai 208,5, ill. 328 nm-nél vannak (log $\varepsilon=4{,}1$, ill. 1,1), míg a metil-vinil-keton értékei: 219, ill. 324 nm (log $\varepsilon=3{,}6$, ill, 1,4). A gyógyszerkémiában különösen szteroid hormonok körében fordul elő igen sok α, β-telítetlen keton. A kvantitatív meghatározásuknál is komoly szerephez jutó $\pi-\pi^*$ sávjuk hullámhossza — csakúgy mint a konjugált diének esetében — a Woodward-szabály segítségével számítható [33]. Ennek Scott [26b] által módosított, ill. továbbfejlesztett formáját mutatjuk be a 3/3. táblázatban.

A 3/3. táblázatban összefoglalt szabály alkalmazását néhány szteroid hormon gyógyszer példáján mutatjuk be.

A fenti példával kapcsolatban megjegyezzük, hogy a metil-tesztoszteron molekulájában 1,2-helyzetbe bevitt újabb kettős kötés nem hosszabbítja meg a konjugációs láncot. Ennek a „keresztbe konjugált" vegyületnek (metándienon) maximumhelye



3/6. ábra. Poláris szubsztituensek hatása konjugált diének spektrumára. Oldószer: metanol.

a) 17α-etinil-3,5-ösztradién-17-ol-acetát (szubsztituálatlan dién típus); *b)* 17α-etinil-3-ciklopentil-oxi-3,5-ösztradién-17-ol-acetát (quingestanol acetate) (enol-éter típus); *c)* 17α-etinil-3,5-ösztradién-3,17-diol-diacetát (enol-észter típus). (GÖRÖG, S., SZÁSZ, GY., Analysis of Steroid Hormone Drugs. Akadémiai Kiadó —Elsevier, Budapest—Amsterdam 1978, 176. old.)

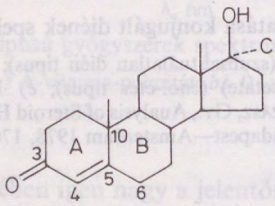
valóban csak csekély mértékben különbözik a metil-tesztoszteronétól ($\lambda_{max} = 244$ nm). Annál nagyobb eltolódást okoznak a következő két példában bemutatott újabb, lineárisan konjugált kettős kötések.

A kettős kötéssel való konjugáció eredményeként a konjugált karbonilvegyületek $n-\pi^*$ sávja is batokróm eltolódást szenved kb. 320 nm-ig; intenzitásuk azonban alacsony marad ($\varepsilon < 100$).

α-Dioxo-vegyületek (diacetil, glioxál stb.) igen gyenge elnyelést mutatnak a teljes ultraibolya tartományban. Érdemes azonban megjegyezni, hogy $n-\pi^*$ sávjuk 450 nm-ig tolódik el; innen ezeknek a vegyületeknek sárga színe. Gyűrűs α-diketo-vegyületek enolizációra hajlamosak. Az enol formának, mint α-hidroxil-szubsztituált telítetlen ketonnak természetesen már intenzív elnyelése van. Ha az enol formát az enolos hidroxil acilezésével stabilizáljuk, s így megszüntetjük a kölcsönhatást a konjugált kötés és az oxigén kötetlen elektronpárja közt, erőteljes hipszokróm eltolódás következik be. Jól illusztrálják ezt a hatást a 3,4-diketo-szteroidokból levezethető 4-hidro-

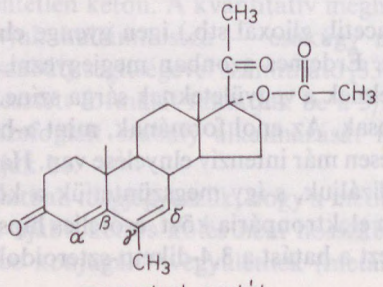
3/3. táblázat. Konjugált telítetlen ketonok abszorpciós maximumának számítása [26b]

	λ_{max}, nm
6 tagú gyűrűs vagy alifás enon	215
5 tagú gyűrűs enon	202
A fenti értékek valamelyikéhez hozzáadandó inkrementumok:	
További, konjugációba kerülő kettős kötés	30
Alkilszubsztituens vagy telített gyűrű folytatódása α	10
β	12
γ és magasabb	18
OH α	35
β	30
δ	50
OAc α, β, δ	6
OMe α	35
β	30
γ	17
δ	31
SAlk β	85
Cl α	15
β	12
Br α	25
β	30
$NAlk_2$ β	95
Exociklusos kettős kötés	5
Homoannuláris dién komponens	39



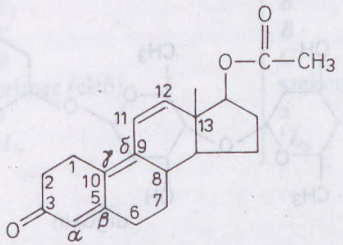
metil-tesztoszteron

		λ_{max}, nm
6 tagú gyűrűs enon		215 nm
β-helyzetből kiinduló egyes kötések (5—6, 5—10)	$2 \times 12 =$	24 nm
4—5 kettős kötés (*B* gyűrűre vonatkoztatva exociklusos)		5 nm
	Számított:	244 nm
	Mért:	241 nm



megestrol acetát

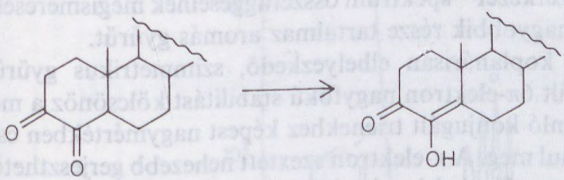
	λ_{max}, nm
6 tagú gyűrűs enon	215 nm
6—7 kettős kötés	30 nm
5—10 egyes kötés (β)	12 nm
6—CH_3 (γ)	18 nm
7—8 egyes kötés (δ)	18 nm
4—5 kettős kötés (*B* gyűrűre vonatkoztatva exociklusos)	5 nm
Számított:	298 nm
Mért:	291 nm



trenbolon acetát

		λ_{max}, nm
6 tagú gyűrűs enon		215 nm
9—10 és 11—12 kettős kötések	2 × 30 =	60 nm
5—6 egyes kötés (β)		12 nm
1—10 egyes kötés (γ)		18 nm
8—9 és 12—13 egyes kötés	2 × 18 =	36 nm
4—5 kettős kötés (*B* gyűrűre vonatkoztatva exociklusos)		5 nm
9—10 kettős kötés (*A* és *C* gyűrűre vonatkoztatva exociklusos)	5 =	5 nm
	Számított:	351 nm
	Mért:	345 nm

xi-4-én-4-keto, valamint 4-acetoxi-4-én-3-keto szteroidok spektrumadatai, amelyek a Woodward-szabály alapján (3/3. táblázat) jó közelítéssel számíthatók:



3, 4-diketo vegyület

4-hidroxi-4-én-3-keto vegyület

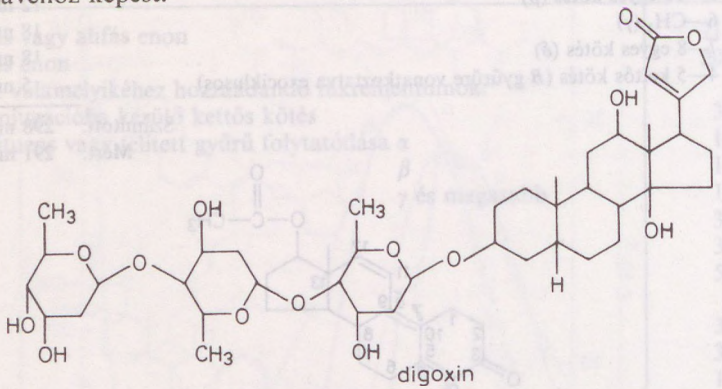
λ_{max} = 280 nm (számított: 279 nm)

4-acetoxi-4-én-3-keto vegyület

λ_{max} = 248 nm (számított: 250 nm)

α, β-Telítetlen karbonsavak rövidebb hullámoknál nyelnek el, mint az analóg aldehidek vagy ketonok. Alkilcsoporttal monoszubsztituált α, β-telítetlen karbonsavak kb. 208 nm-nél rendelkeznek maximummal, a diszubsztituált származékok 217, a triszubsztituáltak pedig 225 nm-nél mutatnak maximális fényelnyelést. További konjugációba kerülő kettős kötések (akárcsak a 3/3. táblázat szerint ketonok eseté-

ben) további 30 nm-es (exociklusos kettős kötés esetében 35 nm-es) batokróm eltolódást mutatnak [19]. Az alkil-észterek spektruma csak csekély különbségeket mutat a megfelelő savéhoz képest.



$\lambda_{max} = 219$ nm; $\varepsilon = 15\,600$

α, β-Telítetlen laktonok közül a kardenolidok, pl. a bemutatott digoxin, 215—220 nm körül rendelkeznek meglehetősen intenzív abszorpciós sávval, míg az aszkorbinsav spektrumában a két enolos hidroxilcsoport erőteljes batokróm eltolódást okoz ($\lambda_{max} = 245$ nm). A spektrum pH-függésével a 3.17. fejezetben foglalkozunk (lásd 3/27. ábra).

3.6. Aromás vegyületek

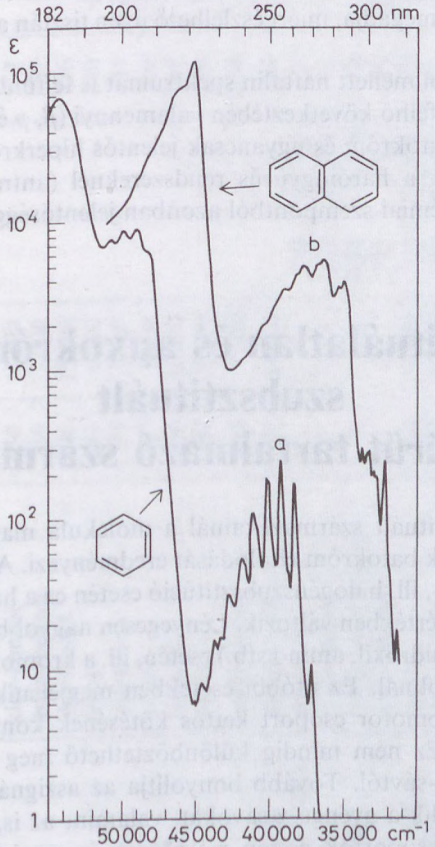
Az aromás rendszerek sajátos fényelnyelési viszonyainak tanulmányozása igen fontos a gyógyszervegyületek szerkezet—spektrum összefüggéseinek megismeréséhez, hiszen a gyógyszervegyületek nagyobbik része tartalmaz aromás gyűrűt.

Közismert, hogy a benzol koplanárisan elhelyezkedő, szimmetrikus gyűrűjén egyenletesen eloszló, delokalizált 6π-elektron nagyfokú stabilitást kölcsönöz a molekulának, ami a formailag hasonló konjugált triénekhez képest nagymértékben csökkent reakciókészségben nyilvánul meg. A π-elektron szextett nehezebb gerjeszthetősége az ultraibolya spektrumban analóg módon jut kifejezésre.

1,3,5-Hexatriénnek 258 nm-nél van intenzív (finomszerkezettel rendelkező) sávja ($\log \varepsilon = 4{,}9$), míg a *cisz* helyzetű kettős kötéseket tartalmazó 1,3,5-ciklooktatrién maximuma a 3.5. fejezetben leírtakkal összhangban magasabb hullámhossznál (265 nm), de kisebb intenzitással ($\log \varepsilon = 3{,}6$) jelenik meg. Ezzel szemben — amint az a 3/7. ábrán látható — a benzol spektrumának egyetlen nagy intenzitású sávja a vákuum ultraibolya tartományban jelenik meg ($\lambda_{max} = 185$ nm; $\varepsilon = 68\,000$). Ezt a sávot a CLAR [7] által kondenzált aromás szénhidrogénekre bevezetett nómenklatúra szerint β-sávnak nevezzük. A gyakorlati spektroszkópia számára hozzáférhető két sáv közül a 204 nm-nél megjelenőt ($\varepsilon = 8800$) *p* sávnak, a 254 nm-es maximummal és igen jellegzetes finomszerkezettel rendelkező kis intenzitású sávot ($\varepsilon = 250$) α-sávnak nevezzük. Ezeknek a sávoknak helyzete alig változik az oldószer polaritásának függvényé-

3/4. táblázat. Benzol abszorpciós sávjainak nómenklatúrája RAO [24a] nyomán

Abszorpciós sáv		
180 nm körül	200 nm körül	260 nm körül
—	rövid hullámú benzenoid	hosszú hullámú benzenoid
$A_{1g} \rightarrow E_{1u}$	$A_{1g} \rightarrow B_{1u}$	$A_{1g} \rightarrow B_{2u}$
E_1	E_2	B
—	K	B
A	B	C
primer (második)	primer (első)	szekunder
β	p	α
^1B	^1L_a	^1L_b



3/7. ábra. Benzol *(a)* és naftalin *(b)* spektrumai. Oldószer: hexán.

(H. M. HERSHENSON, U. V. and Visible Absorption Spectra. Academic Press, New York 1961)

ben (lásd 3/3. ábra, 68. oldal). Igen jellegzetes viszont a finomszerkezet csökkenése poláris oldószerekben, ill. inflexiókká való torzulása poláris szubsztituensek hatására. (Az α-sáv rezgési sőt forgási finomszerkezetet is mutató gőzfázisú spektrumát a 2/1. ábrán mutattuk be és a 2.2. fejezetben tárgyaltuk.)

Említést érdemel, hogy az ismertetett Clar-féle nómenklatúrán kívül számos további is használatban van aromás vegyületek sávjainak megnevezésére. Ezek közül néhányat Rao nyomán [24a] a 3/4. táblázatban foglaltunk össze.

Kis intenzitása ellenére az α-sáv helyzetének és alakjának tanulmányozása a szubsztituensek függvényében igen fontos adatokat szolgáltat a bonyolultabb szerkezetű aromás származékok spektrumának értelmezéséhez. Az α-sáv természetesen tiltott sáv: a tiltás alapja az alapállapotban levő benzolmolekula nagyfokú szimmetriája. Hogy a sáv, ha kis intenzitással is, de mégis megjelenik, annak tulajdonítható, hogy a molekulán belüli vegyértékrezgések következtében egy adott időpillanatban a benzolmolekulák egy része a szimmetrikus alapállapothoz viszonyítva torzult állapotban van jelen. Mivel az elektronátmenetek sebessége sokkal nagyobb, mint a rezgéseké, az átmenetileg torzult állapotok közt elektronátmenetek mehetnek végbe. Ez egyben annak magyarázatát is megadja, miért észlelhető ilyen tisztán a finomszerkezet benzol esetében.

A 3/7. ábrán a benzol mellett naftalin spektrumát is feltüntettük. Látható, hogy a kiterjedtebb π-elektronfelhő következtében valamennyi (β, *p* és α) sáv is jelentős (kb. 40, 70, ill. 50 nm-es) batokróm és ugyancsak jelentős hiperkróm eltolódást szenved. Ez a hatás folytatódik a háromgyűrűs rendszereknél (antracén, fenantrén) is. A magasabb, gyógyszerkémiai szempontból azonban jelentőséggel nem bíró származékok már színesek.

3.7. Szubsztituálatlan és auxokróm csoporttal szubsztituált fenilgyűrűt tartalmazó származékok

Benzol monoszubsztituált származékainál a molekula magas fokú szimmetriája megbomlik, s ez a sávok batokróm eltolódását eredményezi. Amint az a 3/5. táblázat adataiból látható, alkil-, ill. halogénszubsztitúció esetén ez a hatás csekély, és a sávok intenzitása is csak kismértékben változik. Lényegesen nagyobb a hatás elektronküldő auxokróm csoportok (hidroxil, amino stb.) esetén, ill. a kromofor csoporttal szubsztituált benzolszármazékoknál. Ez utóbbi esetekben megjelenik a spektrumokban az aromás gyűrű és a kromofor csoport kettős kötésének konjugációjából származó konjugációs (*K*) sáv. Ez nem mindig különböztethető meg könnyen a batokróm eltolódást szenvedett *p*-sávtól. Tovább bonyolítja az aszignációt, hogy az intenzív *K*-sávok időnként elfedik a gyenge α-sávokat, valamint az is, hogy a heteroatomot tartalmazó kromofor csoportok esetén $n-\pi^*$ sáv is megjelenik. Mivel ezekbe a vegyületcsaládokba már sok fontos gyógyszer tartozik, ezzel a területtel a következőkben részletesebben foglalkozunk.

3/5. táblázat. Monoszubsztituált benzolszármazékok (C_6H_5-R) spektrumadatai [26, 28]

R	Vegyület	*p*-sáv*		*K*-sáv*		α-sáv*		*n*-π* sáv*		Oldószer
		λ_{max}, nm	ε	λ_{max}, nm	ε	λ_{max}, nm	ε	λ_{max}, nm	ε	
—H	benzol	203	7 400			254	204			víz
—CH_3	toulol	206	7 000			261	225			víz
—F	fluor-benzol	204	6 200			254	900			etanol
—Cl	klór-benzol	210	7 500			257	170			etanol
—Br	bróm-benzol	210	7 500			257	170			etanol
—J	jód-benzol	226	13 000			256	800			etanol
—OH	fenol	211	6 200			270	1 450			víz
—O^-	fenolátion	235	9 400			287	2 600			víz
—OCH_3	anizol	217	6 400			269	1 500			víz
—SH	tiofenol	236	10 000			269	700			hexán
—NH_2	anilin	230	8 600			280	1 430			víz
—$\overset{+}{N}H_3$	aniliniumion	203	7 500			254	160			víz
—$N(CH_3)_2$	dimetil-anilin	251	14 000			299	2 100			etanol
—NH—$COCH_3$	acetanilid			242	14 400	280	500			etanol
—C≡N	fenil-cianid			224	13 000	271	1 000			víz
—SO_2NH_2	benzol-szulfonamid			218	9 700	265	740			víz
—NO_2	nitro-benzol			252	9 500	280	1 000			heptán
—CH=CH_2	sztirol	214	14 000	248	14 000	282	760			etanol
—$COCH_3$	acetofenon	200	20 000	243	13 000	279	1 200	315	55	etanol
—CHO	benzaldehid			242	14 000	280	1 400	328	55	etanol
—COOH	benzoesav			230	10 000	270	800			víz
—COC_6H_5	benzofenon			254	18 000	270	1 700	330	160	etanol
—C_6H_5	difenil	201	46 500	247	17 000					hexán
—N=N—C_6H_5	azo-benzol (*transz*)	230	16 000	313	25 000			450	400	2,2,4-trimetil-pentán
	azo-benzol (*cisz*)	245	10 000	280	4 000			432	1 200	2,2,4-trimetil-pentán

* Heteroatomot tartalmazó konjugált rendszerek esetén a sávok egyértelmű aszignációja nem mindig lehetséges.

Különösen nagy számban találhatók olyan gyógyszervegyületek, amelyek monoszubsztituált benzolgyűrűket tartalmaznak, vagyis a benzolgyűrű egy (esetleg szubsztituált) metilénhídon keresztül kapcsolódik a molekula többi részéhez. Ezek az izolált benzolgyűrűt tartalmazó vegyületek tulajdonképpen toluolszármazékoknak tekinthetők. Hogy a benzolgyűrű jelenléte a molekulában felismerhető-e a spektrumból, az a molekula többi részében helyet foglaló esetleges más kromofor csoporttól függ.

Viszonylag csekély a száma a gyógyászatban alkalmazott anyagok (elsősorban segédanyagok) között azoknak, amelyek a fenilcsoporton kívül semmi más kromofort nem tartalmaznak (benzil-alkohol, β-fenil-etanol stb.). Ezeknek az anyagoknak a spektruma csak csekély mértékben különbözik a toluolétól.

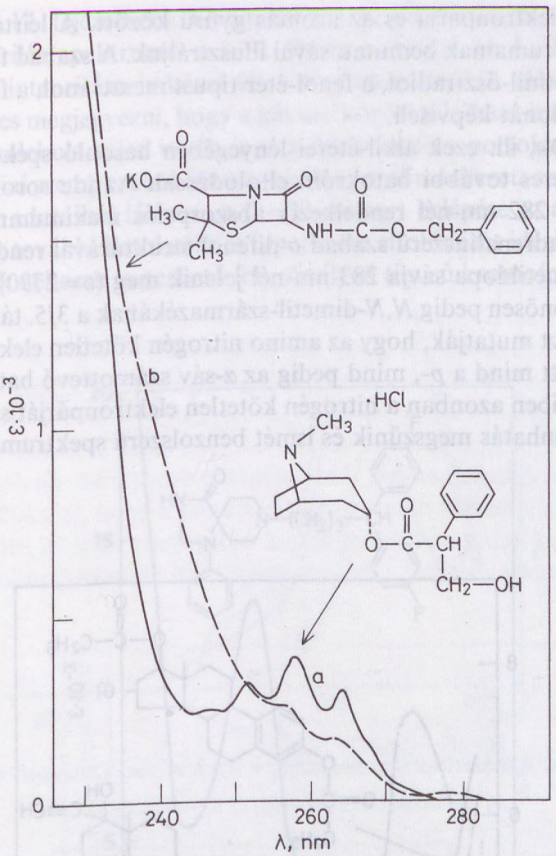
Igen nagy viszont azoknak a származékoknak a száma, amelyek molekulájában az izolált benzolgyűrűn kívül más kromoforok, ill. egyéb abszorbeáló csoportok is találhatók. Amennyiben ez a csoport észter (metilfenidát, szkopolamin, atropin, hioszciamin stb.), savamid (primidon stb.), primer amin (amfetamin stb.), szekunder amin (efedrin, fenmetrazin, metilfenidát, prenilamin, fendilinum stb.), tercier amin (szkopolamin, atropin, hioszciamin stb.), kvaterner ammóniumcsoport (metilhomatropinium-bromid), akkor az α-sáv zavartalanul jelenik meg. Ez azt jelenti, hogy a sávnak finomszerkezete van; a főmaximum 257 nm körül jelenik meg, és a moláris abszorpciós koefficiens 200—400 körüli érték. A *p*-sávra gyakorolt hatás primer aminok és észterek esetében csekély: ez ilyen esetekben 205 nm körül van ($\varepsilon \sim 7000$). Szekunder és tercier aminok (különösen gyűrűs származékok) esetében a *p*-sáv és az amincsoport $n-\sigma^*$ sávjának részleges átfedése miatt a maximum 210 nm-ig tolódhat, esetleg csak inflexióként jelenik meg, és intenzitása is többé-kevésbé megnő. A leírtak illusztrálására a 3/8. ábra *a* görbéjeként bemutatjuk a hioszciamin spektrumát.

Ha az aromás gyűrűtől izoláltan erősebb kromofor csoport foglal helyet, az α-sáv csak annak leszálló ágán jelentkező mellékmaximumok, ill. inflexiók formájában jelentkezik. Ilyen kromofor pl. a tiazolidin-laktám egység a benzil-penicillinben (lásd 3/8. ábra *b* görbe) vagy az —N=C—NH-csoport a tolazolinben stb.

Igen gyakori eset az is, hogy a molekulában levő izolált fenilcsoportokhoz tartozó α-sávot a spektrumban egyáltalában nem lehet felismerni, mivel azt egy sokkal intenzívebben elnyelő konjugált rendszer sávja elfedi. Pl. nandrolon-fenil-propionát α,β-telítetlen ketoncsoportjának 240 nm-nél megjelenő intenzív $\pi-\pi^*$ sávja ($\varepsilon = 17\,000$) még 260 nm tájékán is rendelkezik olyan intenzitással, hogy teljesen elfedje, és így felismerhetetlenné tegye a fenil-propionil-csoport benzolgyűrűjének α-sávját. Hasonlóképpen teljesen elfedi az izolált benzolgyűrű α-sávját a tripelennamin α-amino-piridin része ($\lambda_{max} = 245$ és 306 nm-nél, $\varepsilon = 16\,000$, ill. 4700; lásd 3/20. ábra).

Amint az a 3/5. táblázatból látható, halogénszubsztitúció nem befolyásolja lényegesen sem a sávok helyzetét, sem pedig intenzitását. Példaként megemlítjük a két diklór-fenil egységet tartalmazó mikonazolt ($\lambda_{max} = 272$ nm, $\varepsilon = 720$), az ugyancsak gyakran előforduló trifluor-metil-csoport hatását illetően pedig a flumecinolnak az 56. oldalon található 2/16. spektrumára utalunk, ahol a fenil- és a trifluor-fenil-csoportok összeolvadt sávrendszert alkotnak.

Lényegesen nagyobb a hatása az aromás gyűrű spektrumára az auxokróm csoportoknak. Az auxokróm csoportok által előidézett batokróm és hiperkróm eltolódás



3/8. ábra. Izolált benzolgyűrűt tartalmazó gyógyszerek spektrumai. Oldószer: víz.
a) Hioszciamin-szulfát; *b)* penicillin-G-kálium

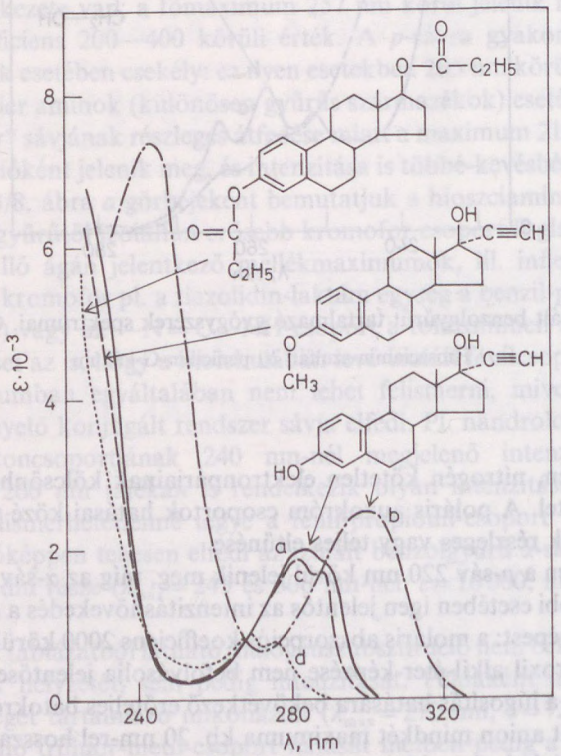
oka az oxigén, kén, nitrogén kötetlen elektronpárjainak kölcsönhatása az aromás π-elektron szextettel. A poláris auxokróm csoportok hatásai közé tartozik az α-sáv finomszerkezetének részleges vagy teljes eltűnése.

Fenolok esetében a *p*-sáv 220 nm körül jelenik meg, míg az α-sáv 275 nm tájékáig tolódik el. Ez utóbbi esetében igen jelentős az intenzitásnövekedés a szubsztituálatlan származékokhoz képest: a moláris abszorpciós koefficiens 2000 körüli értékeket vehet fel. A fenolos hidroxil alkil-éter-képzése nem befolyásolja jelentősen a spektrumot. Annál jelentősebb a lúgosítás hatására bekövetkező erőteljes batokróm és hiperkróm eltolódás: a fenolát anion mindkét maximuma kb. 20 nm-rel hosszabb hullámhossznál és mintegy 50%-kal nagyobb intenzitással jelenik meg a disszociálatlan fenoléhoz képest (lásd 3.17. fejezet). Erőteljes hipszokróm és hipokróm hatást észlelünk viszont abban az esetben, ha a fenolos hidroxilcsoportnak karbonsav-észterét vizsgáljuk. Ennek oka az, hogy az elektronszívó észter-karbonil csökkenti a kölcsönhatást az

oxigén kötetlen elektronpárja és az aromás gyűrű között. A leírtakat a 3/9. ábrán ösztrogének spektrumainak bemutatásával illusztráljuk. A szabad fenolt (semleges és lúgos közegben) etinil-ösztradiol, a fenol-éter típust mesztranol, a fenol-észtert pedig ösztradiol-dipropionát képviseli.

Di- és trifenolok, ill. ezek alkil-éterei lényegében hasonló spektrumot mutatnak néhány nanométeres további batokróm eltolódással. Az ide sorolható difenol-éter típusú emetin pl. 282 nm-nél rendelkezik abszorpciós maximummal ($\varepsilon = 5280$; két fenolgyűrű!). Az adrenalinszerű szabad *o*-difenol struktúrával rendelkező származékokat képviselő metildopa sávja 283 nm-nél jelenik meg ($\varepsilon = 2790$).

Anilinnek, különösen pedig *N,N*-dimetil-származékának a 3/5. táblázatban látható spektrumadatai azt mutatják, hogy az amino nitrogén kötetlen elektronpárjával való kölcsönhatás miatt mind a *p*-, mind pedig az α-sáv számottevő batokróm eltolódást szenved. Amennyiben azonban a nitrogén kötetlen elektronpárját sav hozzáadásával lekötjük, a kölcsönhatás megszűnik és ismét benzolszerű spektrumot kapunk. (Lásd

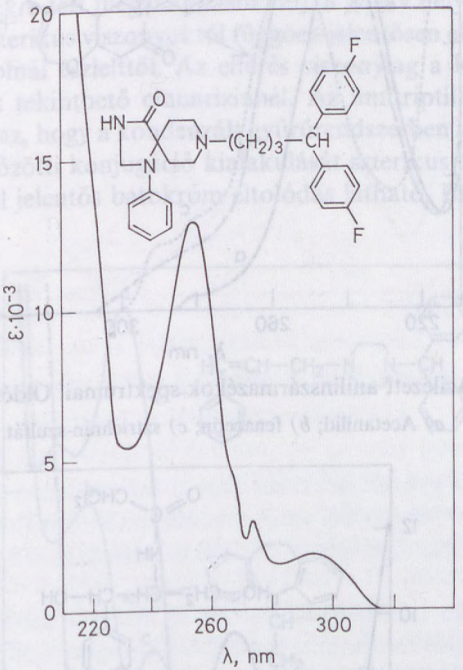


3/9. ábra. Fenol-szteroidok spektrumai. Oldószer: metanol-víz 4 : 1.

a) Etinil-ösztradiol (szabad fenol típus); *b)* etinil-ösztradiol 0,2 M nátrium-hidroxidban (fenolát típus); *c)* mesztranol (fenol-éter típus); *d)* ösztradiol-dipropionát (fenol-észter típus). (Görög, S., Szász,Gy., Analysis of Steroid Hormone Drugs. Akadémiai Kiadó—Elsevier, Budapest—Amsterdam 1978, 178. old.)

a 3/31. ábrát a 3.17. fejezetben). Gyógyszerszármazékaik közül a dimetil-anilinből levezethető fluspirilén spektrumát a 3/10. ábrán mutatjuk be. Látható, hogy a *p*- és α-sáv helyzete és intenzitása is közel áll a dimetil-anilin 3/5. táblázatban található adataihoz. Érdekes megjegyezni, hogy a két sáv között található inflexió és maximum (273 nm-nél) a molekula túlsó végén levő *p*-fluor-fenil-csoportoktól származik.

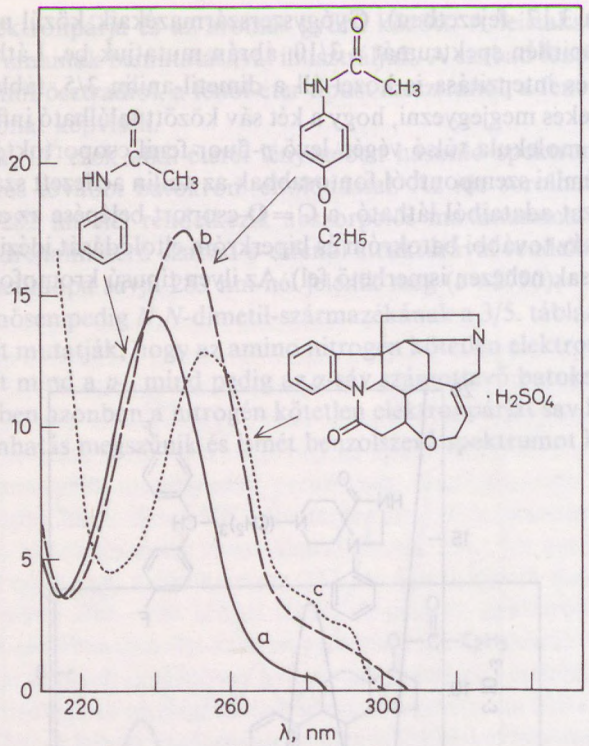
Gyógyszerkémiai szempontból fontosabbak az anilin acilezett származékai. Amint az a 3/5. táblázat adataiból látható, a C=O-csoport belépése az aromás aminocsoport mellé a *p*-sáv további batokróm és hiperkróm eltolódását idézi elő (a részlegesen elfedett α-sáv csak nehezen ismerhető fel). Az ilyen típusú kromofor rendszert tartal-



3/10. ábra. Fluspirilén spektruma. Oldószer: metanol

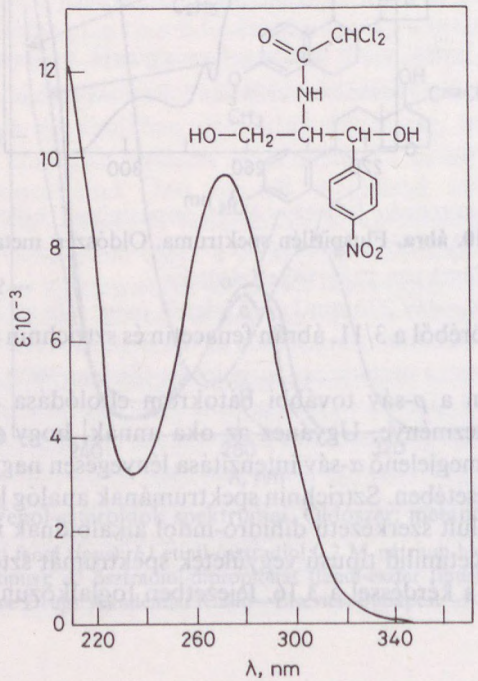
mazó gyógyszerek köréből a 3/11. ábrán fenacetin és sztrichnin spektrumait mutatjuk be.

Fenacetin esetében a *p*-sáv további batokróm eltolódása a *para*-helyzetű etoxi szubsztitúció következménye. Ugyanez az oka annak, hogy a 280—290 nm körül inflexió formájában megjelenő α-sáv intenzitása lényegesen nagyobb, mint a szubsztituálatlan acetanilid esetében. Sztrichnin spektrumának analóg lefutása azt bizonyítja, hogy ennek a bonyolult szerkezetű dihidro-indol alkaloidnak is az acetanilid egység a kromofor része. Acetanilid típusú vegyületek spektrumát szterikus hatások erősen befolyásolják. Ezzel a kérdéssel a 3.16. fejezetben foglalkozunk részletesebben.



3/11. ábra. Acilezett anilinszármazékok spektrumai. Oldószer: metanol.

a) Acetanilid; *b)* fenacetin; *c)* sztrichnin-szulfát

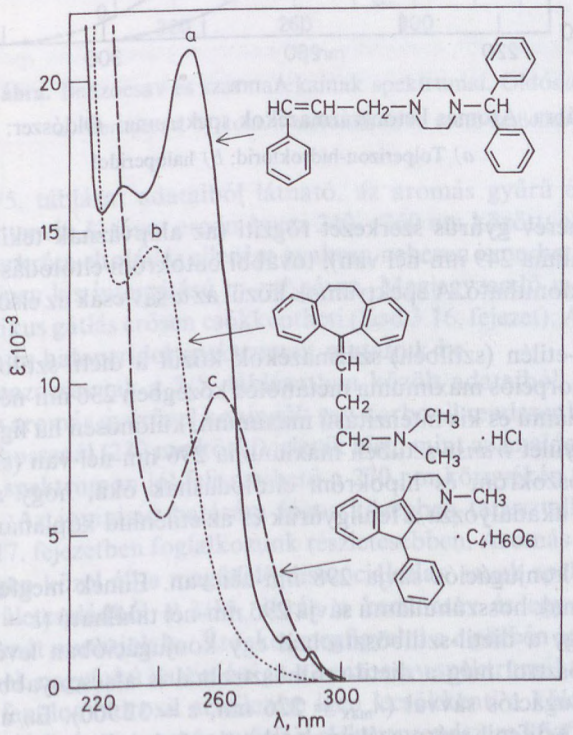


3/12. ábra. Kloramfenikol spektruma. Oldószer: metanol

3.8. Kromofor csoporttal konjugált benzolszármazékok

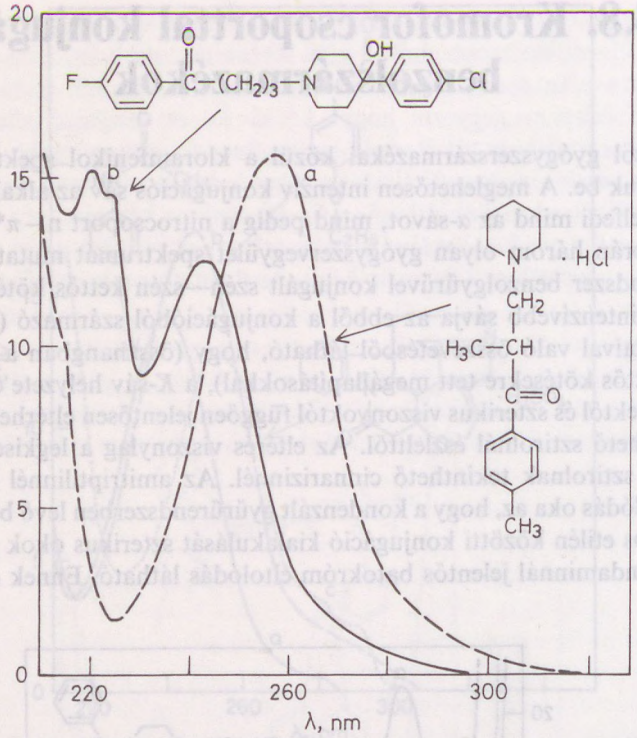
Nitro-benzol gyógyszerszármazékai közül a kloramfenikol spektrumát a 3/12. ábrán mutatjuk be. A meglehetősen intenzív konjugációs sáv az alkalmazott poláris oldószerben elfedi mind az α-sávot, mind pedig a nitrocsoport $n-\pi^*$ sávját.

A 3/13. ábrán három olyan gyógyszervegyület spektrumát mutatjuk be, ahol a kromofor rendszer benzolgyűrűvel konjugált szén—szén kettős kötés. Mindhárom spektrum legintenzívebb sávja az ebből a konjugációból származó (*K*) sáv. A 3/5. táblázat adataival való összevetésből látható, hogy (összhangban a 3.5. fejezetben konjugált kettős kötésekre tett megállapításokkal), a *K*-sáv helyzete és intenzitása a szubsztituensektől és szterikus viszonyoktól függően jelentősen eltérhet az alapvegyületnek tekinthető sztirolnál észlelttől. Az eltérés viszonylag a legkisebb a β-monoszubsztituált sztirolnak tekinthető cinnarizinnél. Az amitriptilinnél észlelhető hipszokróm eltolódás oka az, hogy a kondenzált gyűrűrendszerben levő benzolgyűrűk és az exociklusos etilén közötti konjugáció kialakulását szterikus okok gátolják. Ezzel szemben fenindaminnál jelentős batokróm eltolódás látható. Ennek oka az, hogy a



3/13. ábra. Sztirolszármazékok spektrumai. Oldószer: metanol.

a) Cinnarizin; *b)* amitriptilin-hidroklorid; *c)* fenindamin-tartarát

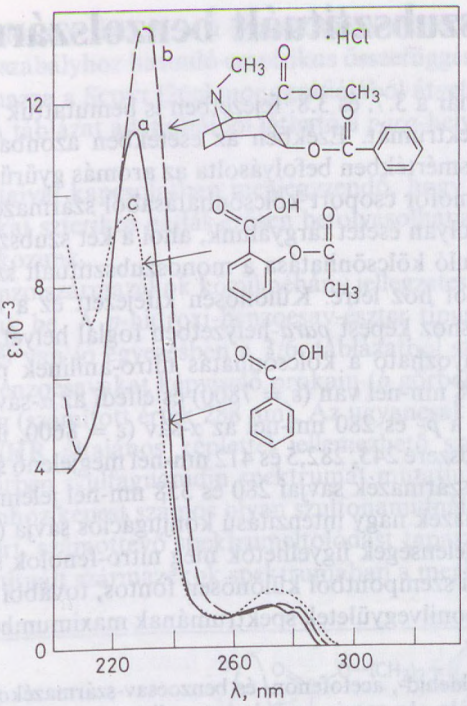


3/14. ábra. Aromás ketonszármazékok spektrumai. Oldószer: etanol.
a) Tolperizon-hidroklorid; *b)* haloperidol

konjugációt a merev gyűrűs szerkezet rögzíti (az alapváznak tekinthető indén abszorpciós maximuma 249 nm-nél van), további batokróm eltolódás az alkil szubsztituenseknek tulajdonítható. A spektrumok közül az α-sáv csak az első esetben ismerhető fel.

Az 1,2-difenil-etilén (sztilbén)-származékok közül a dietil-sztilbösztrolt említjük meg. Ennek abszorpciós maximuma metanolos közegben 236 nm-nél van ($\varepsilon = 11\,000$). Ez igen rövidhullámú és kis intenzitású maximum, különösen ha figyelembe vesszük, hogy az alapvegyület *transz*-sztilbén maximuma 296 nm-nél van ($\varepsilon = 29\,000$). Ennek a rendkívüli hipszokróm és hipokróm eltolódásnak oka, hogy a két etilcsoport szterikus gátlása akadályozza a fenilgyűrűk és az etilénhíd koplanáris beállását (lásd 3.16. fejezet).

Trifenil-etilén konjugációs sávja 298 nm-nél van. Ennek megfelelően klomifencitrát spektrumának hosszúhullámú sávja 295 nm-nél található ($\varepsilon = 11\,400$). Érdekes megjegyezni, hogy a dietil-sztilbösztrolnál egy konjugációban levő kettős kötéssel gazdagabb dienösztrol még a dietil-sztilbösztrolnál is alacsonyabb hullámhossznál rendelkezik konjugációs sávval ($\lambda_{max} = 226$ nm, $\varepsilon = 32\,900$). Ez a vegyület 1,4-dimetil-butadién 2,3-difenil-származékának tekinthető. 1,4-dimetil-butadiénre a Woodward-szabály alapján (lásd 3.5. fejezet) 224 nm-es érték számítható, jelezve azt, hogy dienösztrol fenolos gyűrűi nem vesznek részt a konjugációban.



3/15. ábra. Benzoesav és származékainak spektrumai. Oldószer: metanol.

a) Benzoesav; *b)* kokain-hidroklorid; *c)* acetil-szalicilsav

Amint az a 3/5. táblázat adataiból látható, az aromás gyűrű és az oxocsoport konjugációja is intenzív *K*-sávot eredményez 240—260 nm között; az α-sáv a jelentős batokróm és hiperkróm eltolódás ellenére gyakran nehezen ismerhető fel. Ez fokozottan érvényes az igen kis intenzitású $n-\pi^*$ sávra. Megjegyzendő még, hogy a *K*-sáv intenzitását szterikus gátlás erősen csökkentheti (lásd 3.16. fejezet). A leírtak illusztrálására tolperizon és haloperidol spektrumait mutatjuk be.

Amint az a benzoesavnak a 3/5. táblázatban közölt adataiból, valamint a 3/15. ábrán látható, az aromás gyűrűvel konjugált sav-karbonil rendszer konjugációs sávja rövidebb hullámhossznál (230 nm körül) jelenik meg, mint az analóg aromás ketonok esetében, s így a spektrumon jól felismerhető a 270 nm környékén finomszerkezettel megjelenő α-sáv. Az ionizáció hatására lúgos közegben tapasztalható hipszokróm eltolódással a 3.17. fejezetben foglalkozunk részletesebben. Aromás karbonsav-észterek spektruma igen közel áll a megfelelő disszociálatlan savak spektrumához.

Ebből a vegyületcsaládból a 3/15. ábrán a benzoesav és egy benzoesav-észter (kokain) spektrumát mutatjuk be. Érdekes megfigyelni a *c* görbén az acetil-szalicilsav spektrumát. Ennek nagyfokú hasonlósága a benzoesav spektrumához annak tulajdonítható, hogy a fenolos hidroxil acetilezése igen lecsökkenti a kölcsönhatást annak kötetlen elektronpárja és az aromás gyűrű π-elektronrendszere között (vö. szalicilsav spektrumadataival a 3/7. táblázatban). Hasonló jelenséget tárgyaltunk a 86. oldalon ösztradiol-dipropionát spektrumával kapcsolatban.

3.9. Diszubsztituált benzolszármazékok

Tulajdonképpen már a 3.7. és 3.8. fejezetben is bemutattuk számos diszubsztituált benzolszármazék spektrumát. Ezekben az esetekben azonban az alkil-, klór- stb. szubsztitúció csak kismértékben befolyásolta az aromás gyűrű és a hozzákapcsolódó auxokróm vagy kromofor csoport kölcsönhatásából származó fényelnyelést. Ebben a fejezetben néhány olyan esetet tárgyalunk, ahol a két szubsztituensnek a gyűrűvel, ill. egymással kialakuló kölcsönhatása a monoszubsztituált származékokhoz képest teljesen új spektrumot hoz létre. Különösen kifejezett ez a hatás akkor, ha a két szubsztituens egymáshoz képest *para*-helyzetben foglal helyet.

Igen jól tanulmányozható a kölcsönhatás nitro-anilinek példáján. Nitro-benzol konjugációs sávja 268 nm-nél van ($\varepsilon = 7800$) és elfedi az α-sávot. Anilin spektrumában 230 nm-nél van a *p*- és 280 nm-nél az α-sáv ($\varepsilon = 8600$, ill. 1430). Ugyanakkor *o*-nitro-anilin sávrendszere 245, 282,5 és 412 nm-nél megjelenő sávokból áll ($\varepsilon = 7000$, 5400, ill. 4500), a *m*-származék sávjai 280 és 358 nm-nél jelennek meg ($\varepsilon = 4800$, ill. 1450), míg a *p*-származék nagy intenzitású konjugációs sávja ($\varepsilon = 13\,500$) 381 nm-ig tolódik el. Hasonló jelenségek figyelhetők meg nitro-fenolok stb. esetében is.

A gyógyszerkémiai szempontból különösen fontos, további szubsztituenseket tartalmazó aromás karbonilvegyületek spektrumának maximumhelye a karbonilcsoport

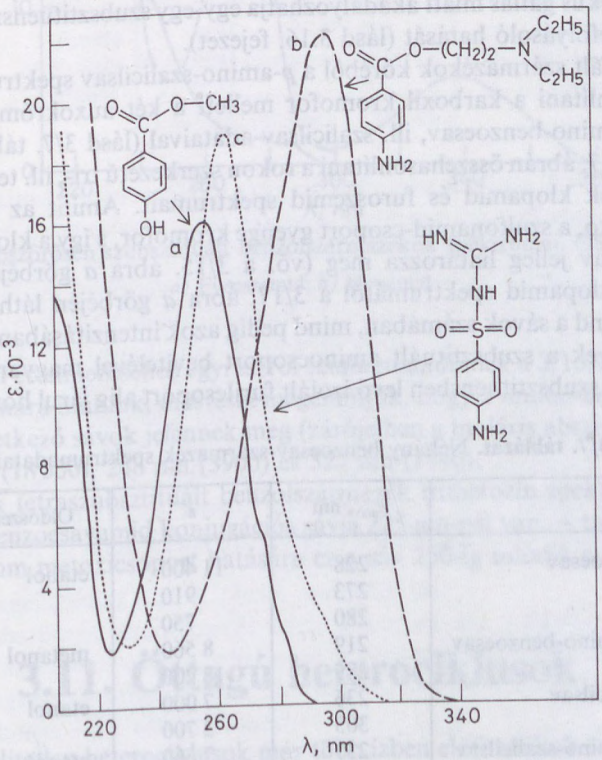
3/6. táblázat. Benzaldehid-, acetofenon- és benzoesav-származékok spektrumának számítása. A konjugációs sáv maximumhelye etanolban a szubsztituensek függvényében [26c]

Alapvegyület: C_6H_5-COR		λ_{max}, nm
R = alkil vagy aliciklusos gyűrű csatlakozás		246
R = H		250
R = OH vagy O-alkil		230
További szubsztituensek által okozott batokróm eltolódás:		
—alkil vagy aliciklusos gyűrű csatlakozás	*o-*, *m-*	3
	p-	10
—OH, O-alkil	*o-*, *m-*	7
	p-	25
—O^-	*o-*	11
	m-	20
	p-	78
—Cl	*o-*, *m-*	0
	p-	10
—Br	*o-*, *m-*	2
	p-	15
—NH_2	*o-*, *m-*	13
	p-	58
—NHAc	*o-*, *m-*	20
	p-	45
—NHMe	*p-*	73
—NMe_2	*o-*, *m-*	20
	p-	85

jellegétől (keton, aldehid, sav, észter) és a szubsztituens milyenségétől és helyzetétől függően a Woodward-szabályhoz hasonló empirikus összefüggés alapján számítható. A 3/6. táblázat tartalmazza a Scott [26c] monográfiájából átvett értékeket az eltolódások számításához. A táblázat adataiból jól látható a *para*-helyzetű szubsztituensek kitüntetett hatása.

A 3/6. táblázat adataival kapcsolatban megjegyzendő, hogy a sávok helyzetét és különösen intenzitásukat szterikus gátlás erősen befolyásolhatja. Ezzel a kérdéssel a 3.16. fejezetben foglalkozunk.

A diszubsztituált benzolszármazékok közül néhány jellegzetes vegyület spektrumát a 3/16. ábrán mutatjuk be. A *p*-hidroxi-benzoesav-észter típusú nipagin (*a* görbe) maximuma 256 nm-nél van jó egyezésben a 3/6. táblázatból számítható 255 nm-es értékkel. A *p*-amino-benzoesavakat képviselő prokain (*b* görbe) intenzív maximuma 296 nm-nél jelenik meg (számított érték 288 nm). Az ugyancsak *para*-diszubsztituált, $H_2N—C_6H_4—SO_2—NHR$ általános képlettel jellemezhető szulfonamidok tipikus képviselőjeként a *c* görbén szulfaguanidin spektrumát mutatjuk be. Megjegyzendő, hogy ehhez a spektrumhoz képest számos olyan szulfonamidnál, ahol *R* spektrofotometriásan aktív csoport, számottevő spektrumeltolódást tapasztalhatunk. Az eddig bemutatott *p*-diszubsztituált származékok spektrumában a meglehetősen hosszú hul-



3/16. ábra. Diszubsztituált benzolszármazékok spektrumai. Oldószer: metanol.
a) Nipagin; *b)* prokain-hidroklorid; *c)* szulfaguanidin

lámoknál megjelenő konjugációs sáv minden esetben teljesen elfedte az α-sávot. Nem ez a helyzet az *o*-diszubsztituált szalicilsav esetében, ahol a konjugációs sáv csak 236 nm-ig tolódik el (számított érték 237 nm), s így a 303 nm-nél megjelenő α-sáv jól elkülönül. (A fenolos hidroxil acetilezésével előállítható acetil-szalicilsav spektrumát a 3/15. ábrán láthattuk.)

Mivel valamennyi bemutatott vegyület tartalmaz ionizálható csoportokat, spektrumuk jellegzetes pH-függést mutat (lásd 3.17. fejezet).

3.10. Többszörösen szubsztituált benzolszármazékok

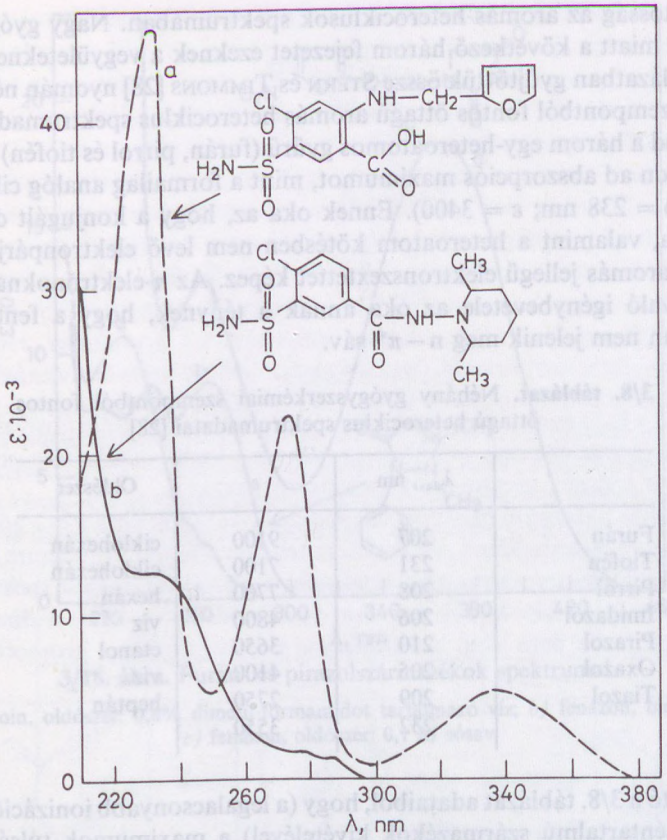
A gyógyszervegyületek körében ugyancsak előforduló többszörösen szubsztituált benzolszármazékok spektrumai általában megfelelően értelmezhetők az előző fejezetekben mono- és diszubsztituált származékokra lefektetett elvek alapján. Figyelembe kell azonban venni azt is, hogy a többszörös szubsztitúció következtében meglehetősen zsúfolt molekulák alakulnak ki, s ez különösen nagyobb térkitöltésű szubsztituensek esetén szterikus gátlás miatt akadályozhatja egy-egy szubsztituensnek a spektrumra gyakorolt befolyásoló hatását (lásd 3.16. fejezet).

Triszubsztituált származékok köréből a *p*-amino-szalicilsav spektrumadatait érdemes összehasonlítani a karboxil kromofor mellett a két auxokrómot külön-külön tartalmazó *p*-amino-benzoesav, ill. szalicilsav adataival (lásd 3/7. táblázat).

Érdekes a 3/17. ábrán összehasonlítani a rokon szerkezetű tri-, ill. tetraszubsztituált benzolszármazék klopamid és furoszemid spektrumait. Amint az a 3/5. táblázat adataiból látható, a szulfonamid-csoport gyenge kromofor, s így a klopamid spektrumát a benzoesav jelleg határozza meg (vö. a 3/15. ábra *a* görbéjével). Merőben különbözik a klopamid spektrumától a 3/17. ábra *a* görbéjén látható furoszemid spektrum. A mind a sávok számában, mind pedig azok intenzitásában megnyilvánuló nagy különbségek a szubsztituált aminocsoport bevitelével magyarázhatók annak ellenére, hogy a szubsztituensben levő izolált furilcsoport alig járul hozzá a spektrum-

3/7. táblázat. Néhány benzoesav-származék spektrumadatai

	λ_{max}, nm	ε	Oldószer
Benzoesav	228	11 400	etanol
	273	910	
	280	750	
4-Amino-benzoesav	219	8 560	metanol
	289	18 200	
Szalicilsav	236	7 000	etanol
	303	3 700	
4-Amino-szalicilsav	237	7 660	etanol
(PAS)	279	12 300	
	305	13 200	



3/17. ábra. Többszörösen szubsztituált benzolszármazékok spektrumai. Oldószer: metanol. *a)* Furoszemid; *b)* klopamid

hoz. A spektrum értelmezéséhez egyrészről szulfaguanidinnek a 3/16. ábra *c* görbéjén látható spektrumára utalunk, másrészt megemlítjük, hogy 2-amino-benzoesav spektrumában a következő sávok jelennek meg (zárójelben a moláris abszorpciós koefficiensek): 217 nm (18 500), 248 nm (3900) és 327 nm (1940).

Az ugyancsak tetraszubsztituált benzolszármazék trimetozin spektruma könnyen értelmezhető. Benzoesavamid konjugációs sávja 225 nm-nél van. A trimetozin spektrumában a három metoxicsoport hatására ez a sáv 250-ig tolódik el.

3.11. Öttagú heterociklusok

Telített, ill. telítetlen heterociklusok már több ízben előfordultak az eddig tárgyalt vegyületek molekuláiban. Ezek spektrális sajátságai általában csak csekély mértékben különböznek az analóg nyílt szénláncú származékokétól. Annál nagyobb a különbség

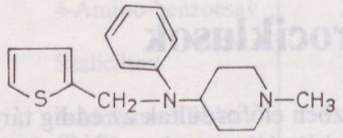
és a változatosság az aromás heterociklusok spektrumában. Nagy gyógyszerkémiai jelentőségük miatt a következő három fejezetet ezeknek a vegyületeknek szenteljük.

A 3/8. táblázatban gyűjtöttük össze STERN és TIMMONS [28] nyomán néhány gyógyszerkémiai szempontból fontos öttagú aromás heterociklus spektrumadatait. Látható, hogy mind a három egy-heteroatomos gyűrű (furán, pirrol és tiofén) alacsonyabb hullámhosszon ad abszorpciós maximumot, mint a formailag analóg ciklopentadién (λ_{max} (hexán) = 238 nm; ε = 3400). Ennek oka az, hogy a konjugált dién rendszer 4π-elektronja, valamint a heteroatom kötésben nem levő elektronpárja együttesen delokalizált aromás jellegű elektronszextettet képez. Az *n*-elektronoknak az aromás szextetthez való igénybevétele az oka annak a ténynek, hogy a fenti vegyületek spektrumában nem jelenik meg $n-\pi^*$ sáv.

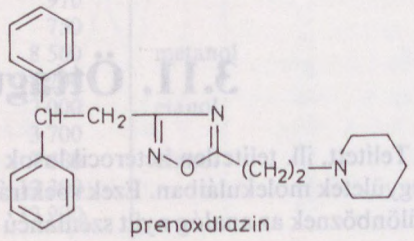
3/8. táblázat. Néhány gyógyszerkémiai szempontból fontos öttagú heterociklus spektrumadatai [28]

	λ_{max}, nm	ε	Oldószer
Furán	207	9100	ciklohexán
Tiofén	231	7100	ciklohexán
Pirrol	208	7700	hexán
Imidazol	206	4800	víz
Pirazol	210	3650	etanol
Oxazol	205	4100	víz
Tiazol	209	2750	heptán
	232	3550	

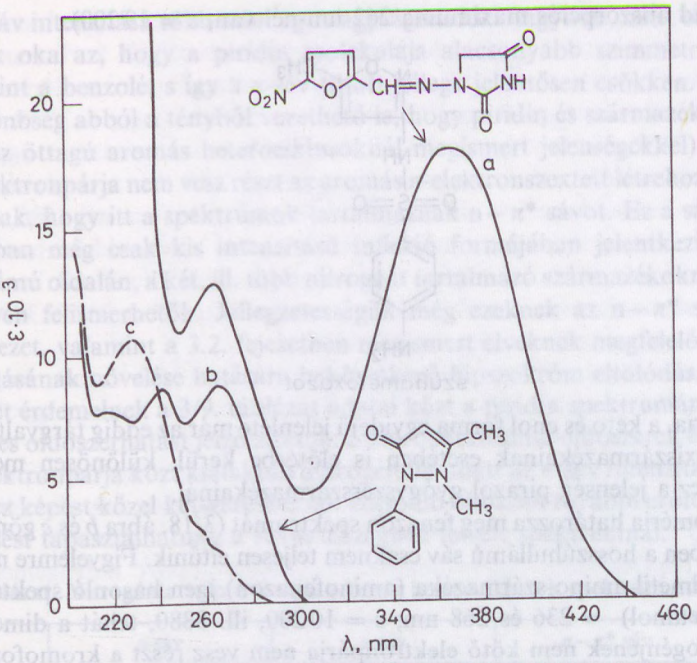
Az is látható a 3/8. táblázat adataiból, hogy (a legalacsonyabb ionizációs energiával rendelkező kéntartalmú származékok kivételével) a maximumok túlságosan rövid hullámhossznál jelennek meg, s az intenzitások sem haladják meg a közepes szintet. Így azok a gyógyszerszármazékok, amelyek ezeket a gyűrűket kromofor vagy auxokróm szubsztituens nélkül tartalmazzák, spektrofotometriásan csak gyengén aktívnak tekinthetők. Ilyen vegyület pl. a pilokarpin-hidroklorid, amelynek abszorpciós maximuma metanolos közegben 216 nm-nél van (ε = 5940), ami megfelel a dialkilszubsztituált imidazol spektrumának. Hasonló a helyzet hisztamin-hidrokloriddal (λ_{max} = 208 nm; ε = 5760) és hisztidinnel is, amit nem is szoktak spektrofotometriásan aktív aminosavnak tekinteni. Tipikusabbak azok az esetek, ahol a heteroaromás gyűrűtől izolált erősebb kromoforok elfedik az előbbiek spektrumát. Ez a helyzet pl. sandosten esetében, ahol a tioféngyűrű spektrumát az *N,N*-diszubsztituált



sandosten (tenalidin)



prenoxdiazin



3/18. ábra. Furán- és pirazolszármazékok spektrumai.

a) Nitrofurantoin, oldószer: 0,6% dimetil-formamidot tartalmazó víz; *b)* fenazon, oldószer: metanol; *c)* fenazon, oldószer: 0,1 M sósav

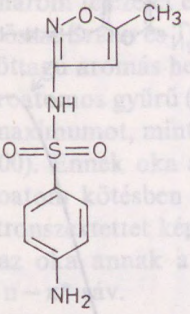
anilin spektruma fedi el (λ_{max} = 244 nm). Természetesen nem ismerhető fel a furil-csoport spektruma az erősen szubsztituált benzolgyűrűt tartalmazó furoszemid spektrumában (3/17. ábra). Még az izolált benzolgyűrűknek is meghatározó szerepük van prenoxdiazin spektrumában az oxadiazolgyűrűvel szemben (λ_{max} = 258 nm; ε = 460).

Auxokróm, ill. kromofor csoportokkal szubsztituált öttagú aromás heterociklusok spektruma a szubsztituensek függvényében rendkívül változatos képet mutat. Már egy formilcsoport bevitele a furángyűrű 2 helyzetébe (furfurol) igen erős batokróm és hiperkróm eltolódást mutat (λ_{max} = 278 nm; ε = 15 800), ennek a gyógyászatban felhasznált szubsztituált hidrazonjai, amelyek az 5 helyzetben még nitrocsoportot is tartalmaznak, már sárga színűek, 350 és 380 nm közti maximumokkal. Ezek közül nitrofurantoin spektrumát a 3/18. ábrán mutatjuk be.

Imidazol szubsztituált származékai közül a metimazolt említjük meg, amelynek maximuma a szulfhidril-csoport belépése következtében 251 nm-ig tolódik el (ε = 17 400). A gyógyászatban használatos számos 5-nitro-származék közül a metronidazol spektruma a 3/34. ábrán látható.

Szulfametoxazol spektrumában (λ_{max} = 270 nm; ε = 20 400) az oxazolgyűrű belépése viszonylag csekély hatással van a spektrumot meghatározó 4-amino-benzol-szulfonamid szerkezethez tartozó spektrumra (összehasonlításul a szubsztituálatlan

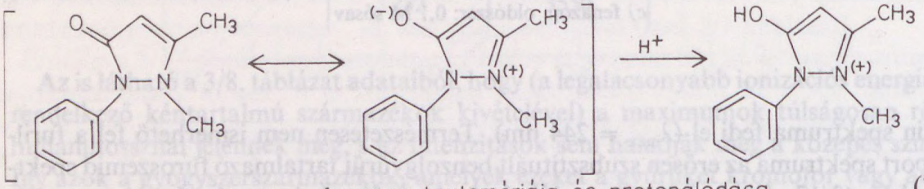
szulfanilamid abszorpciós maximuma 262 nm-nél van, $\varepsilon = 19\,200$).



szulfametoxazol

Tautoméria, a keto és enol forma egyidejű jelenléte már az eddig tárgyalt heterociklusok hidroxiszármazékainak esetében is előtérbe kerül, különösen meghatározó fontosságú ez a jelenség pirazol gyógyszerszármazékainál.

Ez a tautoméria határozza meg fenazon spektrumát (3/18. ábra *b* és *c* görbe): erősen savas közegben a hosszúhullámú sáv csaknem teljesen eltűnik. Figyelemre méltó, hogy fenazon 4-dimetil-amino-származéka (aminofenazon) igen hasonló spektrumot mutat: λ_{max} (metanol) = 236 és 268 nm; $\varepsilon = 10\,200$, ill. 8880, tehát a dimetil-amino-csoport nitrogénjének nem kötő elektronpárja nem vesz részt a kromofor elektronrendszerben.



fenazon tautomériája és protonálódása (3/2)

A rokon szerkezetű fenilbutazon etanolos közegben 239 nm-nél mutat maximumot ($\varepsilon = 15\,900$). Ennek a sávnak lúgos közegben bekövetkező, az enol forma disszociációjára visszavezethető igen erőteljes batokróm eltolódását a spektrumok pH-függésével foglalkozó 3.17. fejezetben mutatjuk be.

3.12. Hattagú heterociklusok

A hattagú aromás heterociklusok közül gyógyszerkémiai jelentőségüket tekintve kiemelkednek a nitrogéntartalmú származékok. Ezek spektruma nagyfokú analógiát mutat azoknak az aromás szénhidrogéneknek spektrumával, amelyekből egy vagy több =CH-csoportnak nitrogénre való cserélésével vezethetők le.

Amint az a 3/9. táblázat adataiból látható, piridin *p*- és α-sávjai pl. gyakorlatilag ugyanott jelennek meg, mint a benzol megfelelő sávjai. Igen fontos különbség az,

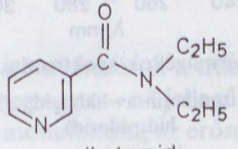
hogy az α-sáv intenzitása több mint egy nagyságrenddel nagyobb, mint benzol esetében. Ennek oka az, hogy a piridin molekulája alacsonyabb szimmetriaosztályba tartozik, mint a benzolé, s így a α-sáv tiltott jellege jelentősen csökken. Egy másik fontos különbség abból a tényből vezethető le, hogy piridin és származékai esetében (szemben az öttagú aromás heterociklusoknál megismert jelenségekkel) a nitrogén kötetlen elektronpárja nem vesz részt az aromás π-elektronszextett létrehozásában. Ez az oka annak, hogy itt a spektrumok tartalmaznak $n-\pi^*$ sávot. Ez a sáv a piridin spektrumában még csak kis intenzitású inflexió formájában jelentkezik az α-sáv hosszúhullámú oldalán, a két, ill. több nitrogént tartalmazó származékoknál azonban már könnyen felismerhetők. Jellegzetességük még ezeknek az $n-\pi^*$ sávoknak a finomszerkezet, valamint a 3.2. fejezetben megismert elveknek megfelelően az oldószer polaritásának növelése hatására bekövetkező hipszokróm eltolódás.

Figyelmet érdemelnek a 3/9. táblázat adatai közt a piridin spektrumára gyakorolt igen erőteljes oldószerhatást jelző adatok: a hidroxiltartalmú oldószerek és a nitrogén kötetlen elektronpárja közt kialakuló hidrogénhíd miatt az α-sáv intenzitása a hexánban mérthez képest közel kétszeresére nő. Hasonló okokból további erőteljes intenzitásnövekedést tapasztalhatunk a savas közegben felvett spektrumnál.

3/9. táblázat. Nitrogéntartalmú 6-tagú aromás heterociklusok spektrum adatai [28]

Vegyület	*p*-sáv		α-sáv		$n-\pi^*$ sáv		Oldószer
	λ_{max}, nm	ε	λ_{max}, nm	ε	λ_{max}, nm	ε	
Benzol	204	8 800	254	250	—		hexán
Piridin	198	6 000	251	2000	270	infl.	hexán
	195	5 400	257	3050	α-sáv	elfedi	víz
			256	5300	α-sáv	elfedi	5M HCl
Pirazin	194	6 100	260	6000	328	1050	hexán
			261	6270	302	800	víz
Piridazin	192	5 400	251	1400	340	315	hexán
			242	1400	299	320	víz
Pirimidin	189	10 000	244	2050	298	325	hexán
			244	3160	267	320	víz

Kromofor, ill. auxokrom csoportot nem tartalmazó egyszerű piridinszármazékok közül a 3/19. ábrán piridinolkarbamát spektrumát mutatjuk be (*b* görbe), ami igen közel áll a szubsztituálatlan piridin spektrumához (*a* görbe). Említést érdemel, hogy az *N*-alkil kvaterner származékok spektruma is hasonló (pl. cetil-piridinium-bromid: $\lambda_{max} = 260$; $\varepsilon = 4840$). A némileg megnövekedett intenzitást az okozza, hogy a kvaterner képződésnek ugyanaz a hatása, mint a fent említett sóképzésnek. Hasonló az izolált piridingyűrűt tartalmazó biszakodil spektruma is. A megnövekedett intenzitás ($\varepsilon_{261} = 5670$) oka itt a két fenol-acetát típusú gyűrű kismértékű hozzájárulása a spektrumhoz (vö. 3.7. fejezet).

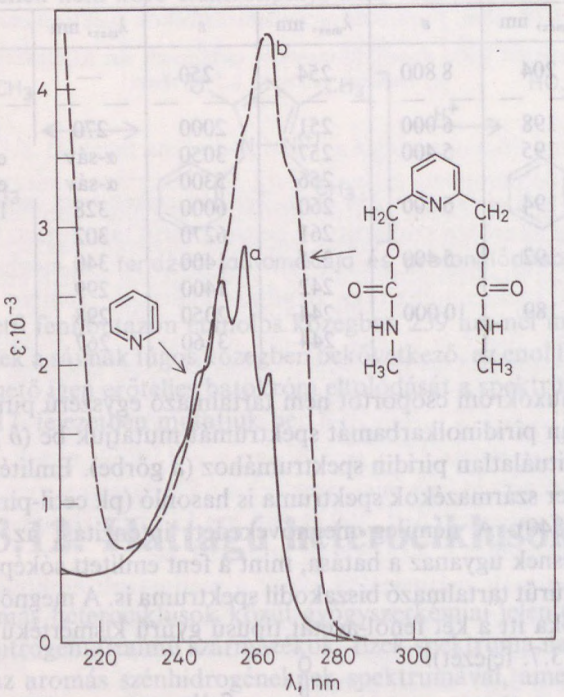


niketamid

A szubsztituált piridinszármazékok analitikai mérésének alapjául szolgáló α-sáv helyzetét és intenzitását a 3, ill. 4 helyzetbe bevitt karboxil, ill. karboxamid funkció nem befolyásolja döntően. Az abszorpciós maximumhoz tartozó moláris abszorpciós koefficiensek nikotinsav-származékok esetében: nikotinsav $\varepsilon_{263} = 2590$; nikotinsavamid $\varepsilon_{262} = 2950$; niketamid $\varepsilon_{263} = 3270$. Nagyobb az intenzitása az ugyanitt megjelenő sávnak savhidrazidok spektrumában, pl. a 3/19. ábra *c* görbéjén látható izonikotinsav-hidrazid moláris abszorpciós koefficiense 262 nm-nél 4580. Amint az a 3/19. ábra *d* görbéjén látható, etionamid esetében, ahol a savamid-karbonil oxigénjét kén helyettesíti, jelentős batokróm és hiperkróm eltolódás következik be. Figyelemre méltó még a sáv aszimmetrikus alakja és az ezzel összefüggésben 310 és 340 nm között megjelenő ($n-\pi^*$ sávnak tulajdonítható) inflexió.

Elsősorban a fenolos jellegű hidroxilszubsztitúció az oka annak, hogy B_6-vitamin spektrumában az α-sáv 292 nm-ig tolódik, és intenzitása is a legnagyobb az eddig tárgyalt spektrumok közül (lásd 3/19. ábra *e* görbéje).

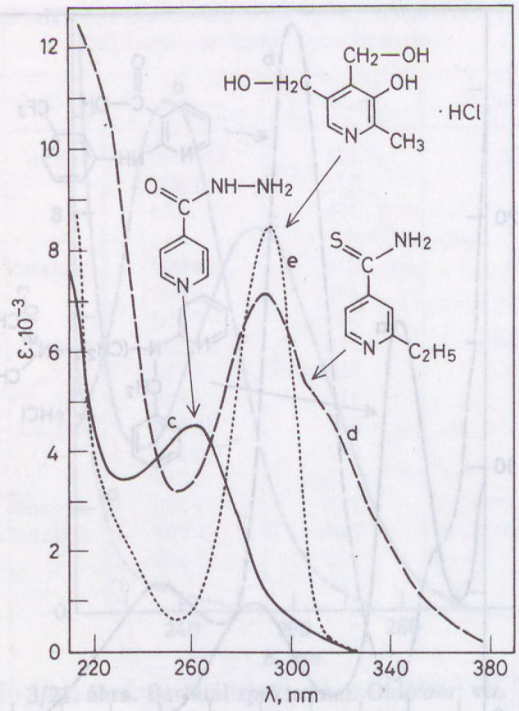
Egy másik fontos származékcsalád α-amino-piridinből vezethető le. Ennek spektrumában a *p*- és az α-sáv erőteljes batokróm eltolódása miatt két sáv jelenik meg a hozzáférhető ultraibolya tartományban 235 és 296 nm-nél. Az ebből a vegyületből levezethető tripelennamin spektrumában az aminocsoport hidrogénjeinek alkil-



3/19. ábra. Piridinszármazékok spektrumai. Oldószer: metanol.

a) Piridin; *b)* piridinol-karbamát; *c)* izonikotinsav-hidrazid; *d)* etionamid; *e)* B_6-vitamin (piridoxin-hidroklorid)

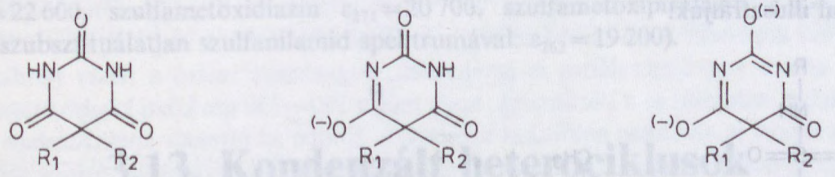
MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA KÖNYVTÁRA



3/19./B ábra

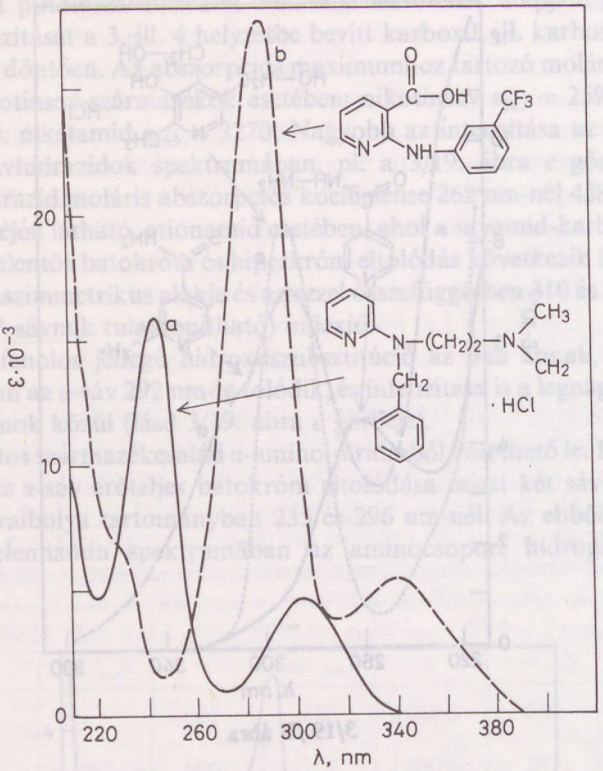
szubsztitúciója miatt további batokróm eltolódás tapasztalható (lásd 3/20. ábra). A fenilszubsztituált α-amino-csoportot tartalmazó niflumínsav abszorpciós sávja 342 nm-ig tolódik el ($\varepsilon = 5410$).

A két nitrogénatomot tartalmazó hattagú heterociklusok közül jelentőségüket tekintve kiemelkednek a pirimidinszármazékok. A pirimidinből levezethető barbiturátok az 5 helyzetben minden esetben helyet foglaló két szubsztituens miatt sohasem vehetik fel az aromás szerkezetet. A laktám-laktim tautoméria eredményeként, a két mobilizálható hidrogén lépcsőzetes leszakításával az 5-diszubsztituált barbiturátoknak 3 formája lehetséges:



0,1 M sav pH 10 1 M NaOH

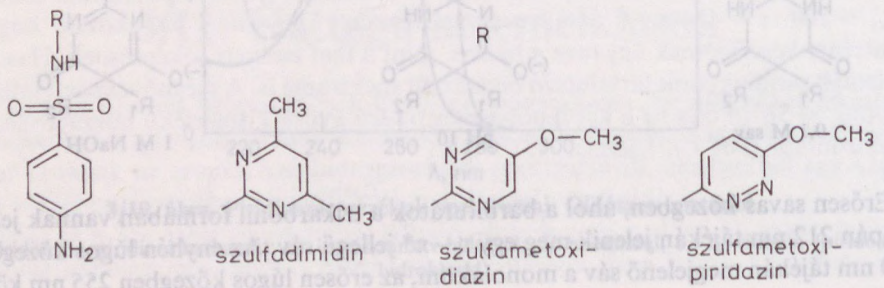
Erősen savas közegben, ahol a barbiturátok a trikarbonil formában vannak jelen, csupán 212 nm tájékán jelenik meg egy $n - \pi^*$ jellegű sáv. Az enyhén lúgos közegben 240 nm tájékán megjelenő sáv a monolaktim, az erősen lúgos közegben 255 nm körül

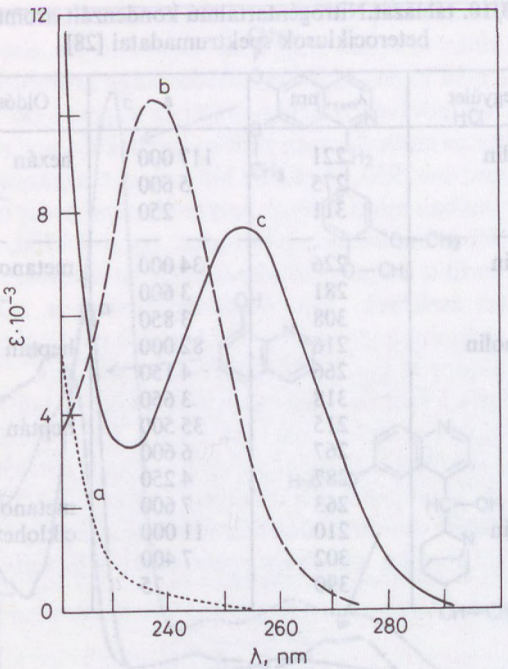


3/20. ábra. α-Amino-piridin-származékok spektrumai. Oldószer: metanol.
a) Tripelennamin-hidroklorid; *b)* nifluminsav

jelentkező sáv pedig a dilaktim formához tartozik. Az R_1 és R_2 szubsztituenseknek nincs különösebb hatásuk a spektrumra, csupán az izolált fenilcsoportot tartalmazó fenobarbitál esetében figyelhető meg az erősen savas közegben felvett spektrum leszálló ágán finomszerkezet 260 nm körül.

A leírtakat barbitál ($R_1 = R_2 = C_2H_5$) spektrumainak a 3/21. ábrán való bemutatásával illusztráljuk.





3/21. ábra. Barbitál spektrumai. Oldószer: víz.

a) 0,1 M kénsavas közeg; *b)* pH 10; *c)* 1 M nátrium-hidroxid

Amennyiben az 5 helyzetű két szubsztituensen kívül még az 1 helyzetű nitrogén is hordoz alkilszubsztituenst (pl. hexobarbitál), a második tautomer egyensúly már nem tud beállni, s így a pH 9 felett 243 nm tájékán megjelenő sávon túlmenően magasabb pH-n sem jelenik meg újabb sáv. A 2-es helyzetű C=O-csoport C=S-re való cseréje viszont (pl. tiopentál-Na) igen erőteljes batokróm és hiperkróm eltolódást eredményez (λ_{max} = 305 nm: ε = 20 400).

Pirimidin, ill. piridazin egységet tartalmazó szulfonamidok spektrumában a heterociklus hozzájárulása a spektrumhoz viszonylag csekély. Pl. szulfadimidin $\varepsilon_{269} = 22\,600$, szulfametoxidiazin $\varepsilon_{271} = 20\,700$, szulfametoxipiridazin $\varepsilon_{268} = 21\,700$ (vö. szubsztituálatlan szulfanilamid spektrumával: $\varepsilon_{262} = 19\,200$).

3.13. Kondenzált heterociklusok

A gyógyszervegyületek körében nagy gyakorisággal előforduló két-, ill. többgyűrűs kondenzált heterociklusos rendszerek néhány fontosabb alapvázának spektrumadatait a 3/10. táblázatban mutatjuk be.

3/10. táblázat. Nitrogéntartalmú kondenzált aromás heterociklusok spektrumadatai [28]

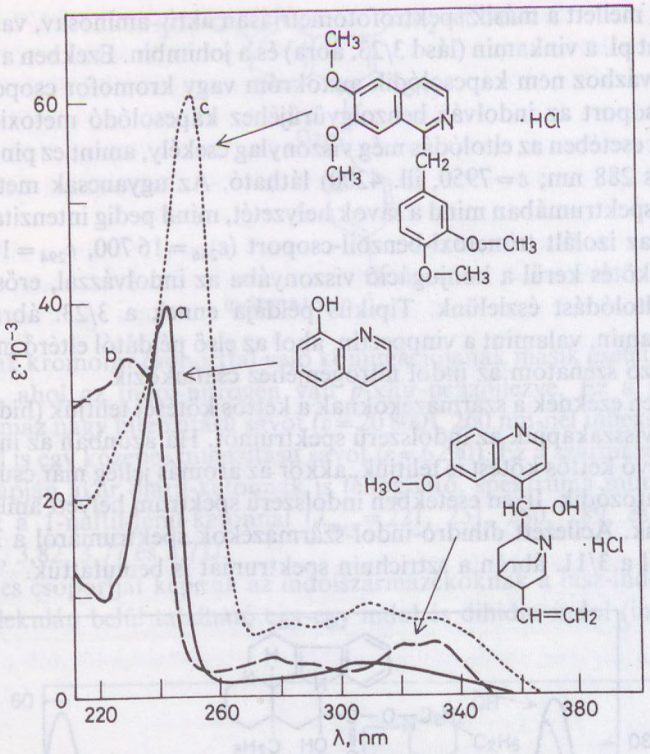
Vegyület	λ_{max}, nm	ε	Oldószer
Naftalin	221	117 000	hexán
	275	5 600	
	311	250	
Kinolin	226	34 000	metanol
	281	3 600	
	308	3 850	
Izokinolin	216	82 000	heptán
	266	4 150	
	318	3 650	
Indol	215	35 500	heptán
	267	6 600	
	287	4 250	
Purin	263	7 600	metanol
Pteridin	210	11 000	ciklohexán
	302	7 400	
	390	75	

3.13.1. Kinolin- és izokinolinszármazékok

A 3/10. táblázat adatainak a 3/7. ábrával való összevetéséből látható, hogy megfelelően a benzol és a piridin spektrumainak a 3.12. fejezetben tárgyalt hasonlóságához, a kinolin és az izokinolin spektrumai sok rokonságot mutatnak a naftalin spektrumával.

Kinolin származékai közül a 3/22. ábra *a* görbéjén 8-oxi-kinolin spektrumát mutatjuk be. A spektrum nagy intenzitású fősávja naftalin 220 nm-nél, ill. kinolin 226 nm-nél megjelenő sávjából származtatható a szubsztituens hatására végbemenő batokróm eltolódással. Hasonló a helyzet kinin spektrumával is (*b* görbe), a batokróm hatás azonban itt kisebb mértékű. A metoxicsoportot nem tartalmazó cinchonin és cinchonidin spektruma már teljesen kinolinszerű. Jód-klór-oxi-kinolin spektruma a 263. oldalon a 8/1. ábrán látható.

Az izokinolinvázas alkaloidákat a *c* görbén feltüntetett papaverin-hidroklorid spektrum képviseli. A kinolinvázas vegyületekkel kapcsolatos megállapítások lényegében erre a vegyületcsaládra is érvényesek. Figyelemre méltó a fősáv rendkívüli intenzitása, valamint az a körülmény, hogy még a 280—330 nm közti kisebb intenzitású sávcsoport is alkalmas analitikai mérésekre. Ebben az intenzív spektrumban még a dimetoxi-benzil-csoport is spektrofotometriásan „inaktív" szubsztituensnek számít: csak kismértékben járul hozzá a spektrumhoz.

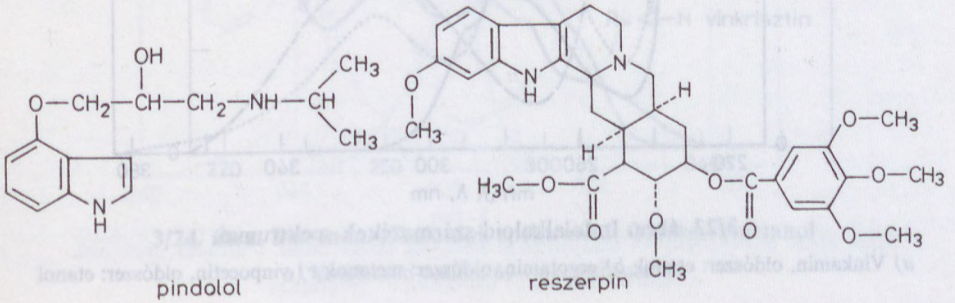


3/22. ábra. Kinolin- és izokinolinszármazékok spektrumai.

a) 8-hidroxi-kinolin, oldószer: etanol; *b)* kinin-hidroklorid, oldószer: metanol; *c)* papaverin-hidroklorid, oldószer: 0,01 M vizes sósav

3.13.2. Indolszármazékok

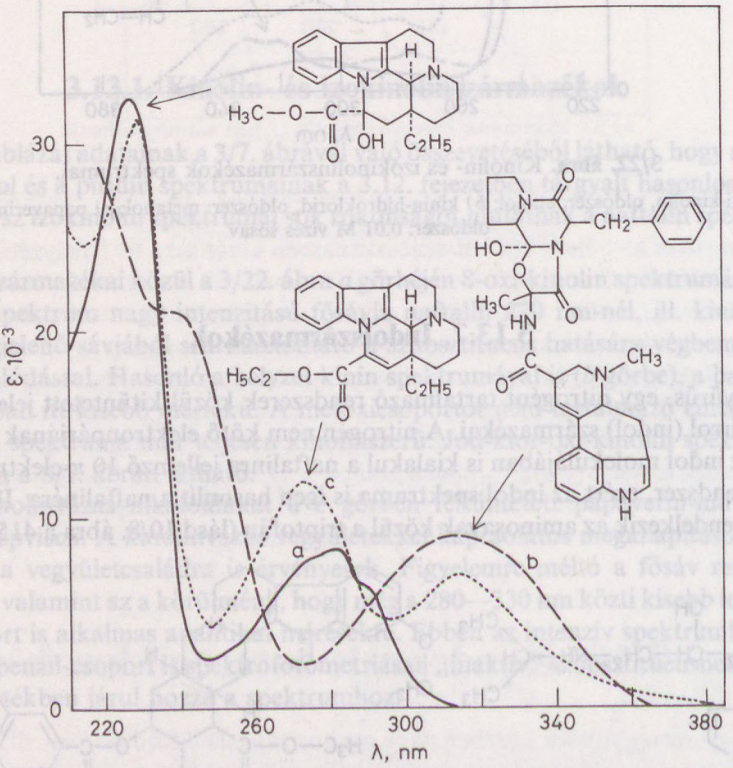
A kétgyűrűs, egy nitrogént tartalmazó rendszerek közül kitüntetett jelentőségűek a benzopirrol (indol) származékai. A nitrogén nem kötő elektronpárjának felhasználásával az indol molekulájában is kialakul a naftalinra jellemző 10 π-elektronból álló aromás rendszer, ezért az indol spektruma is igen hasonlít a naftalinéra. Ilyen spektrummal rendelkezik az aminosavak közül a triptofán (lásd 10/8. ábra a 415. oldalon),



pindolol reszerpin

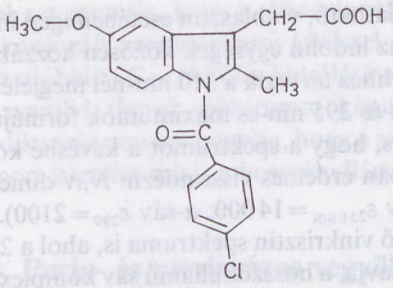
ami a tirozin mellett a másik spektrofotometriásan aktív aminosav, valamint számos alkaloid, mint pl. a vinkamin (lásd 3/23. ábra) és a johimbin. Ezekben a származékokban az indolvázhoz nem kapcsolódik auxokróm vagy kromofor csoport. Jellegzetes auxokróm csoport az indolváz benzolgyűrűjéhez kapcsolódó metoxicsoport. Ilyen származékok esetében az eltolódás még viszonylag csekély, amint ez pindolol példáján ($\lambda_{max} = 265$ és 288 nm; $\varepsilon = 7950$, ill. 4200) látható. Az ugyancsak metoxiszubsztituált reszerpin spektrumában mind a sávok helyzetét, mind pedig intenzitását jelentősen befolyásolja az izolált trimetoxi-benzoil-csoport ($\varepsilon_{266} = 16\,700$, $\varepsilon_{294} = 10\,200$). Ha viszont kettős kötés kerül a konjugáció viszonyába az indolvázzal, erős batokróm és hiperkróm eltolódást észlelünk. Tipikus példája ennek a 3/23. ábrán ugyancsak látható ergotamin, valamint a vinpocetin, ahol az első példától eltérő módon a kettős kötést hordozó szénatom az indol nitrogénjéhez csatlakozik.

Amennyiben ezeknek a származékoknak a kettős kötését telítjük (hidrált anyarozsalkaloidok), visszakapjuk az indolszerű spektrumot. Ha azonban az indolváz öttagú gyűrűjében levő kettős kötést is telítjük, akkor az aromás jelleg már csupán a hattagú gyűrűre korlátozódik. Ilyen esetekben indolszerű spektrum helyett anilinszerű spektrumot kapunk. Acilezett dihidro-indol-származékok spektrumáról a 3.7. fejezetben volt szó, ahol a 3/11. ábrán a sztrichnin spektrumát is bemutattuk.



3/23. ábra. Indolalkaloid-származékok spektrumai.

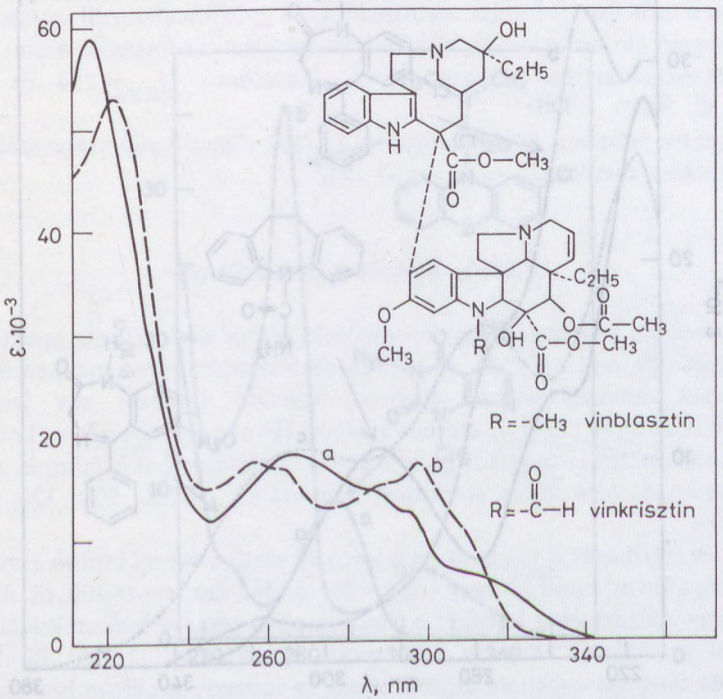
a) Vinkamin, oldószer: etanol; *b)* ergotamin, oldószer: metanol; *c)* vinpocetin, oldószer: etanol



indometacin

Indolváznak kromofor csoporttal való konjugációjának másik esetét pl. indometacin képviseli, ahol az indol-nitrogén van *p*-klór-benzoilezve. Ez a spektrum 230 nm-nél tartalmaz nagy intenzitású sávot ($\varepsilon = 20\,800$), 260 nm-nél inflexiót ($\varepsilon = 16\,200$) és 319 nm-nél is egy közepes intenzitású sávot ($\varepsilon = 6290$). Ez a származék a korábban leírt elvek alapján akár diaril-ketonnak is felfogható, spektruma mutat is bizonyos hasonlóságot a 1-naftil-fenil-ketonnal ($\lambda_{max} = 221$, 251, 280, 289, és 307 nm; log $\varepsilon = 4{,}70$, 4,22, 3,82, 3,77 és 3,71).

Igen érdekes csoportját képezik az indolszármazékoknak a bisz-indol-alkaloidok, ahol egy molekulán belül található egy-egy indol és dihidro-indol (indolin) egység.



3/24. ábra. Bisz-indol-alkaloidok spektrumai. Oldószer: metanol

a) Vinblasztin-szulfát; *b)* vinkrisztin-szulfát

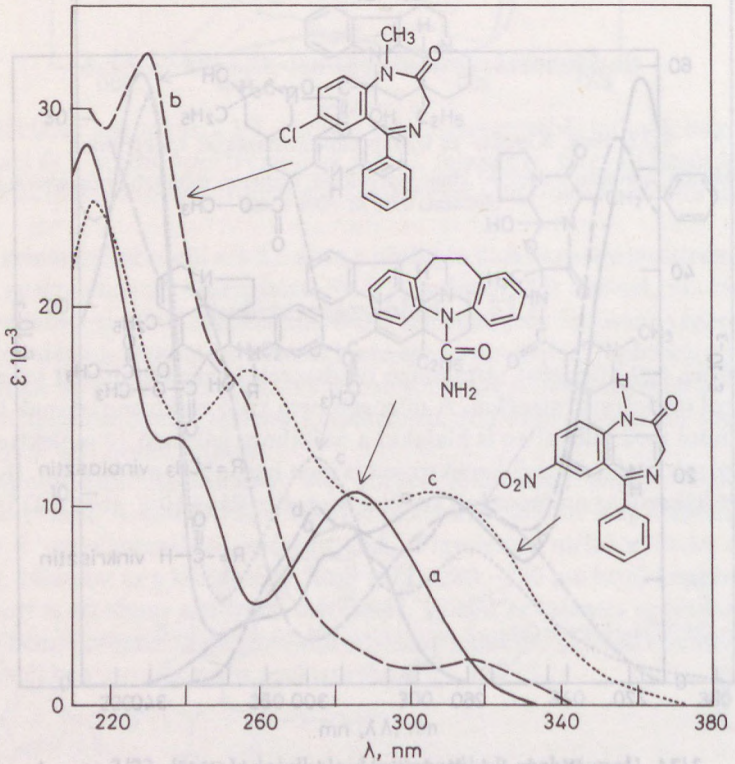
Amint az a 3/24. ábrán látható, vinblasztin esetében igen intenzív sáv jelenik meg 214 nm-nél; ezt az indol és az indolin egységek közösen hozzák létre. A 267 nm-es sáv az indolin egység *p*-sávja; ehhez tartozik a 310 nm-nél megjelenő inflexió (α-sáv). Közöttük helyezkedik el a 286 és 295 nm-es maximumok formájában megjelenő jellegzetes indol spektrum. Érdekes, hogy a spektrumot a kevésbé konjugált indolin kromofor uralja. Ezzel kapcsolatban érdemes visszaidézni *N,N*-dimetil-anilin spektrumadatait a 3/4. táblázatból (*p*-sáv $\varepsilon_{251\,nm} = 14\,000$; α-sáv $\varepsilon_{299} = 2100$).

Hasonlóan értékelhető vinkrisztin spektruma is, ahol a 255 nm-es sáv az acetanilid típusú formil-indolin *p*-sávja, a hosszúhullámú sáv komplexumot pedig a formil-indolin egység α-sávja, valamint az indol egység sávkomplexuma együttesen hozza létre.

3.13.3. Benzazepinek és diazepinek

Karbamazepin erős konjugációt mutató spektruma (a molekula egyidejűleg tekinthető *cisz*-stilbén- és difenil-amin-származéknak) a 3/25. ábrán látható.

Ugyancsak a 3/25. ábrán tüntettük fel a nagy fontosságú benzdiazepin család két jellegzetes tagjának spektrumát. Diazepám spektruma két maximumot és egy inflexiót



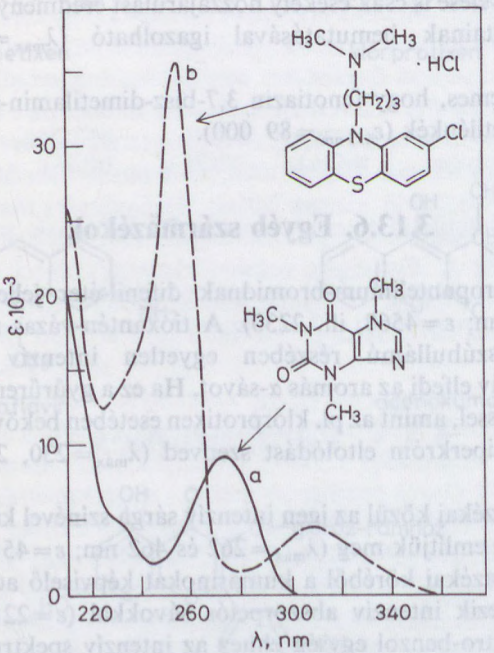
3/25. ábra. Benzazepin- és diazepinszármazékok spektrumai. Oldószer: metanol.
a) Karbamazepin; *b)* diazepam; *c)* nitrazepam

tartalmazó sávrendszerével azt mutatja, hogy a diazepingyűrű egyrészről savanilid jellegű, másrészről pedig konjugált azometinszerű kötéssel kapcsolódik az aromás gyűrűhöz. (Amennyiben az utóbbit a C=N kötés hidrálásával kikapcsoljuk a konjugációból, egyértelműen savanilid típusú spektrumot kapunk: $\varepsilon_{252\,nm} = 13\,400$.) A 3/25. ábrán látható harmadik spektrum azt mutatja, hogy a nitrazepám molekulájába beépített aromás nitrocsoport jelenléte miatt a hosszúhullámú sáv intenzitása erősen megnő.

3.13.4. Purin- és pterinvázas vegyületek

Az egymással közeli rokonságban levő két vázzal rendelkező gyógyszerek közül a nagy fontosságú xantinok nem enolizálható karbonilcsoportjaik miatt nem képesek aromás formát felvenni. Amint az a 3/11. táblázatban látható, a három fontos származék (teofillin, teobromin, koffein) spektruma alig különbözik egymástól: a 270 nm tájékán megjelenő sávnak nincs finomszerkezete. A három közül a koffein spektrumát a 3/26. ábra *a* görbéjén tüntettük fel. A 3/22. táblázatban a purinvázzal izomer allopurin-vázat tartalmazó allopurinol spektrumadatait is feltüntettük.

Az aromás pterinvázat tartalmazó származékok közül fólsav és antagonistája, a metotrexát adatait tartalmazza a 3/11. táblázat. A sárga, ill. narancsszínű származékok színe az auxokróm csoportokkal szubsztituált diamino-pterin egységhez tartozik; a tőle izolált *p*-dimetil-amino-benzoesav-amid egység ehhez nem járul hozzá.



3/26. ábra. Purin- és fenotiazinszármazékok spektrumai. Oldószer: metanol.
a) Koffein; *b)* klórpromazin-hidroklorid

3/11. táblázat. Purin- és pterinvázas gyógyszerek spektrumadatai. Oldószer: metanol [9]

Vegyület	λ_{max}, nm	ε
Teofillin	269	9 020
Teobromin	271	9 580
Koffein	273	9 220
6-Merkaptopurin	328	16 890
Allopurinol	249	7 700
Fólsav	260	23 500
	284	28 970
Metotrexát	263	16 820
	299	24 370

3.13.5. Fenotiazinszármazékok

A két benzolgyűrűvel kondenzált 1,4-tiazin (fenotiazin) jellegzetes, két sávból álló spektrummal rendelkezik. Igen nagyszámú szubsztituált származékának többsége nem-kromofor tulajdonságú szubsztituenseket hordoz. Ezek spektruma igen hasonlít a csupasz váz spektrumához. Mint jellegzetes példát a 3/26. ábra *b* görbéjén klórpromazin spektrumát mutatjuk be. A fenotiazin váz intenzív spektruma mellett még a meglehetősen erős kromofornak tekinthető, de a gyűrűrendszertől izolált trimetoxi-benzoil-csoport elnyelése is csak csekély hozzájárulást eredményez, amint ez metofenazát spektrumadatainak bemutatásával igazolható ($\lambda_{max} = 254$ és 306 nm; $\varepsilon = 33\,600$, ill. 3900).

Megjegyzésre érdemes, hogy fenotiazin 3,7-bisz-dimetilamin-származékának oxidációs terméke a metilénkék ($\varepsilon_{655\,nm} = 89\,000$).

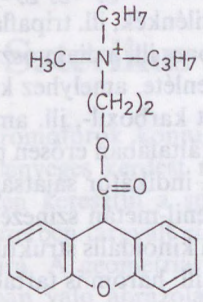
3.13.6. Egyéb származékok

A xanténvázas propantelinium-bromidnak difenil-éter jellegű spektruma van ($\lambda_{max} = 243$ és 281 nm; $\varepsilon = 4560$, ill. 2230). A tioxantén-vázas metixén-hidroklorid spektrumának hosszúhullámú részében egyetlen intenzív sáv jelenik meg ($\varepsilon_{269} = 11\,300$), ez a sáv elfedi az aromás α-sávot. Ha ez a gyűrűrendszer konjugációba kerül egy kettős kötéssel, amint az pl. klórprotixen esetében bekövetkezik, a spektrum erős batokróm és hiperkróm eltolódást szenved ($\lambda_{max} = 230$, 270, 326; $\varepsilon = 30\,000$, 14 200, 3150).

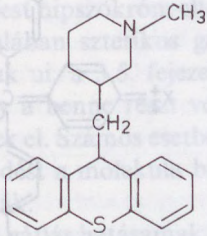
Az akridin származékai közül az igen intenzív sárga színével kitűnő akriflavinium-kloridot (tripaflavin) említjük meg ($\lambda_{max} = 262$ és 462 nm; $\varepsilon = 45\,400$, ill. 45 600).

Benzopirán származékai köréből a kumarinokat képviselő acenokumarol 282 és 305 nm-nél rendelkezik intenzív abszorpciós sávokkal ($\varepsilon = 22\,500$, ill. 18 000). A molekulában levő nitro-benzol egység ehhez az intenzív spektrumhoz csak csekély mértékben járul hozzá. Ide sorolhatók a benzo-γ-piron-vázas flavonoidok pl. a rutin, amelynek 264 és 382 nm-nél van intenzív sávja ($\varepsilon = 23\,000$, ill, 17 700). Megjegyzendő,

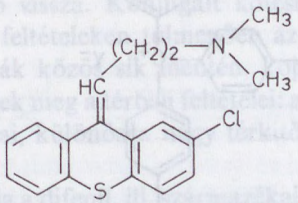
hogy a flavonoidok erős sárga színét eredményező batokróm és hiperkróm eltolódás a benzo-γ-piron-vázhoz csatlakozó fenilcsoport, valamint a fenolos és enolos hidroxilcsoportok jelenlétének következménye.



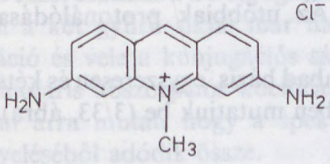
propantelinium-bromid



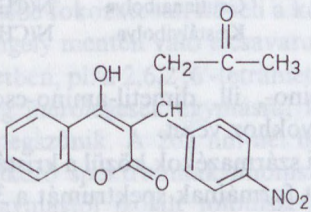
metixen



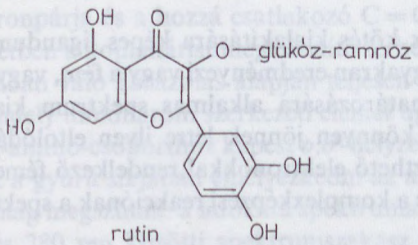
klórprotixen



tripaflavin



acenokumarol

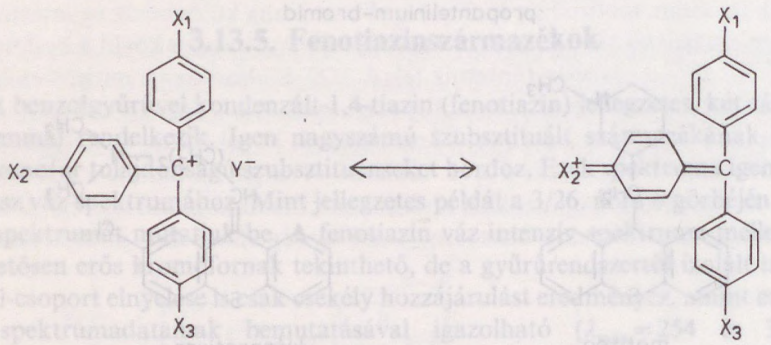


rutin

3.14. Színezékek

Az előző fejezetben már megemlítettünk egy-egy gyógyászatban is használt fenotiazin-, ill. akridinvázas színezéket (metilénkék, ill. tripaflavin). Számos további színezék is felhasználásra kerül a gyógyászatban, ill. a diagnosztikában. Ezek közös jellemzője aromás gyűrű, ill. gyűrűrendszer jelenléte, amelyhez kromofor és auxokróm csoportok csatlakoznak. Mivel ezek között karboxil-, ill. amincsoportok csaknem minden esetben előfordulnak, a spektrumok általában erősen pH-függőek, aminek következtében ezek a származékok általában indikátor sajátságokkal rendelkeznek.

A legnagyobb jelentőséggel a trifenil-metán színezékek bírnak. Itt a trifenil-metil kation pH-függő egyensúlyban van a kinoidális struktúrával jellemezhető származékkal. Az aromás gyűrűk közül kettő, ill. három is tartalmazhat *para* helyzetű amino-,



	X_1	X_2	X_3	Y^-
Brillantzöld	H	$N(C_2H_5)_2$	$N(C_2H_5)_2$	HSO_4^-
Gentianaibolya	$N(CH_3)_2$	$N(CH_3)_2$	$NH(CH_3)$	Cl^-
Kristályibolya	$N(CH_3)_2$	$N(CH_3)_2$	$N(CH_3)_2$	Cl^-

metil-amino-, ill. dimetil-amino-csoportokat. Az utóbbiak protonálódása újabb egyensúlyokhoz vezet.

A fenti származékok közül a kristályibolya szabad bázis, egyszeresen és kétszeresen protonált formáinak spektrumát a 3.17. fejezetben mutatjuk be (3/33. ábra).

3.15. Fémkomplexek

Fémionok és komplex kötés kialakítására képes ligandum ionok; ill. molekulák közti kölcsönhatás igen gyakran eredményezi vagy a fém, vagy a ligandum jellemzésére, ill. kvantitatív meghatározására alkalmas spektrum kialakulását vagy annak eltolódását. Különösen könnyen jönnek létre ilyen eltolódások a *d*, ill. *f* mezőbe tartozó, könnyen gerjeszthető elektronokkal rendelkező fémekkel. A 7.7. fejezetben több példát mutatunk be a komplexképzési reakciónak a spektrofotometriás analízisben való alkalmazására.

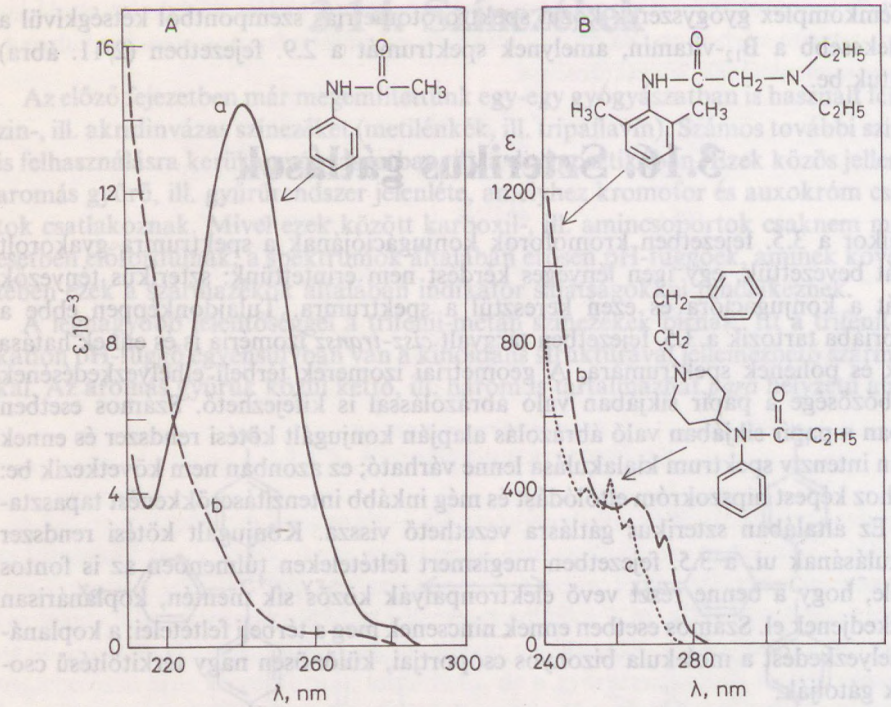
A fémkomplex gyógyszerek közül spektrofotometriás szempontból kétségkívül a legérdekesebb a B_{12}-vitamin, amelynek spektrumát a 2.9. fejezetben (2/11. ábra) mutattuk be.

3.16. Szterikus gátlások

Amikor a 3.5. fejezetben kromoforok konjugációjának a spektrumra gyakorolt hatását bevezettük, egy igen lényeges kérdést nem érintettünk: szterikus tényezők hatását a konjugációra és ezen keresztül a spektrumra. Tulajdonképpen ebbe a kategóriába tartozik a 3.5. fejezetben tárgyalt *cisz-transz* izoméria is és ennek hatása diének és poliének spektrumára. A geometriai izomerek térbeli elhelyezkedésének különbözősége a papír síkjában való ábrázolással is kifejezhető. Számos esetben azonban a papír síkjában való ábrázolás alapján konjugált kötési rendszer és ennek alapján intenzív spektrum kialakulása lenne várható; ez azonban nem következik be: a várthoz képest hipszokróm eltolódást és még inkább intenzitáscsökkenést tapasztalunk. Ez általában szterikus gátlásra vezethető vissza. Konjugált kötési rendszer kialakulásának ui. a 3.5. fejezetben megismert feltételeken túlmenően az is fontos feltétele, hogy a benne részt vevő elektronpályák közös sík mentén, koplanárisan helyezkedjenek el. Számos esetben ennek nincsenek meg a térbeli feltételei: a koplanáris elhelyezkedést a molekula bizonyos csoportjai, különösen nagy térkitöltésű csoportok gátolják.

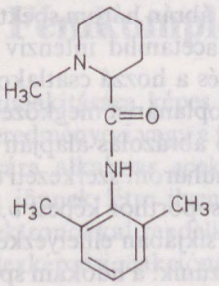
A szterikus gátlás hatásainak klasszikus példája a difenil, ill. származékainak esete. Szubsztituálatlan difenil két benzolgyűrűje közel koplanárisan helyezkedik el. A kialakuló intenzív, finomszerkezettel nem rendelkező konjugációs sáv ($\lambda_{max} = 252$ nm, $\varepsilon = 18\,300$) elfedi a benzol finomszerkezettel rendelkező α-sávját. Alkilcsoportok fokozatos beépítése a molekula négy *orto*-helyzetébe fokozatosan növeli a két gyűrűnek az őket összekötő szén—szén kötés mint tengely mentén való elcsavarodásának szögét, s ezzel csökkenti a konjugációt. Szélső esetben, pl. a 2,6,2',6'-tetrametil-difenil esetében a két gyűrű síkjai már megközelítőleg merőlegesek egymásra, köztük a konjugáció és vele a konjugációs sáv teljesen megszűnik. A 262 nm-nél megjelenő 500-as moláris abszorpciós koefficienssel rendelkező spektrumnak finomszerkezete van, ami arra mutat, hogy a spektrum két egymástól izolált toloulszerű egység fényelnyeléséből adódik össze.

Hasonló példát számosat találhatunk gyógyszervegyületek, elsősorban aromás származékok körében is. A 3/27. ábrán három spektrumot tüntettünk fel. Amint arra a 3.7. fejezetben rámutattunk, acetanilid intenzív spektruma az aromás gyűrű, a nitrogén kötetlen elektronpárja és a hozzá csatlakozó C=O kötés konjugációjából származik. Ebben az esetben a koplanárist megközelítő térbeli elrendeződésnek nincs akadálya. A papír síkjában való ábrázolás alapján teljesen hasonló spektrum lenne várható a lidokaintól, amely mindhárom szerkezeti elemet ugyanúgy tartalmazza. Ez esetben azonban az acil-amino-csoporthoz képest *o,o'*-helyzetben elhelyezkedő metilcsoportok nem engedik a gyűrű síkjában elhelyezkedni az acil-amino-csoportot. Így ennek hatása gyakorlatilag megszűnik: a lidokain spektruma igen hasonlít a *m*-xilolhoz. Amint az a 240 és 280 nm közötti spektrumszakasz kinagyítását tartalmazó



3/27. ábra. Szterikus gátlás hatása anilinszármazékok spektrumaira.
a) Acetanilid; *b)* lidokain; *c)* fentanil-citrát

3/27*B* ábrán látható, ez a hasonlóság még a finomszerkezet megjelenését is jelenti. Hasonló jelenséggel találkozunk az analóg szerkezetű mepivacain esetében is: $\lambda_{max} = 263$ nm, $\varepsilon = 420$. A 3/27*B* ábrán egy további spektrumot is bemutatunk: fentanil spektrumának hosszúhullámú részét. A finomszerkezettel rendelkező, kis intenzitású sáv ez esetben az izolált fenilcsoport, valamint a propionil-anilid egység α-sávjainak összeolvadásából adódik. Ez esetben az anilin rész aromás gyűrűje nem tartalmaz szterikus gátlást előidéző szubsztituenseket; a korábban említett három szerkezeti elem koplanáris beállását itt a nitrogénen elhelyezkedő nagy térkitöltésű csoport gátolja.



mepivacain

Teljesen hasonló elvek alapján értelmezhetjük az aromás gyűrű és karbonilcsoport, ill. aromás gyűrű és szén—szén kettős kötés közötti konjugáció kialakulását akadályozó térgátlást is. Ez utóbbi hatásra a 3.8. fejezetben már bemutattuk az amitriptilin, a dietil-sztilbösztrol és a dienösztrol példáit.

3.17. A pH hatása a spektrumokra

3.17.1. Általános irányelvek

A hidrogénion-koncentráció változtatására olyan anyagok spektruma szenved eltolódást, amelyek a pH-változás hatására reverzíbilisen protont adnak le vagy vesznek fel, vagyis a savas, ill. bázikus jellegű anyagok. Jelentős spektrumváltozás csak akkor következik be, ha a protonálódás, ill. deprotonálódás során érintett savas, ill. bázikus csoport *n*- és/vagy π-elektronjai részét képezik a molekula konjugált elektronrendszerének. Izolált karboxil-, ill. aminocsoportok 220 nm alatt megjelenő, kevéssé intenzív és jellegzetes sávjának pH-változás hatására bekövetkező eltolódása nem különösebben jellegzetes. Ezzel szemben a lúgosítás, ill. savanyítás hatására bekövetkező sóképzés mélyreható változásokat idéz elő pl. benzoesav, ill. anilin spektrumaiban ugyanakkor, amikor a fentiekkel összhangban az analóg szerkezetű, de a savas, ill. bázikus csoportokat izoláltan tartalmazó fenil-ecetsav és benzil-amin spektrumváltozása hasonló körülmények között csekély. Hasonlóképpen értelmezhető az a tény, hogy a morfin és kodein spektrumai alig változnak savanyítás hatására, hiszen a protonálódó tercier aminocsoport izolálva van mind az aromás gyűrűtől, mind a kettős kötéstől. Ugyanakkor a morfin fenolos hidroxilcsoportjának lúgos közegben végbemenő disszociációja jelentősen módosítja a spektrumot. Kodein esetében, ahol a fenolos hidroxil éterkötésben van, ez a változás természetesen elmarad.

Savak és bázisok protonált és deprotonált formáinak egy adott pH-hoz tartozó aránya vagy a protonálódás, ill. deprotonálódás adott szintjéhez szükséges pH kiszámítható a K_s értékéből a (3/3) vagy annak logaritmizált formájából a (3/4) egyenlet segítségével.

$$K_s = \frac{[H^+][D]}{[P]}, \tag{3/3}$$

ahol K_s a sav, ill. a protonált bázis disszociációs állandója, $[D]$ és $[P]$ pedig a külön-külön spektrummal rendelkező deprotonált, ill. protonált alak koncentrációi. Innen

$$pK_s = pH - \log \frac{[D]}{[P]}. \tag{3/4}$$

Például egy tipikusnak tekinthető, 5-ös pK-val rendelkező karbonsav esetében pH 5-nél $[D]/[P] = 1$, tehát az anyag 50%-a fogja a protonált, 50%-a pedig a deprotonált alaknak megfelelő spektrumot mutatni, pH 4-nél közel 10%-kal, 3-nál 1%-kal, 2-nél pedig 0,1%-kal lesz képviselve a spektrumban a deprotonált alak. Ez utóbbi pH-nál

tehát már gyakorlatilag teljesen a protonált forma spektrumát kapjuk; további pH-csökkentésre már nem változik a spektrum. Ha a pH-t emeljük, 6-nál kb. 90%, 7-nél 99%, 8-nál pedig 99,9% lesz a deprotonált alak relatív mennyisége; további lúgosításra a spektrum már nem változik.

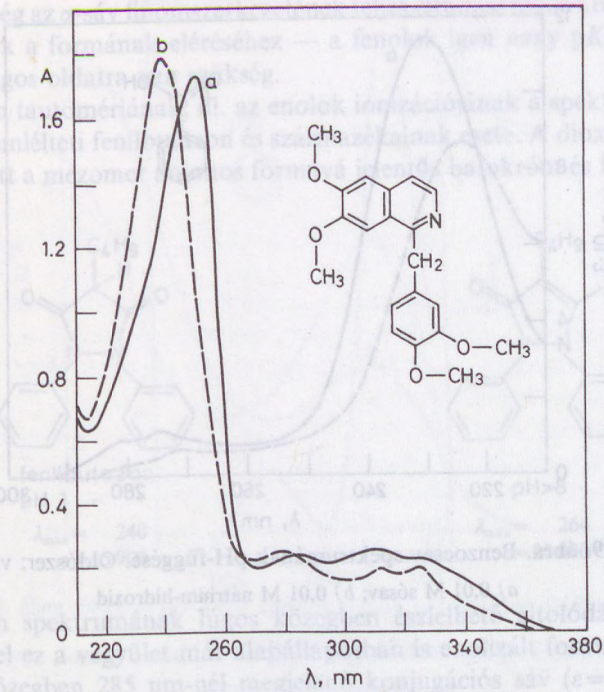
Kivéve azt az esetet, amikor egyensúlyi vizsgálatokat akarunk végezni spektrofotometriás mérések segítségével, általában arra kell törekedni, hogy a spektrofotometriásan mért sav, ill. bázis a mérés során vagy teljesen protonált vagy pedig deprotonált alakban legyen jelen. Az esetek többségében ez azt jelenti, hogy célszerű 0,01 mólos sósav- vagy nátrium-hidroxid-oldatban dolgozni. pH 2-nél ui. a fentiek szerint a középerős és gyenge savak teljesen disszociálatlan, az erős és középerős bázisok pedig protonált állapotban vannak jelen, míg pH 12-nél a középerős és gyenge bázisok teljesen deprotonált, a középerős és erős savak pedig ugyancsak teljesen disszociált alakban találhatók. Az igen gyenge savak (pl. fenolok) teljes disszociációjához nagyobb lúgkoncentráció, néhány igen gyenge bázis teljes protonálásához pedig nagyobb savkoncentráció szükséges.

Amennyiben valamely okból pH 2 és 12 között vesszük fel egy pH-változásra érzékeny anyag spektrumát, akkor a mérés reprodukálhatósága céljából a mérést valamely spektrofotometriásan inaktív tompító oldatban kell végrehajtani. Ilyen anyagok vizsgálata esetén helytelen a tiszta vizes oldat spektrumának felvétele. Ilyen esetben ui. egyrészről nem kellőképpen jól definiált az oldat pH-ja, másrészről pedig — mivel a disszociáció foka pufferolatlan oldatban a hígítással nő — az oldat spektruma is függhet a hígítástól. Ez eltérést okozhat a Lambert—Beer-törvénytől (lásd 4.2. fejezet).

A leírtak illusztrálására a 3/28. ábrán bemutatjuk papaverin-hidroklorid spektrumait vizes közegben kétféle, különböző módon előkészített víz felhasználásával. Papaverin pK-értéke 5,93. A 3/4. egyenlet szerint tehát a protonált és deprotonált forma ($\lambda_{max} = 251$, ill. 237 nm) pH 6 körül van jelen 50-50%-os arányban. Az ábrán látható, hogy nagy tisztaságú desztillált vízben nem következik be a papaverin-hidroklorid számottevő mértékű hidrolízise, üvegedényben tárolt ioncserélt víz felhasználása esetén azonban már túlnyomóan a szabad bázisra jellemző spektrumhoz jutunk.

Ha valamely oknál fogva nehézségei lennének az erősen savas, ill. bázikus oldatban vagy tompító oldatban való mérésnek, még egy lehetőséget is számításba vehetünk. Reverzíbilis sav-bázis egyensúlyon alapuló spektrumsorozat esetén ui. létezik legalább egy olyan hullámhossz, ahol valamennyi spektrum metszi egymást (izoszbesztikus vagy izobesztikus pont), lásd a 3/34. ábrát. Ezen a hullámhosszon az abszorbancia független a pH-tól, itt pufferolatlan oldatban is megbízhatóan tudjuk mérni az abszorbanciát. Mivel azonban az izoszbesztikus pont általában a maximumtól távol helyezkedik el, az ezen a hullámhosszon való mérés érzékenysége csökken.

A spektrum pH-függésének tanulmányozása mindenképpen igen hasznos az analitikus számára. A változás jellegéből és mértékéből fontos szerkezeti következtetéseket vonhatunk le, a kvantitatív analízis érzékenységét, ill. szelektivitását is növelhetjük, ha a mérést olyan pH-n végezzük el, ahol a fényelnyelés maximális, ill. kevésbé van kitéve zavaró hatásoknak.



3/28. ábra. Papaverin-hidroklorid spektrumai.

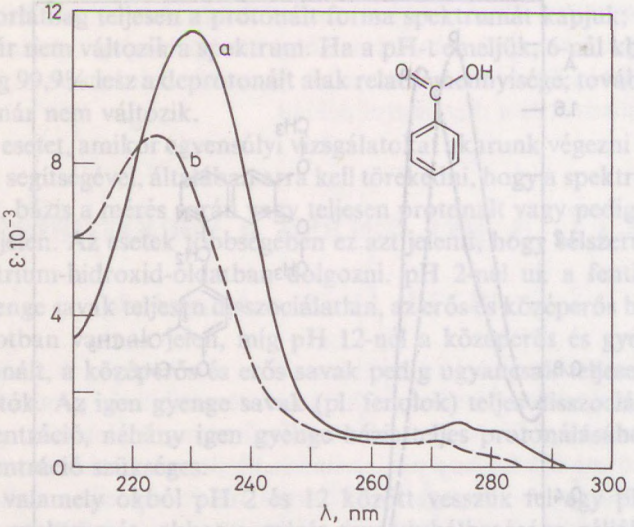
a) Oldószer: kvarckészülékben desztillált és kvarcedényben tárolt víz. $c = 1{,}208$ mg/100 ml. *b)* Oldószer: üvegedényben tárolt ioncserélt víz. $c = 1{,}2528$ mg/100 ml

3.17.2. Savjellegű vegyületek spektrumának pH-függése

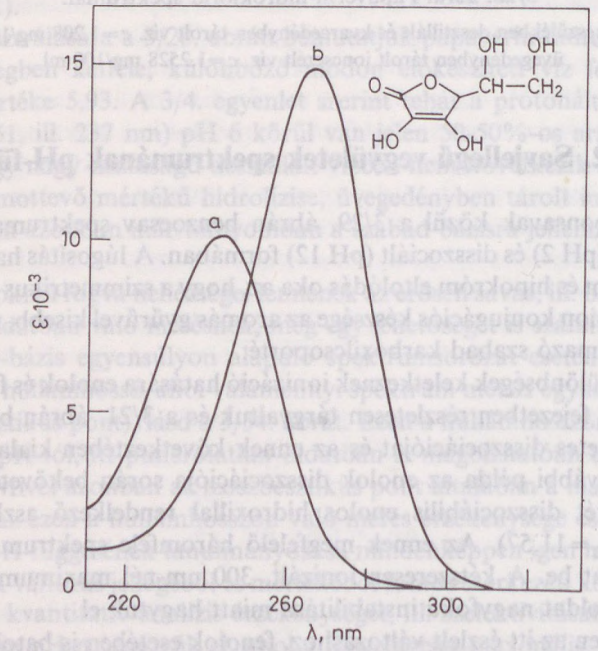
Aromás karbonsavak közül a 3/29. ábrán benzoesav spektrumait mutatjuk be disszociálatlan (pH 2) és disszociált (pH 12) formában. A lúgosítás hatására bekövetkező hipszokróm és hipokróm eltolódás oka az, hogy a szimmetrikus elektroneloszlású karboxilát anion konjugációs készsége az aromás gyűrűvel kisebb, mint a karbonilcsoportot tartalmazó szabad karboxilcsoporté.

Jelentősebb különbségek keletkeznek ionizáció hatására enolok és fenolok spektrumában. A 3.12. fejezetben részletesen tárgyaltuk és a 3/21. ábrán be is mutattuk a barbitál lépcsőzetes disszociációját és az ennek következtében kialakuló háromféle spektrumot. További példa az enolok disszociációja során bekövetkező spektrumeltolódásra a két disszociábilis enolos hidroxillal rendelkező aszkorbinsav esete ($pK_1 = 4{,}17$; $pK_2 = 11{,}57$). Az ennek megfelelő háromféle spektrum közül kettőt a 3/30. ábra mutat be. A kétszeresen ionizált, 300 nm-nél maximummal rendelkező formát a lúgos oldat nagyfokú instabilitása miatt hagytuk el.

Hasonlóképpen az itt észlelt változáshoz, fenolok esetében is batokróm eltolódást észlelhetünk lúgosítás hatására. Amint az a 3/9. ábrán etinil-ösztradiol példáján látható, a batokróm eltolódáshoz itt még hiperkróm eltolódás is hozzájárul. Figye-



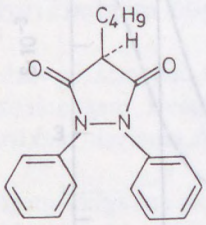
3/29. ábra. Benzoesav spektrumának pH-függése. Oldószer: víz.
a) 0,01 M sósav; *b)* 0,01 M nátrium-hidroxid



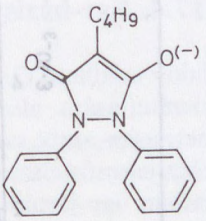
3/30. ábra. Aszkorbinsav spektrumának pH-függése. Oldószer: víz.
a) 0,01 M sósav; *b)* pH 8-as foszfátpuffer

lemre méltó még az α-sáv finomszerkezetének teljes eltűnése lúgos közegben, valamint az, hogy ennek a formának eléréséhez — a fenolok igen nagy pK_a-értéke miatt — igen erősen lúgos oldatra van szükség.

Az enol-oxo tautomériának, ill. az enolok ionizációjának a spektrumra gyakorolt hatását jól szemlélteti fenilbutazon és származékainak esete. A dioxo forma átalakulása pH 8 felett a mezomer anionos formává jelentős batokróm és hiperkróm eltolódással jár.



fenilbutazon
pH 1
$\lambda_{max} = 240$
$\varepsilon = 15\,900$



pH>8
$\lambda_{max} = 264$
$\varepsilon = 20\,400$

Oximetolon spektrumának lúgos közegben észlelhető eltolódása azért érdemel említést, mivel ez a vegyület már alapállapotban is enolizált formában van jelen. A metanolos közegben 285 nm-nél megjelenő konjugációs sáv ($\varepsilon = 8130$) a hidroxil-szubsztitúció miatt jelenik meg magasabb hullámhossznál az α, β-telítetlen szteroid ketonokéhoz képest. 0,1 n nátrium-hidroxidban az ionizáció következtében a sáv 315 nm-re tolódik el ($\varepsilon = 18\,060$).

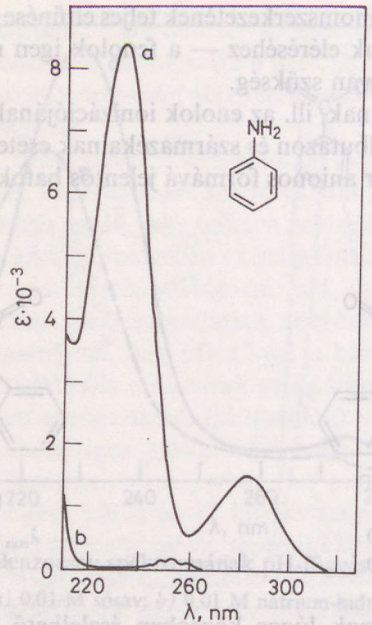
Iminocsoport deprotonálódása következtében igen változatos spektrumeltolódások következhetnek be. Szabad iminocsoportot tartalmazó xantinszármazékok (teobromin, teofillin) spektrumai lúgos közegben csak igen csekély batokróm eltolódást szenvednek. Igen erős batokróm és hiperkróm eltolódás következik be pl. a 2-metil-5-nitro-imidazol esetében, amelynek semleges közegben 311 nm-nél van maximuma ($\varepsilon = 6780$), s ez lúgos közegben (pH 12 felett) 366 nm-ig tolódik ($\varepsilon = 12\,300$).

A másik végletet szulfonamidok jelentik, amelyek —SO_2—NH—R csoportja savas karakterű, a sóképzés során azonban — az aromás karbonsavakhoz hasonlóan — hipszokróm eltolódás következik be.

3.17.3. Bázisjellegű anyagok spektrumának pH-függése

Spektrumaik pH-függése alapján a nitrogén-bázisok két csoportra oszthatók:
— a nitrogén nemkötő elektronpárja konjugációs kölcsönhatásban van a molekula π-elektronrendszerével (általában aromás gyűrű),
— nitrogéntartalmú aromás heterociklusok, ahol a nitrogén nemkötő elektronpárja nem képezi részét az aromás szextettnek.

Az első csoport legjellegzetesebb képviselője az anilin. Amint azt a 3.7. fejezetben már röviden ismertettük, és amint az a 3/31. ábrán látható, anilin spektrumában a

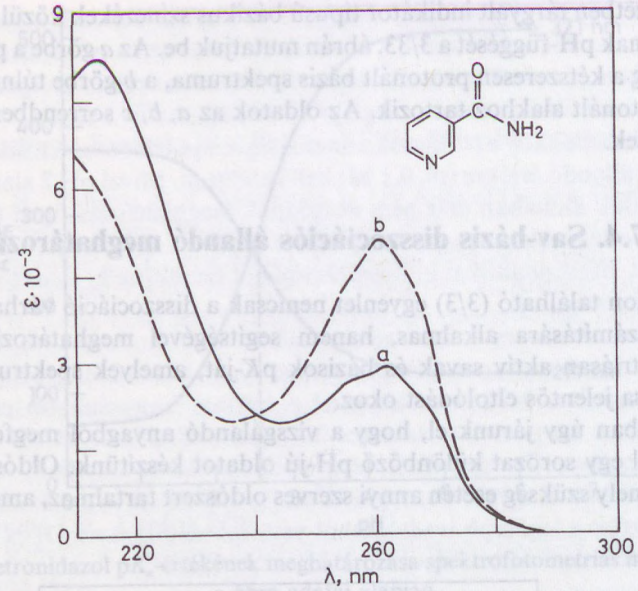


3/31. ábra. Anilin spektrumának pH-függése. Oldószer: etanol — víz 9 : 1.
a) Semleges; *b)* 0,1 M sósav

benzol spektrumához képest mind a *p*-, mind pedig az α-sáv jelentős batokróm eltolódást szenved; az utóbbinak intenzitása is jelentősen megnő. Ezeknek a hatásoknak alapját a nitrogén nemkötő elektronpárjának az aromás gyűrűre gyakorolt hatása képezi. Amint az a 3/31. ábrán ugyancsak látható, a gyenge bázis anilin protonálásához szükséges erősen savas közegben, ahol a sóképzés következtében ez a hatás megszűnik, erőteljes hipszokróm és hipokróm eltolódás következik be. A savas közegben felvett spektrum α-sávjának intenzitása, sőt az újra megjelenő finomszerkezete is teljesen benzolszerű.

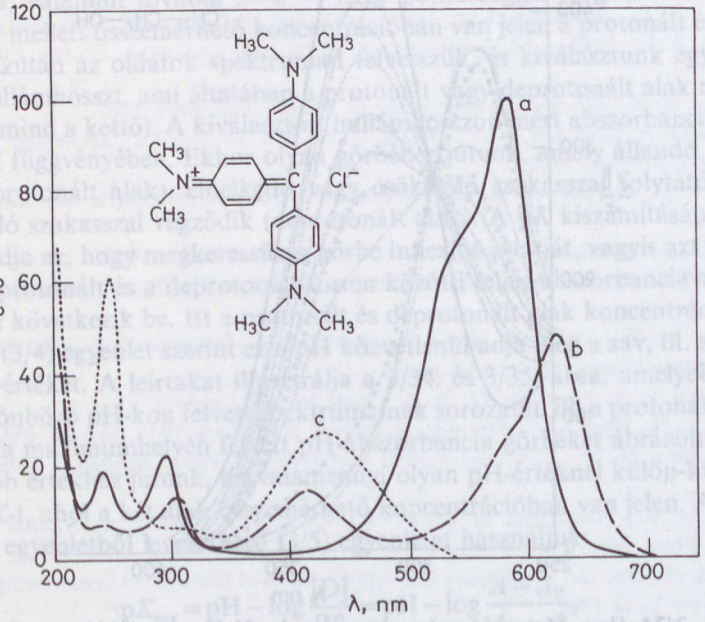
Korántsem fektethetők le ilyen általánosan érvényes szabályok nitrogéntartalmú aromás heterociklusok protonálódásának a spektrumra gyakorolt hatására vonatkozóan. A gyűrű és a szubsztituens jellegétől függően találkozunk batokróm és hipszokróm eltolódással, de igen tipikusnak tekinthető az az eset, amikor az α-sáv helyzete változatlan marad, intenzitása azonban megnő a sóképzés hatására. Ez utóbbi változás figyelhető meg piridin esetében, amelynek vizes közegben 257 nm-nél 3050-es moláris abszorpciós koefficienssel megjelenő sávjának intenzitása sóképzés hatására gyakorlatilag változatlan helyen (256 nm) 5300-ra nő. Hasonlóan viselkedik a piridin gyógyszerszármazékai közül a 3/32. ábrán bemutatott nikotinsavamid is.

Az említett hipszokróm eltolódásra példa a 3/34. ábrán bemutatott spektrumsorozat: az imidazolvázas metronidazol spektrumának változása savanyítás hatására, a batokróm eltolódásra pedig a 8.1. fejezet 8/1. ábráján ábrázolt eset: jód-klór-oxi-kinolin spektrumának változása.



3/32. ábra. Nikotinsav-amid spektrumának pH-függése. Oldószer: víz.

a) Semleges; *b)* 0,1 M sósav



3/33. ábra. Kristályibolya spektrumának pH-függése. Oldószer: víz.

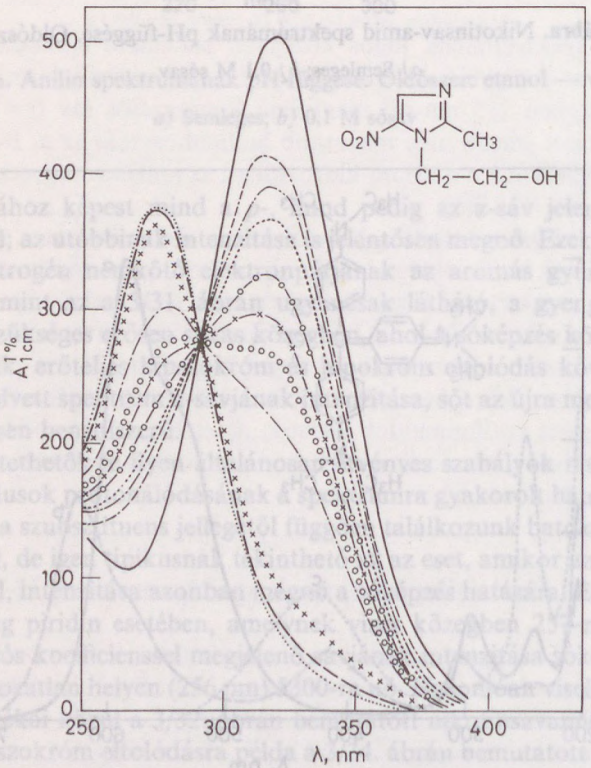
a) Semleges; *b)* 0,1 M sósav; *c)* 3 M sósav

A 3.14. fejezetben tárgyalt indikátor típusú bázikus színezékek közül a kristályibolya spektrumának pH-függését a 3/33. ábrán mutatjuk be. Az *a* görbe a protonálatlan, a *c* görbe pedig a kétszeresen protonált bázis spektruma, a *b* görbe túlnyomó részben az egyszer protonált alakhoz tartozik. Az oldatok az *a*, *b*, *c* sorrendben ibolya, kék, ill. sárga színűek.

3.17.4. Sav-bázis disszociációs állandó meghatározása

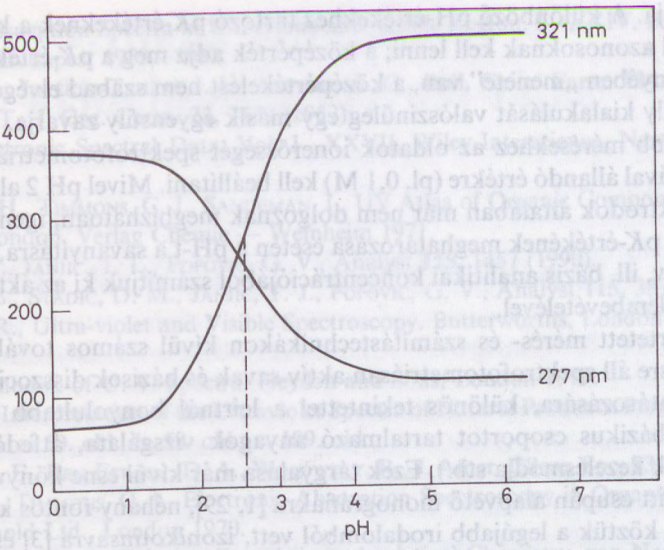
A 115. oldalon található (3/3) egyenlet nemcsak a disszociáció várható pH-tartományának kiszámítására alkalmas, hanem segítségével meghatározhatjuk olyan spektrofotometriásan aktív savak és bázisok p*K*-ját, amelyek spektrumában a pH megváltoztatása jelentős eltolódást okoz.

A gyakorlatban úgy járunk el, hogy a vizsgálandó anyagból megfelelő pufferek alkalmazásával egy sorozat különböző pH-jú oldatot készítünk. Oldószerként vizet használunk, amely szükség esetén annyi szerves oldószert tartalmaz, amennyi feltétle-



3/34. ábra. Metronidazol spektrumának pH-függése. Oldószer: víz.

325 nm-nél felülről lefelé: semleges; pH 3,171; pH 3,037; pH 2,878; pH 2,745; pH 2,596; pH 2,457; pH 2,271; 0,03 M sósav; 0,1 M sósav; 1 M sósav



3/35. ábra. Metronidazol pK_a-értékének meghatározása spektrofotometriás módszerrel a 3/34. ábra adatai alapján

nül szükséges a vizsgált anyag oldatban tartásához. A pH-értékeket úgy választjuk meg, hogy képviselve legyen az anyag teljes protonálódását, ill. deprotonálódását biztosító pH, valamint további 6—8 — nagy pontossággal meghatározott — pH-érték, amely mellett összemérhető koncentrációban van jelen a protonált és deprotonált alak. Ezután az oldatok spektrumait felvesszük, és kiválasztunk egy vagy két alkalmas hullámhosszt, ami általában a protonált vagy deprotonált alak maximumhelye (vagy mind a kettő). A kiválasztott hullámhosszon mért abszorbanciákat ábrázoljuk a pH függvényében. Ekkor olyan görbéhez jutunk, amely állandó szakasszal kezdődik (protonált alak), emelkedő vagy csökkenő szakasszal folytatódik, majd ismét állandó szakasszal végződik (deprotonált alak). A pK kiszámításának legegyszerűbb módja az, hogy megkeressük a görbe inflexiós pontját, vagyis azt a pH-értéket, ahol a protonált és a deprotonált forma közötti teljes abszorbanciaváltozásnak éppen a fele következik be. Itt a protonált és deprotonált alak koncentrációi azonosak, s így a (3/4) egyenlet szerint ez a pH közvetlenül adja meg a sav, ill. a protonált bázis pK_{sav}-értékét. A leírtakat illusztrálja a 3/34. és 3/35. ábra, amelyeken metronidazol különböző pH-kon felvett spektrumainak sorozatát, ill. a protonált és deprotonált forma maximumhelyén felvett pH-abszorbancia görbéket ábrázoltuk.

Pontosabb értékhez jutunk, ha valamennyi olyan pH-értéknél külön-külön kiszámítjuk a pK-t, ahol a két alak összemérhető koncentrációban van jelen. A számításhoz a (3/3) egyenletből levezethető (3/5) egyenletet használjuk:

$$pK_{sav} = pH - \log \frac{[D]}{[P]} = pH - \log \frac{A - A_P}{A_D - A}, \qquad (3/5)$$

ahol [D] és [P] a deprotonált, ill. protonált alakok koncentrációi, A az adott pH-nál mért abszorbancia, A_P és A_D pedig a teljesen protonált, ill. deprotonált alak ab-

szorbanciája. A különböző pH-értékekhez tartozó p*K*-értékeknek a kísérleti hibahatáron belül azonosoknak kell lenni; a középérték adja meg a p*K*-értéket. Ha ennek a pH függvényében „menete" van, a középértékelést nem szabad elvégezni: ez esetben az egyensúly kialakulását valószínűleg egy másik egyensúly zavarja.

Igényesebb mérésekhez az oldatok ionerősségét spektrofotometriásan inaktív só hozzáadásával állandó értékre (pl. 0,1 M) kell beállítani. Mivel pH 2 alatt, ill. 12 felett az üvegelektródok általában már nem dolgoznak megbízhatóan, igen gyenge savak, ill. bázisok p*K*-értékének meghatározása esetén a pH-t a savanyításra, ill. lúgosításra használt sav, ill. bázis analitikai koncentrációjából számítjuk ki az aktivitási koefficiensek figyelembevételével.

Az ismertetett mérés- és számítástechnikákon kívül számos további módszer is rendelkezésre áll spektrofotometriásan aktív savak és bázisok disszociációs állandóinak meghatározására, különös tekintettel a leírtnál bonyolultabb esetekre (több savas, ill. bázikus csoportot tartalmazó anyagok vizsgálata, átfedő disszociációs egyensúlyok kezelésmódja stb.). Ezek tárgyalása már kívül esne könyvünk célkitűzésein. Ezért itt csupán alapvető monográfiákra [1, 29], néhány fontos közleményre [2, 18, 23, 37], köztük a legújabb irodalomból vett, izonikotinsavra [3] és flurazepamra [22] vonatkozókra utalunk.

Irodalom

1. Albert, A., Serjeant, E. P., The Determination of Ionization Constants. Chapman and Hall, London 1971.
2. Asuero, A. G., Jiménez-Trillo, J. L., Navas M. J., Talanta **33,** 531 (1986).
3. Asuero, A. G., Navas, M. J., Herrador, M. A., Recamales, A. F., Int. J. Pharm. **34,** 81 (1986).
4. Bauman, R. P., Absorption Spectroscopy. Wiley, New York 1962.
5. Beaven, G. H., Johnson, E. A., Willis, H. A., Miller, R. G. J., Molecular Spectroscopy. Heywood, London 1961.
6. Blass, W. E., Halsey, G. W., Deconvolution of absorption spectra. Academic Press, New York 1981.
7. Clar, E., Aromatische Kohlenwasserstoffe. Springer, Berlin 1952.
8. Clarke, E. G. C., Isolation and Identification of Drugs. The Pharmaceutical Press, London 1975.
9. Dibbern, H.-W., UV- und IR-Spektren wichtiger pharmazeutischer Wirkstoffe. I—III. kötet, Editio Cantor, Aulendorf 1980.
10. Ellington, P. S., Meakins, G. D., J. Chem. Soc. 697 (1960).
11. Fieser, L. F., Fieser, M., Steroids. Reinhold, New York 1959, 15—24. old.
12. Hershenson, H. M., U.V. and Visible Absorption Spectra. Academic Press, New York 1961.
13. Hirayama, K., Handbook of Ultraviolet Absorption Spectra of Organic Compounds. Plenum Press, New York 1967.
14. Jaffé, H. H., Orchin, M., Theory and Applications of Ultraviolet Spectroscopy. Wiley and Sons, New York 1962.
15. Krácmar, J., Krácmarová, J., Cesk Fram. **15,** 16 (1966).
16. Krácmar, J., Krácmarová, J., Bokoviková, T. N., Ciciro, V. E., Nesterová, G. A., Suranová, A. V., Trius, N. V., Pharmazie **46,** 253 (1991).

17. Láng, L., Absorption Spectra in Ultraviolet and Visible Region, I—XXIV. kötet, Akadémiai Kiadó, Budapest 1959—1982.
18. Navas, M. J., Jiménez-Trillo, J. L., Asuero, A. G., Boll. Chim. Farm. **124,** 439 (1985).
19. Nielsen, A. T., J. Org. Chem. **22,** 1539 (1957).
20. Organic Electronic Spectral Data, Vol. I—XXVII, Wiley-Interscience, New York 1960—1991.
21. Perkampus, H., Timmons, C. J., Sandeman, I., UV Atlas of Organic Compounds. Butterworths — London, Verlag Chemie — Weinheim 1971.
22. Pfendt, L. J., Janjic, T. L., Popovic, G. V., Analyst **115,** 1457 (1990).
23. Pfendt, L. B., Stadic, D. M., Janjic, T. J., Popovic, G. V., Analyst **115,** 383 (1990).
24. Rao, C. N. R., Ultra-violet and Visible Spectroscopy. Butterworths, London 1975. a. 60. old.
25. Sadtler Handbook of U. V. Spectra. Heyden and Sons, London 1979.
26. Scott, A. I., Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products. Pergamon Press, Oxford 1964. a. 50. old.; b. 58. old.; c. 109. old.
27. Sondheimer, F., Ben-Efraim, D. A., Wolowsky, R., J. Amer. Chem. Soc. **83,** 1675 (1961).
28. Stern, E. S., Timmons, C. J., Electronic Absorption Spectroscopy in Organic Chemistry. Edward Arnold Ltd., London 1970.
29. Sucha, L., Kotrly, S., Solution Equilibria in Analytical Chemistry. van Nostrand Reinhold, London 1972.
30. Sunshine, I., Handbook of Spectrophotometric Data of Drugs. CRC Press, Boca Raton 1981.
31. Suzuki, H., Electronic Absorption Spectra and Geometry of Organic Molecules. Academic Press, New York 1967.
32. Thamer, B. J., Voigt, A. F., J. Phys. Chem. **56,** 225 (1952).
33. Woodward, R. B., J. Amer. Chem. Soc. **64,** 72 (1942).

4. Kvantitatív analízis saját fényelnyelés alapján

4.1. Egykomponensű rendszerek analízise

4.1.1. Meghatározás a Lambert—Beer-törvény alapján

Ebben a fejezetben egy-, ill. többkomponensű rendszerek kvantitatív analízisével foglalkozunk, ezen belül ebben az alfejezetben egykomponensű rendszerekkel. Spektrofotometriás szempontból az olyan rendszereket tekintjük egykomponensűnek, ahol a mérésre kiválasztott hullámhosszon az anyag meghatározását sem jól definiált spektrummal rendelkező másik anyag, sem pedig definiálatlan, ún. „háttér" elnyelés nem zavarja. Ilyen esetekben a meghatározás a Lambert—Beer-törvény alapján (2/8 egyenlet, 26. old.) elvégezhető. A (2/8) egyenletből a koncentrációt kifejezve és a helyébe a fajlagos abszorpciós koefficienst behelyettesítve a következő egyenlethez jutunk:

$$\text{koncentráció (g/100 ml)} = \frac{\text{abszorbancia}}{A^{1\%}_{1\ \text{cm}} \cdot \text{rétegvastagság (cm)}}. \qquad (4/1)$$

Oldatok koncentrációjának meghatározásánál tipikusabb alkalmazási területe a spektrofotometriának a gyógyszeranalízisben szilárd anyagok (gyógyszeralapanyagok, intermedierek, kiszerelt készítmények stb.) hatóanyagtartalmának mérése. Ilyenkor a szilárd mintából oldás vagy extrakció útján törzsoldatot készítünk, ezt általában hígítjuk, és az így nyert oldat abszorbanciáját mérjük. A hatóanyagtartalmat a (4/2) egyenlettel számítjuk ki:

$$\text{hatóanyagtartalom (\%)} = \frac{\text{hígítás} \cdot \text{törzsoldat térfogata (ml)} \cdot \text{abszorbancia}}{A^{1\%}_{1\ \text{cm}} \cdot \text{bemérés (g)} \cdot \text{rétegvastagság (cm)}}. \qquad (4/2)$$

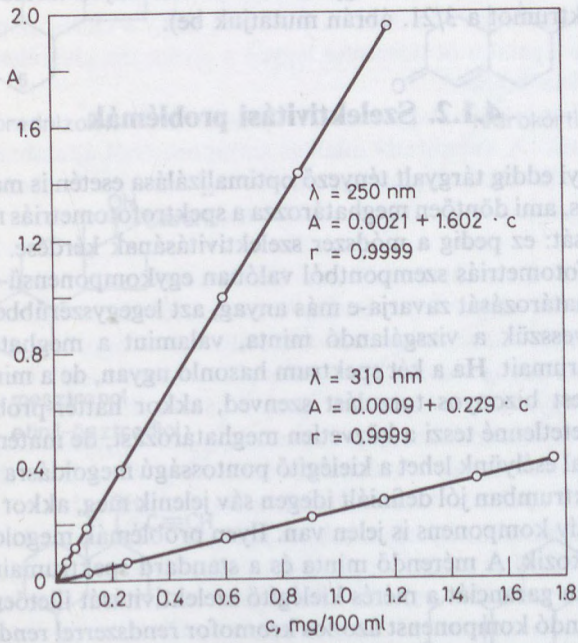
A (4/1), ill. (4/2) egyenlet alkalmazhatóságának feltételeivel, ill. a meghatározás optimalizálásával kapcsolatban számos kérdést kell tisztázni.

A mérési hullámhossz kiválasztásánál általában arra törekszünk, hogy a spektrum maximumhelyén végezzük el a mérést részben azért, mivel itt a legnagyobb az érzékenysége a módszernek, részben pedig azért, mivel a maximum helyén általában jobb a hullámhossz beállításának reprodukálhatósága, mint a spektrum fel-, ill. leszálló ágain (különösen ha ezek meredekek). További előnyt jelent az, hogy adott résszélesség mellett itt a legkisebb az abszorbanciaváltozás a spektrális sávszélességen belül. Több maximummal rendelkező spektrum esetében a mérési hullámhossz kiválasztásánál az érzékenységi szemponton túlmenően azt is figyelembe kell venni, hogy túlságosan alacsony hullámhosszon (220 nm alatt) számos zavaró hatással találkozhatunk (lásd 2.9. és 2.10. fejezet).

Az abszorbancia mérésével kapcsolatos problémákat és a mérés optimalizálását a 2.7—2.10. fejezetekben tárgyaltuk. Utalunk még az oldószer helyes megválasztásának (2.11. és 3.2. fejezet), valamint a pH megfelelő beállításának (3.17. fejezet) jelentőségére is.

A fajlagos abszorpciós koefficienssel kapcsolatban a következőket célszerű figyelembe venni. Irodalmi értéket csak akkor szabad felhasználni, ha biztosítani tudjuk a leírttal azonos kísérleti körülményeket (oldószer, pH stb.). Mivel azonban a szakirodalomban igen sok megbízhatatlan adat található, ezek felhasználásával igen nagyfokú óvatosságra van szükség; csak olyan esetben használjuk ezt a lehetőséget nem túlságosan nagy pontosságigényű mérésekre, ha semmi esetre sem áll megfelelő tisztaságú standard minta a rendelkezésünkre. A megnyugtató megoldást mindenképpen nagy tisztaságú standard alkalmazása jelenti. Ebből a gondosan megszárított és kromatográfiásan ellenőrzött tisztaságú anyagból elkészített oldat segítségével meghatározzuk a fajlagos abszorbanciát azzal a készülékkel, amellyel a méréseket végre akarjuk hajtani. Gondot kell fordítani arra, hogy a mérések során az abszorbancia meghatározásának paraméterei ugyanazok legyenek, mint a fajlagos abszorbancia mérésekor (rétegvastagság, résszélesség stb.). A fajlagos abszorbanciát időről időre ellenőrizni kell, sőt teljesen megnyugtató megoldásnak csak az tekinthető, ha azt minden mérési sorozattal együtt meghatározzuk, vagyis a méréssorozatot standard mellett végezzük el.

Igen fontos feladat a Beer-törvény alkalmazhatóságának, vagyis a koncentráció—abszorbancia összefüggés linearitásának ellenőrzése a vizsgálandó rendszerre vonat-



4/1. ábra. Kalibrációs egyenesek papaverin-hidroklorid meghatározásához. Oldószer: 0,01 M sósav. (A spektrumot lásd a 105. oldalon)

kozóan. Ezt úgy végezhetjük el, hogy a standardból készített törzsoldatból hígítási sorozatot készítünk, és ugyanazzal az összehasonlító oldattal szemben valamennyi oldat abszorbanciáját meghatározzuk a kiválasztott hullámhosszon. A mért abszorbanciákat ábrázoljuk a koncentráció függvényében. Megfelelő színvonalú és megfelelően karbantartott készülékkel a gyógyszervegyületek döntő többségénél az origóba futó egyeneshez jutunk. Saját fényelnyelésre alapuló mérés esetén akár pozitív, akár negatív tengelymetszet feltétlenül kísérleti hibára vezethető vissza (nem megfelelő összehasonlító oldat alkalmazása). Valamivel problematikusabb a helyzet a kémiai reakciókra alapozott módszerek esetében; ezzel a kérdéssel a 6.3. fejezetben külön foglalkozunk. Ugyancsak külön fejezet (a következő 4.2.-es) tárgyalja a lineáristól való esetleges eltérés különböző okait. Mivel az ott tárgyalt eltérések nagyobbik része csupán a nagyobb abszorbanciatartományban jelentkezik, és mivel nagyobb pontosságigényű kvantitatív méréseknél célszerű a 0,2—1 abszorbanciatartományban dolgozni, a kalibrációs egyenest általában csak erre a tartományra mérik ki és adják meg. Újabban a szakirodalomban nem magát az egyenest és a mérési pontokat, hanem az utóbbiakból a legkisebb hibanégyzetek összege módszerével kiszámított ($A = a+bc$) regressziós egyenes egyenletét adják meg. Amennyiben a koncentrációt g/100 ml-ben adjuk meg, ennek az egyenletnek az a és b regressziós együtthatói a tengelymetszetet és a fajlagos abszorpciós koefficienst határozzák meg, az általában ugyancsak megadott korrelációs koefficiens pedig (jó spektrofotometriás módszerek esetén $r > 0{,}999$) az egyes mérési pontoknak a regressziós egyenestől való eltérését jellemzi.

Példaként a 4/1. ábrán bemutatjuk a papaverin-hidroklorid spektrumának két maximumhelyén felvett kalibrációs egyeneseket és a hozzájuk tartozó két regressziós egyenletet (a spektrumot a 3/21. ábrán mutatjuk be).

4.1.2. Szelektivitási problémák

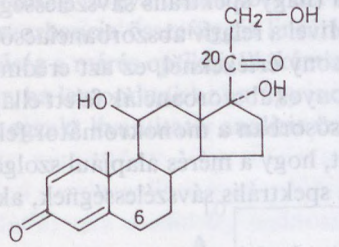
Még valamennyi eddig tárgyalt tényező optimalizálása esetén is marad egy alapvetően fontos kérdés, ami döntően meghatározza a spektrofotometriás módszerrel nyert eredmény realitását: ez pedig a módszer szelektivitásának kérdése. Hogy a vizsgált rendszer spektrofotometriás szempontból valóban egykomponensű-e, vagyis a mért komponens meghatározását zavarja-e más anyag, azt legegyszerűbben úgy ellenőrizhetjük, hogy felvesszük a vizsgálandó minta, valamint a meghatározandó tiszta komponens spektrumait. Ha a két spektrum hasonló ugyan, de a minta spektruma a standardhoz képest bizonyos torzulást szenved, akkor háttér-problémával állunk szemben, ami lehetetlenné teszi a közvetlen meghatározást, de matematikai módszerek alkalmazásával esélyünk lehet a kielégítő pontosságú megoldásra (lásd 4.3. és 4.6. fejezet). Ha a spektrumban jól definiált idegen sáv jelenik meg, akkor másik, spektrofotometriásan aktív komponens is jelen van. Ilyen problémák megoldásával a 4.4. és 4.5. fejezet foglalkozik. A mérendő minta és a standard spektrumainak azonossága sem jelent azonban garanciát a mérés kielégítő szelektivitását illetően. Igen gyakran ui. a meghatározandó komponenst azonos kromofor rendszerrel rendelkező anyagok (szintézis kiindulási anyaga, ill. melléktermék, bomlástermék stb.) kísérhetik, amelyek spektruma azonos vagy legalábbis igen hasonló lehet a meghatározandó kompo-

nenséhez. A 4/1. ábrán bemutatott példával kapcsolatban pl. az a helyzet, hogy a papaverin bármelyik maximumán végezzük el a mérést, hozzámérjük az izokinolinvázat és a dimetoxi-fenil-gyűrűt összekötő metilénen hidroxi-csoportot tartalmazó papaverinol oxidációs terméket.

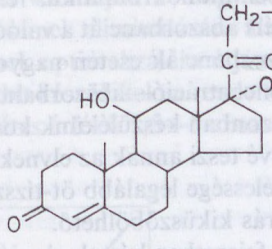
Prednizolon alapanyagnak a gyógyszerkönyvek által is előírt 242 nm-nél végzett spektrofotometriás mérése általában a reálisnál sokkal kedvezőbb képet mutat az anyag minőségéről. Ennek az az oka, hogy a fermentációs dehidrogénezéssel előállított termék legfontosabb szennyezései, a kiindulási anyag hidrokortizon, valamint a fermentáció melléktermékei: 6β-hidroxi és a 20β-hidroxi származékok ugyancsak a jellegzetes α, β-telítetlen keton spektrumot adják 242 nm körüli maximummal és igen hasonló moláris abszorpciós koefficienssel.

Hasonló a helyzet a fenol-éter típusú spektrummal rendelkező mesztranollal is (λ_{max} = 278 nm; $A^{1\%}_{1\,cm}$ = 60). Ennek a szintézisből eredő szennyezései, a szabad fenolos hidroxilcsoportot tartalmazó etinil-ösztradiol és az etinilcsoport helyett izolált ketoncsoportot tartalmazó ösztron-metiléter spektrális sajátságai ugyancsak nagyon közel állnak a mesztranolhoz.

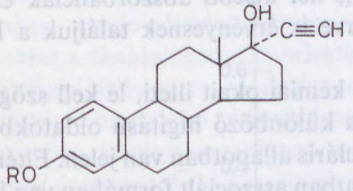
Kedvezőbb a helyzet egy harmadik szteroid, noretiszteron esetében, amelynek spektrumát a 4-én-3-keto csoport határozza meg (λ_{max} = 240 nm, $A^{1\%}_{1\,cm}$ = 570).



prednizolon

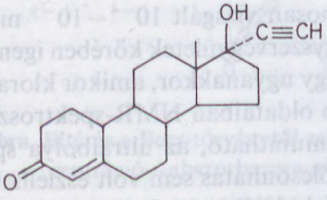


hidrokortizon

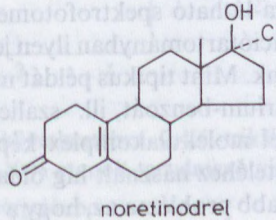


R = CH_3 mesztranol

H etinil-ösztradiol



noretiszteron



noretinodrel

Ennek főbb szennyezései közül ui. az aromás mesztranol alig, a konjugációt egyáltalán nem tartalmazó 4,5-dihidro-származék, valamint az izomer noretinodrel pedig egyáltalán nem zavarják a meghatározást.

Általánosságban megállapítható, hogy a közvetlen spektrofotometriás mérés szelektivitása esetenként mérlegelendő, az esetek nagy részében nem kielégítő. Javítása céljából vagy kémiai reakciók segítségével hozunk létre szelektív fényelnyelést (lásd 6. és 7. fejezetek), vagy előzetes kromatográfiás elválasztás segítségével tesszük teljesen szelektívvé a spektrofotometriás mérést (lásd 5. fejezet).

4.2. Eltérések a Lambert—Beer-törvénytől

Amint azt már az előző fejezetben említettük, bizonyos esetekben eltérések következhetnek be a Lambert—Beer-törvénytől. Ezek részben optikai, részben pedig kémiai okokra vezethetők vissza.

Az optikai okok közül először a nem megfelelően monokromatikus fény alkalmazásának problémáját említjük. Amint azt a 2.9. fejezetben részletesen tárgyaltuk, nem kellőképpen monokromatikus fény alkalmazása (nagy spektrális sávszélesség) csökkenti a mért abszorbanciát a valódihoz képest. Mivel a relatív abszorbanciacsökkenés nagy abszorbanciák esetén nagyobb, mint alacsony értékeknél, ez azt eredményezi, hogy a koncentráció—abszorbancia egyenes bizonyos abszorbanciák felett ellaposodhat. Ha azonban készülékünk konstrukciója (elsősorban a monokromátor felbontása) lehetővé teszi annak az elvnek érvényesülését, hogy a mérés alapjául szolgáló sáv félértékszélessége legalább öt-tízszerese legyen a spektrális sávszélességnek, akkor ez a hibaforrás kiküszöbölhető.

A 2.10. fejezetben leírtak alapján a szórt fény is oka lehet az abszorbancia lineáristól való eltérésének. A kvantitatív analízis szempontjából általában figyelembe vett 220 nm feletti hullámhossztartományban 1—1,5-nél kisebb abszorbanciák esetén azonban még egyszerű spektrofotométerrel mérve is érvényesnek találjuk a Beer-törvényt.

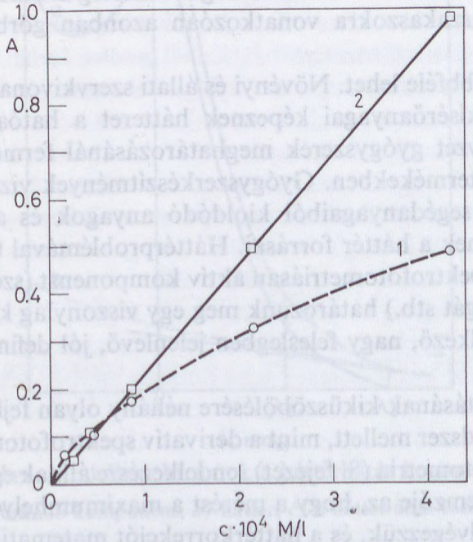
Ami a Lambert—Beer-törvénytől való eltérés kémiai okait illeti, le kell szögezni, hogy a törvény csak akkor lehet érvényes, ha a különböző hígítású oldatokban a vizsgált vegyület teljes mennyisége azonos molekuláris állapotban van jelen. Eltérések forrása lehet, ha az anyag viszonylag tömény oldatban asszociált formában van jelen, s az asszociációs egyensúly a hígítással egyre inkább a disszociáció irányába tolódik el, a monomer és az asszociátum spektrumai pedig nem egyeznek meg. Ilyen kölcsönhatások azonban elsősorban töményebb oldatokban fordulnak elő; a kvantitatív ultraibolya-látható spektrofotometriában általánosan vizsgált $10^{-4}-10^{-5}$ mol/dm^3 koncentrációtartományban ilyen jelenséggel gyógyszervegyületek körében igen ritkán találkozunk. Mint tipikus példát megemlítjük, hogy ugyanakkor, amikor kloramfenikol és nátrium-benzoát, ill. -szalicilát töményebb oldataiban NMR-spektroszkópiás módszerrel molekulakomplex képződése volt kimutatható, az ultraibolya spektrumok felvételéhez használt híg oldatban semmi kölcsönhatás sem volt észlelhető [64].

Fontosabb probléma az, hogy a disszociáció, ill. hidrolízis fokának a hígítással való

növekedése következtében spektrofotometriásan aktív szerves savak és bázisok, ill. sóik spektruma a hígítás során fokozatosan eltolódik a protonált és deprotonált forma között, s ez is a Lambert—Beer-törvénytől való eltéréshez vezethet. Mivel a gyenge és közeperős savak és bázisok disszociációfoka éppen a fenti koncentrációtartományban változik jelentős mértékben a koncentrációval, a kvantitatív méréshez olyan körülményeket kell teremteni, ami ezt a változást kiküszöböli. A 3.16. fejezetben leírtak alapján ez a feladat könnyen megoldható erősen savas vagy bázisos, esetleg pufferolt oldatban való méréssel.

A leírtakat 2,4,6-triklór-fenol ($pK_a = 6{,}00$) meghatározásával illusztráljuk. Ez elvégezhető 10% etanolt tartalmazó 0,01 M sósavban 286 nm-nél ($\varepsilon = 2210$) vagy 0,01 M nátrium-hidroxidban ($\varepsilon_{245\ nm} = 9260$; $\varepsilon_{312\ nm} = 4840$). Ha sav, ill. lúg hozzáadása nélkül végezzük el a mérést 10% etanolt tartalmazó vizes közegben a fenti hullámhosszok közül 245 nm-nél, akkor a 4/2. ábra *1.* görbéjén látható kalibrációs görbéhez jutunk. A Beer-törvény egyenesétől való eltérés oka az, hogy amíg a legelső mérési ponton a triklór-fenol disszociáció foka kb. 0,21, addig az a mért legmagasabb koncentráció esetében kb. 0,05-re csökken. A 4/2. ábra *2.* görbéjén látható, hogy ennek az oldatnak vizsgálata során is eljuthatunk lineáris kalibrációhoz, ha a disszociált és disszociálatlan forma izoabszorpciós pontján (293 nm-nél) mérünk.

Az eddig tárgyalt esetekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy koncentráció—abszorbancia összefüggés lineáristól való eltéréseinek eliminálására általában van lehetőség a mérés optikai, ill. kémiai paramétereinek optimalizálása útján, különösen akkor, ha lemondunk az amúgy is csak a legdrágább készülékeken rendelkezésre álló, de az egzakt kvantitatív analízis szempontjából kétes értékű 1,5—5 abszorbanciatar-



4/2. ábra. Eltérés a Beer-törvénytől savas disszociáció következtében. 2,4,6,-triklór-fenol koncentráció—abszorbancia görbéi. Oldószer: 10% etanolt tartalmazó víz.

1. 245 nm, *2.* 293 nm (izoabszorpciós pont)

tomány használatáról. Ezt azért tartjuk szükségesnek hangsúlyozni, mivel az analízist el lehet végezni nemlineáris kalibráció alapján is; a korszerű, mikrokomputerrel ellátott készülékek erre a célra rendelkeznek is megfelelő programokkal. Ha azonban erre mód van, ezt célszerű elkerülni, és a sokkal reprodukálhatóbb, megbízhatóbb lineáris kalibrációra alapozni a kvantitatív mérést.

4.3. Háttérkorrekciós módszerek

4.3.1. A spektrumháttér és korrekciójának jelentősége

Gyógyszerek spektrofotometriás analízise során igen gyakran fordul elő, hogy a meghatározandó komponens abszorbanciájának mérését idegen fényelnyelés zavarja meg, s így a meghatározás nem végezhető el közvetlenül az eddig megismert elvek alapján.

Ezt a zavaró hatást kifejtheti egy vagy több jól definiált, spektrofotometriásan aktív más komponens, amelyek spektruma többé-kevésbé átfedi a meghatározandó komponensét. Ilyen két vagy több komponensű rendszerek analízisével foglalkozik a következő, 4.4. fejezet. Ebben a fejezetben viszont azzal a nem kevésbé fontos esettel foglalkozunk, amikor a meghatározandó anyag spektruma jól felismerhető a vizsgált minta spektrumában, de több-kevesebb torzulást szenved, mivel a spektrum egy jellegtelen, strukturálatlan, ún. háttérspektrumra szuperponálódik. A háttérspektrumra az jellemző, hogy az a hosszú hullámok irányába leszálló spektrumág, amelynek rövidebb szakaszain az abszorbancia megközelítőleg lineáris függvénye a hullámhossznak, hosszabb szakaszokra vonatkozóan azonban görbülete van (általában konkáv).

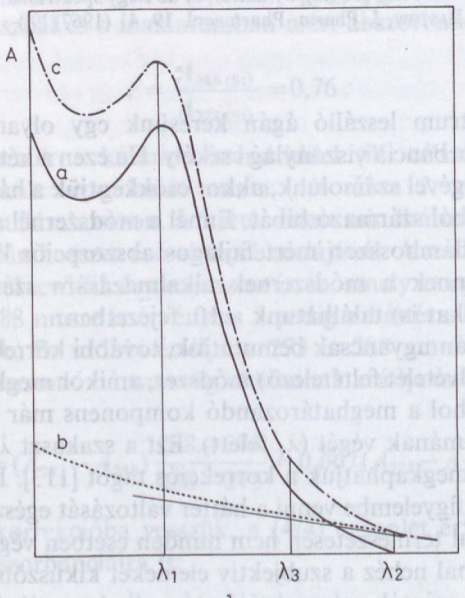
A háttér eredete többféle lehet. Növényi és állati szervkivonatok esetén a biológiai minta definiálatlan kísérőanyagai képeznek hátteret a hatóanyag spektrumához. Hasonló lehet a helyzet gyógyszerek meghatározásánál fermentlevekben, gyártási anyalúgokban, nyerstermékekben. Gyógyszerkészítmények vizsgálatánál a tablettavagy kenőcskészítés segédanyagaiból kioldódó anyagok és az injekciókészítésnél felhasznált olaj lehetnek a háttér forrásai. Háttérproblémával találkozunk akkor is, ha kis mennyiségű, spektrofotometriásan aktív komponenst (szennyezést, gyógyszerkészítmény hatóanyagát stb.) határozunk meg egy viszonylag kis intenzitású leszálló spektrumággal rendelkező, nagy feleslegben jelenlevő, jól definiált komponens mellett.

A háttér zavaró hatásának kiküszöbölésére néhány olyan fejlettebb és ezért külön tárgyalást igénylő módszer mellett, mint a derivatív spektrofotometria (4.6. fejezet) és a differenciaspektrofotometria (8. fejezet) rendelkezésre állnak egyszerűbb módszerek is, amelyek közös jellemzője az, hogy a mérést a maximumhelyen kívül még további hullámhosszakon is elvégezzük, és a háttérkorrekciót matematikai úton végezzük el. Előre kell bocsátani, hogy ezeknek a módszereknek a pontossága nem éri el a fejlettebb, különösen pedig a kromatográfiás elválasztással kombinált módszerekét, ezért ezeket a módszereket igényesebb feladatok megoldására csak akkor célszerű

használni, ha a korrigálandó háttér-abszorbancia a maximumhelyen nem haladja meg az abszorbancia 10—20%-át. Bizonyos esetekben (pl. biológiai minták kisebb pontosságigényű vizsgálatánál) ettől az elvtől gyakran eltérnek.

4.3.2. Az alapvonal módszer és más egyszerű algebrai-geometriai módszerek

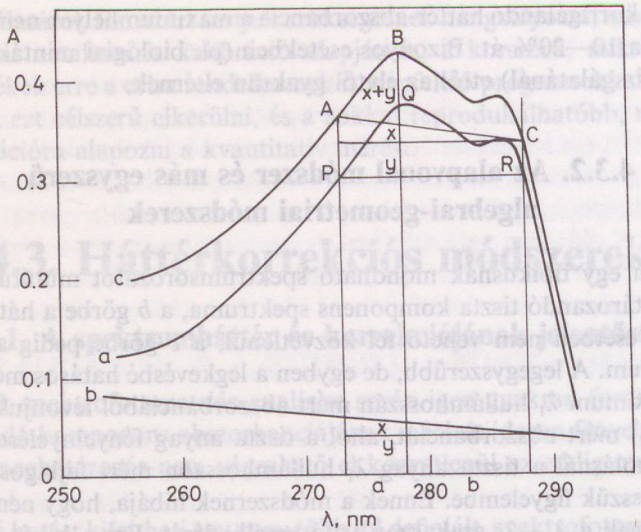
A 4/3. ábrán egy tipikusnak mondható spektrumsorozatot mutatunk be. Az *a* görbe a meghatározandó tiszta komponens spektruma, a *b* görbe a háttérspektrum, ami a legtöbb esetben nem vehető fel közvetlenül, a *c* görbe pedig a háttér által torzított spektrum. A legegyszerűbb, de egyben a legkevésbé hatásos módszer abban áll, hogy a maximum λ_1 hullámhosszán mért abszorbanciából levonjuk azon a hullámhosszon (λ_2) mért abszorbanciát, ahol a tiszta anyag fényelnyelése már zéróvá válik.* A számolásnál a tiszta anyag λ_1 hullámhosszon mért fajlagos abszorpciós koefficiensét vesszük figyelembe. Ennek a módszernek hibája, hogy nem veszi figyelembe a háttérnek a $\lambda_1 - \lambda_2$ szakaszon való emelkedését. Ezt a hibát csökkenthetjük a hullámhossz-intervallum hosszának csökkentésével [52]. Ezt úgy célszerű végre-



4/3. ábra. Modell-spektrumok a háttérhatás bemutatására.

a) Meghatározandó komponens, *b)* háttér, *c)* a háttér által torzított spektrum

* Amint ez a 4.7. fejezetben olvasható, az ilyen mérés két monokromátoros spektrofotométer segítségével közvetlenül elvégezhető.



4/4. ábra. Mesztranol meghatározása noretinodrel nagy feleslege mellett BASTOW módszerével [9] az alapvonal módszer felhasználásával.

a) Mesztranol spektruma ($c = 3{,}86$ mg/100 ml), *b)* háttér, *c)* az elegy spektruma. Oldószer: metanol. (R. A. BASTOW, J. Pharm. Pharmacol. **19**, 41 (1967) [9])

hajtani, hogy a spektrum leszálló ágán keresünk egy olyan hullámhosszt (λ_3), amelyhez tartozó abszorbancia viszonylag csekély. Ha ezen a két hullámhosszon mért abszorbancia különbségével számolunk, akkor csökkentjük a háttér hullámhosszfüggésének elhanyagolásából származó hibát. Ennél a módszernél a számolásnál természetesen a λ_1 és λ_3 hullámhosszon mért fajlagos abszorpciós koefficiensek különbségével számolunk. Ennek a módszernek alkalmazására számos példát (köztük gyógyszerkönyvi példákat is) találhatunk a 10. fejezetben.

Amint azt a 4/3. ábrán ugyancsak bemutatjuk, további korrekciós módszert jelent az (a teljes spektrum felvételét feltételező) módszer, amikor megkeressük a spektrumnak azt a szakaszát, ahol a meghatározandó komponens már nem nyel el, tehát a „tiszta" háttér spektrumának végét (λ_2 felett). Ezt a szakaszt λ_1 hullámhosszig extrapolálva közvetlenül megkaphatjuk a korrekciós tagot [113]. Ennek a módszernek előnye, hogy igyekszik figyelembe venni a háttér változását egészen a maximumig, ez azonban extrapolálással természetesen nem minden esetben végezhető el egzaktul, s az egyenes meghúzásánál nehéz a szubjektív elemeket kiküszöbölni.

Különösen biológiai minták színreakciói után alkalmazzák igen gyakran az ún. Allen-korrekciót [5], aminek a lényege az, hogy a maximumon kívül tőle jobbra és balra azonos (Δ) távolságra levő hullámhosszokon is mérünk, s a két utóbbi hullámhosszon mért abszorbancia középértékét levonjuk a maximumban mért abszorbanciából.

$$A_{\text{korrigált}} = A - \frac{A_{\lambda+\Delta} + A_{\lambda-\Delta}}{2}. \qquad (4/3)$$

Természetesen a számolásnál hasonló módon korrigált fajlagos abszorpciós koefficienst használunk. Ez a módszer a konstans hátteret teljes mértékben, a csökkenőt pedig abban az esetben veszi figyelembe kellő egzaktsággal, ha a sáv szimmetrikus, és a háttér $a\ (\lambda-\Delta)-(\lambda+\Delta)$ szakaszon lineáris függvénye a hullámhossznak. Ebből a szempontból kedvező, ha Δ értékét alacsonyra választjuk meg, ebben az esetben viszont a számolás alapjául szolgáló korrigált abszorbancia csökkenése rontja a mérés pontosságát.

Az Allen-korrekcióhoz hasonló elven alapul, de lényegesen egzaktabb az ún. alapvonal (base-line) módszer. Ezt MORTON és STUBBS vezették be A-vitaminnak csukamájolajban való meghatározására [90, 91], majd számos gyógyszer-analitikai probléma megoldására alkalmazták [9, 72, 76, 92]. Ezek közül LEGRAND [76], valamint BASTOW [9] nyomán mesztranol szennyezés, ill. mesztranol mint tablettakomponens meghatározását mutatjuk be nagy feleslegben levő 3-ketoszteroidok mellett. A meghatározást mesztranol fenol-éter típusú spektrumának hosszú hullámú sávjára alapozzuk. A ketoszteroidokat kálium-bór-hidriddel redukáljuk, mivel azonban igen nagy (100—1000-szeres) feleslegben vannak jelen, háttérspektrumukat még a redukció után is korrigálni kell.

A meghatározás elve a következő. Tiszta mesztranol spektrumában (4/4. ábra *1.* görbe) kiválasztunk a 278 nm-es maximum két oldalán egy-egy olyan hullámhosszt, ahol az abszorbancia azonos (273 és 288 nm). Nagy pontossággal meghatározzuk a magasabb hullámhossznál és a maximumban mért abszorbanciák hányadosát:

$$F=\frac{A_{288\,(St)}}{A_{278\,(St)}}=0{,}76\,. \qquad (4/4)$$

Ezután meghatározzuk a kálium-bór-hidriddel (ill. célszerűbben nátrium-bór-hidriddel [52]) redukált vizsgálandó minta (4/4. ábra *2.* görbe) abszorbanciáját ugyanezen a három hullámhosszon. A háttér miatt mindhárom érték nagyobb lesz a mesztranol adott hullámhosszra eső abszorbanciájánál. A maximumhelyre vonatkozó korrekció két tagból tevődik össze: y az az érték, amely az egész hullámhossztartományra, tehát már 288 nm-re is érvényes, x pedig a háttérnek 288 és 278 nm közti emelkedéséből adódik. Ez utóbbi értéket a 273 és 288 nm-nél mért abszorbanciák különbségéből a két hasonló háromszög oldalainak arányossága alapján lehet kiszámítani:

$$x=(A_{273}-A_{288})\frac{288-278}{288-273}=0{,}667(A_{273}-A_{288})\,. \qquad (4/5)$$

Ha x-et és y-t is korrekcióba vesszük, a (4/4) egyenlet érvényes lesz a háttérrel rendelkező minta abszorbanciáira is:

$$F=\frac{A_{288}-y}{A_{278}-(x+y)}=0{,}76\,. \qquad (4/6)$$

x-et a (4/5) egyenlet szerint behelyettesítve, majd y-t kifejezve kapjuk:

$$y=2{,}055\cdot A_{288}-3{,}167\cdot A_{278}+2{,}111\cdot A_{273}\,. \qquad (4/7)$$

Innen a korrigált abszorbancia a maximumhelyen:

$$A_{\text{korrigált}} = A_{278} - (x+y) = 4{,}164 \cdot A_{278} - 2{,}776 \cdot A_{273} - 1{,}387 \cdot A_{288} . \quad (4/8)$$

A korrigált abszorbanciából a mesztranol fajlagos abszorbciós koefficiense segítségével a mesztranol koncentrációja kiszámítható.

Figyelmet érdemel TRAVESET és munkatársai közleménye [119], amelyben a szerzők az alapvonalmódszer és a derivatív spektrofotometriás módszer (lásd 4.6. fejezet) összehasonlítását végezték el, és megállapították, hogy a klasszikus módszer számos esetben (pl. fenobarbitál meghatározása kúpokban) a lényegesen korszerűbb és nagyobb teljesítőképességű módszerrel egyenértékű eredményeket ad.

4.3.3. Az ortogonális polinomok módszere [79]

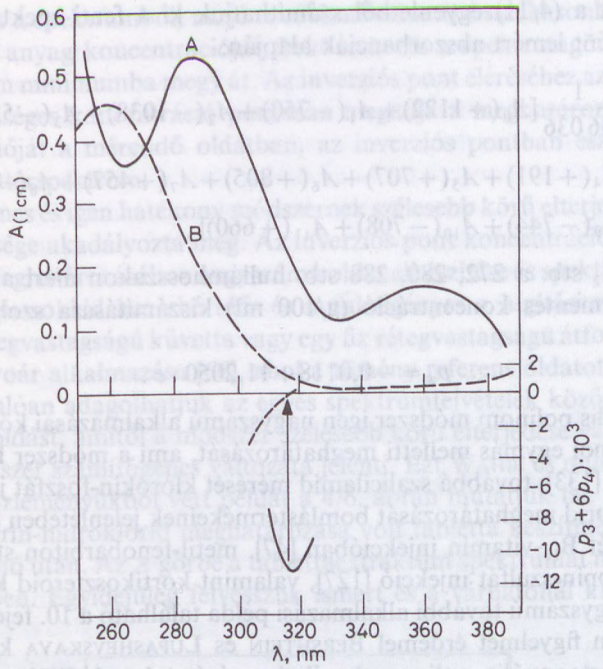
Valamennyi eddig tárgyalt háttérkorrekciós módszer közös hibája az, hogy nem veszi figyelembe a háttér görbületét az adott hullámhossztartományban. Ez különösen olyan esetekben okozhat komoly hibát, amikor viszonylag nagy háttér mellett kell meghatározni igen híg oldatok abszorbanciáját, mint pl. polimer filmekbe inkorporált gyógyszerek kioldódási sebességének meghatározásánál [124]. Ha a korrekciós számítást nemcsak három hullámhosszon mért abszorbanciára, hanem nagyszámú, pl. a teljes spektrumszakaszon 2—4 nm-enként mért értékekre alapozzuk, akkor a korrekció teljesen egzakttá tehető. Természetesen a mérési pontok számának növekedésével a számítások egyre bonyolultabbak lesznek, viszonylag egyszerű számítógépes programok segítségével azonban ezek a nehézségek könnyűszerrel leküzdhetők.

A háttérkorrekció ilyen több hullámhosszra alapozott módszereinél általában azt tételezzük fel, hogy a spektrum adott szakasza magasabb rendű függvénye a hullámhossznak, mint a háttér. Az erre alapuló számítás klasszikus esete grizeofulvin meghatározása fermentlében ASHTON, BROWN és TOOTIL [7, 8], ill. DALY [24] módszerével. A számítás alapját itt az képezi, hogy a háttér második, a spektrum pedig harmadik hatvány szerint változik a hullámhosszal.

Sokkal szélesebb körben használható a GLENN által bevezetett, majd elsősorban egyiptomi szerzők által számos gyakorlati feladat megoldására használt ún. ortogonális polinom módszer [48, 128, 133, 134]. Anélkül, hogy a módszer matematikai alapjainak és a számítás technikájának részleteibe belemennénk, a módszer legfontosabb vonásait a következőkben foglaljuk össze. A módszer alapját az képezi, hogy egy függvény, így az abszorpciós spektrum is az analitikai mérésre kiszemelt maximum környezetében megközelíthető, mint ún. ortogonális polinomok összege:

$$f(\lambda) = p_0 P_0 + p_1 P_1 + p_2 P_2 + \ldots + p_j P_j . \quad (4/9)$$

$f(\lambda)$ az abszorbancia a sáv mentén, ahol a hullámhosszakat általában egymástól egyenlő (2—8 nm-es) távolságra választjuk meg, bár leírták a módszert nem azonos hullámhossz-intervallumokra is [72]. P_0, P_1 ... P_j az ortogonális polinomok (konstans, lineáris, négyzetes, ill. λ egyre magasabb hatványainak függvényei, általában P_5-ig), p_0, p_1 ... p_j pedig ezek együtthatói, amelyek függenek a meghatározandó anyag koncentrációjától. Ez utóbbiakat a háttér-abszorbancia különböző



4/5. ábra. Diazepam (*A*) és bomlástermékének (*B*) spektrumai és a (p_3+6p_4) szerint számított konvolúciós görbék (lásd szöveg).

$c=0{,}001$ g/100 ml; oldószer: 0,1 M sósav. (M. BEDAIR, M. A. KORANY, M. E. ABDEL-HAMID, Analyst **109**, 1423 (1984) [11])

mértékben megemeli. Csakúgy, mint az Ashton—Tootil-módszer esetében, itt is a meghatározandó komponens spektrumánál magasabb fokszámú polinomot kell figyelembe venni, mint a legfeljebb négyzetes taggal leírható háttérnél. Az ortogonális polinomoknak a vizsgált spektrumot legjobban leíró rendszerét empirikus úton választjuk ki a lehetséges variánsok közül, a számítás alapjául szolgáló konstansokat táblázatokból kapjuk. A számítások, különösen számítógép alkalmazásával, nagyobb nehézség nélkül elvégezhetők, s így a módszer jól alkalmazható nemlineáris háttérrel rendelkező spektrumok alapján végzett kvantitatív meghatározásokra, sőt egyes esetekben két többé-kevésbé átfedő spektrummal rendelkező anyag egymás melletti meghatározására. Ez utóbbi esetben nagyobb pontosság érhető el, mint a két hullámhosszon való mérés és kétismeretlenes egyenletrendszer megoldása segítségével.

A módszert BEDAIR és munkatársainak [11] módszerén keresztül mutatjuk be diazepam meghatározására kiszerelt készítményekben, elsősorban hidrolitikus bomlásterméke (2-metil-amino-5-klór-benzofenon; lásd 241. oldal) jelenlétében. Amint az a 4/5. ábrán látható, a 272—360 nm spektrumtartományban a hidrolízistermék háttérként szerepel.

A kombinált polinom együtthatóját ez esetben a (4/10) egyenlet írja le:

$$p_w = p_3 + 6p_4 \,. \qquad (4/10)$$

p_w számértékét a (4/11) egyenletből számíthatjuk ki a fenti spektrumszakaszon 8 nanométerenként lemért abszorbanciák alapján:

$$p_w = \frac{1}{36\,036}[A_0(+1122)+A_1(-750)+A_2(-1038)+A_3(-526)+$$
$$+A_4(+191)+A_5(+707)+A_6(+805)+A_7(+457)+A_8(-176)+$$
$$+A_9(-744)+A_{10}(-708)+A_{11}(+660)], \qquad (4/11)$$

ahol A_0, A_1, A_2 stb. a 272, 280, 288 stb. hullámhosszakon mért abszorbanciát jelenti. A háttérmentes koncentráció (g/100 ml) kiszámítására szolgáló regressziós egyenlet:

$$p_w = -0{,}0118 + 11{,}2050 \cdot c\,. \qquad (4/12)$$

Az ortogonális polinom módszer igen nagyszámú alkalmazásai közül megemlítjük adrenalin és fenol egymás melletti meghatározását, ami a módszer klasszikus alkalmazási példája [133], továbbá szalicilamid mérését klorokin-foszfát jelenlétében [48], tiamin-hidroklorid meghatározását bomlástermékeinek jelenlétében [131], konzerválószerek mérését B_{12}-vitamin injekcióban [47], metil-fenobarbiton stabilitási vizsgálatát [132], atropin-szulfát injekció [127], valamint kortikoszteroid készítmények [6] vizsgálatát. Nagyszámú további alkalmazási példa található a 10. fejezet egyes alfejezeteiben. Külön figyelmet érdemel Bershtein és Lupashevskaya közleménye [15], amelyben az ortogonális polinomok alkalmazásán alapuló különböző mérés- és számítási technikák teljesítőképességét hasonlítják össze antibiotikumok példáján.

Lényegében hasonló megközelítésben, de az ortogonális polinomok helyett trigonometrikus függvényeket alkalmazva Fourier-sorbafejtés segítségével is el lehet végezni a háttérkorrekciót. A két módszer összehasonlítását progeszteronnak és tesztoszteron-propionátnak olajos injekcióban történő meghatározásánál Wahbi és munkatársai végezték el [129].

4.3.4. A kompenzációs módszer

A háttérspektrumok hatásának kiküszöbölését célzó kompenzációs vagy görbeinverziós módszer elvében és gyakorlatában is alapvetően különbözik az eddig tárgyalt módszerektől.

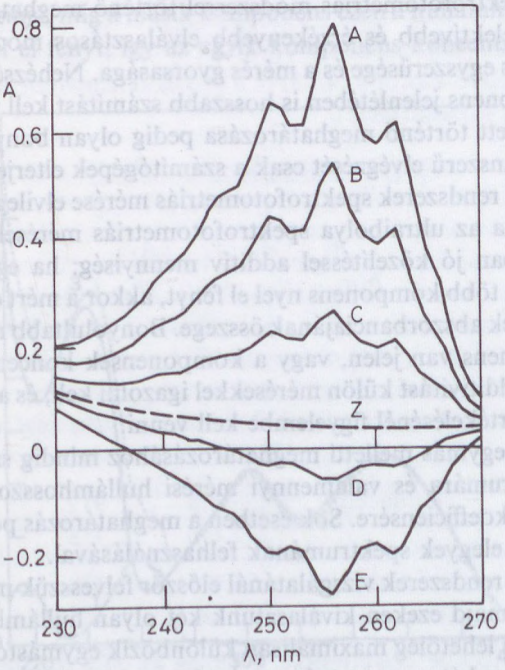
A módszer alkalmazhatósága lényegében regisztráló spektrofotométerhez kötött (bár nem lehet kizárni egysugaras készülékek alkalmazását sem igen sok hullámhosszon való felvétel alapján). A módszernek, amit Hiskey [62] és Tardif [117] vezettek be a gyógyszer-analitikába, a következő az elve. A vizsgálandó minta spektruma a meghatározandó komponens jól definiált maximummal (ill. maximumokkal) rendelkező spektrumának és a korábban definiált, jellegtelen háttérspektrumnak összegéből tevődik össze. Ha ennek az oldatnak spektrumát a tiszta oldószer helyett a meghatározandó komponens ismert és egyre növekvő koncentrációjú oldataival mint összehasonlító oldatokkal szemben vesszük fel, akkor a spektrumokban egyre csökkenő intenzitással jelentkezik a meghatározandó komponens spektruma mindaddig, amíg

az teljesen eltűnik a spektrumból, majd tovább növelve az összehasonlító oldatban a meghatározandó anyag koncentrációját, bekövetkezik a spektrumgörbe inverziója, vagyis a maximum minimumba megy át. Az inverziós pont eléréséhez az összehasonlító oldatban szükséges koncentráció pontosan megadja a meghatározandó komponens koncentrációját a mérendő oldatban, az inverziós pontban észlelt spektrum pedig a tiszta háttérspektrum.

Ennek a szellemes és igen hatékony módszernek szélesebb körű elterjedését nyilvánvalóan nehézkessége akadályozta meg. Az inverziós pont koncentrációjának hígítási sorozattal való meghatározásához nagyszámú oldat elkészítése és spektrumuk felvétele szükséges. Nem sokkal kevésbé idő- és munkaigényes a hígítási sorozat helyett változtatható rétegvastagságú küvetta vagy egy fix rétegvastagságú átfolyó küvettával kombinált rezervoár alkalmazása [66], ahol a tömény referens oldatot a fotometriás titráláshoz hasonlóan adagolhatjuk az egyes spektrumfelvételek között.

A valódi megoldást, amitől a módszer szélesebb körű elterjedése várható, minden bizonnyal a módszer számítógépes változata jelenti. Ezt Wahbi és munkatársai írták le [135]. Az ő közleményükből vett példát a 4/6. ábrán mutatjuk be.

A feladat efedrin-hidroklorid meghatározása volt tabletta készítményben 0,05 M kénsavas extrakció után. Az *A* görbe a tablettaextraktum spektrumát mutatja 0,05 M kénsavval szemben. Egyidejűleg felvesszük ismert és a várhatónál kisebb koncent-



4/6. ábra. Efedrin-hidroklorid meghatározása tabletta készítményben a kompenzációs módszer alkalmazásával.

A) A tablettaextraktum spektruma, *B—E)* kompenzált és túlkompenzált spektrumok (lásd szöveg). Oldószer: 0,05 M kénsav. (A.-A. M. Wahbi, H. Mahgoub, M. Barary, Analyst **114,** 505 (1989) [135])

rációjú tiszta efedrin-hidroklorid spektrumát is hasonló körülmények között, s azt a komputerben tároljuk. Ennek a spektrumnak különböző, egyre növekvő szorzófaktorral intenzívebbé tett változatait generáljuk a komputerben, amely egyúttal elvégzi ezek levonását is az *A* görbéből. Így jutunk el a *B*, *C*, *D* és *E* görbékhez. Az inverziós pontnak megfelelő tiszta háttérspektrum a *C* és *D* spektrum között megjelenő *Z* görbe. Az efedrintartalom kiszámításának alapjául szolgáló abszorbanciát vagy az *A* görbe maximumán mért abszorbanciából számíthatjuk ki a *Z* görbe megfelelő hullámhosszon mért értékét korrekcióba véve, vagy a referens oldat koncentrációjából közvetlenül, figyelembe véve az inverziós pont eléréséhez szükséges szorzófaktort.

Említést érdemel még a módszer alkalmazása derivált spektrumokra [130].

4.4. Többkomponensű rendszerek spektrofotometriás elemzése

4.4.1. Meghatározások egyenletrendszerek segítségével

A gyógyszerkészítmények jelentős része két vagy több meghatározandó hatóanyagot tartalmaz. A spektrofotometriás módszerrel történő meghatározás nagy előnye — a kétségkívül szelektívebb és érzékenyebb elválasztásos módszerekkel szemben — a mintaelőkészítés egyszerűsége és a mérés gyorsasága. Nehézséget jelent azonban, hogy már két komponens jelenlétében is hosszabb számítást kell végezni, több komponens egymás mellett történő meghatározása pedig olyan bonyolult számításokat igényel, amelyek rutinszerű elvégzését csak a számítógépek elterjedése tette lehetővé.

Többkomponensű rendszerek spektrofotometriás mérése elvileg azért végezhető el, mert az abszorbancia az ultraibolya spektrofotometriás méréseknél szokásos koncentrációtartományban jó közelítéssel additív mennyiség: ha egy rendszerben egy adott hullámhosszon több komponens nyel el fényt, akkor a mért eredő abszorbancia az egyes komponensek abszorbanciájának összege. Bonyolultabb rendszereknél, amelyekben sok komponens van jelen, vagy a komponensek koncentrációja jelentősen eltér egymástól, az additivitást külön mérésekkel igazolni kell, és az esetleges eltéréseket az eredmények értékelésénél figyelembe kell venni.

Több komponens egymás melletti meghatározásához mindig szükség van a tiszta komponensek spektrumára és valamennyi mérési hullámhosszon a komponensek fajlagos abszorpciós koefficiensére. Sok esetben a meghatározás pontossága növelhető ismert összetételű elegyek spektrumának felhasználásával.

A kétkomponensű rendszerek vizsgálatánál először felvesszük mindkét tiszta komponens spektrumát, majd ezeken kiválasztunk két olyan hullámhosszat, ahol a két vegyület abszorbciója lehetőleg maximálisan különbözik egymástól. A kiválasztásnál előnyben részesítjük a két anyag spektrumának maximumhelyeit, illetve azokat a hullámhosszakat, amelyeken csak az egyik vegyület nyel el fényt.* Ezután a kiválasz-

* Többkomponensű rendszerek vizsgálatához az optimális hullámhosszak kiválasztásával kapcsolatos elméleti kérdéseket illetően Bershtein dolgozatára utalunk [14].

tott (λ_1 és λ_2) hullámhosszakon meghatározzuk mindkét vegyület fajlagos abszorpciós koefficiensét. Mivel az abszorbanciák additívak, felírhatók:

$$A_1 = a_{1,\lambda_1} \cdot c_1 \cdot b + a_{2,\lambda_1} \cdot c_2 \cdot b \qquad (4/13)$$

és

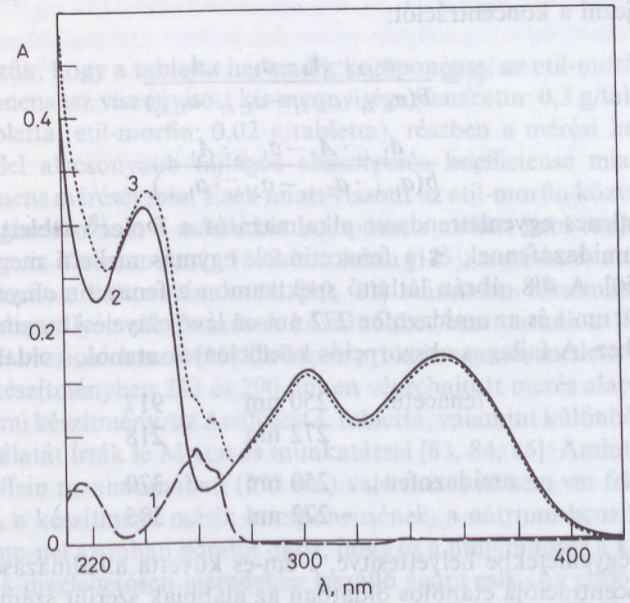
$$A_2 = a_{1,\lambda_2} \cdot c_1 \cdot b + a_{2,\lambda_2} \cdot c_2 \cdot b\,, \qquad (4/14)$$

ahol A_1 és A_2 az elegy abszorbanciája λ_1 és λ_2 hullámhosszon, a_{1,λ_1} és a_{2,λ_2} az 1. anyag fajlagos abszorpciós koefficiense λ_1 és λ_2 hullámhosszon, a_{2,λ_1} és a_{2,λ_2} a 2. anyag fajlagos abszorpciós koefficiense λ_1 és λ_2 hullámhosszon, c_1 és c_2 az 1. és 2. anyag koncentrációja, b a rétegvastagság cm-ben.

A két egyenletben A_1 és A_2 mérési adat, a fajlagos abszorpciós koefficiens értékek konstansok, b egy mérésen belül adott, c_1 és c_2 a két meghatározandó ismeretlen koncentráció.

A kétkomponensű rendszereknél elméletben ugyan lehetséges, hogy mindkét komponens spektrumában van olyan hullámhossz, ahol a másik komponens egyáltalán nem nyel el fényt, tehát a két komponens koncentrációját a (4/1) egyenlet segítségével egymástól függetlenül számíthatjuk ki, a gyakorlatban azonban ilyen eset nem fordul elő.

Gyakori eset viszont, hogy a két komponens spektruma egymást csak részben fedi át. Van tehát olyan λ_1 hullámhossz, amelyen csak az egyik komponensnek van jól mérhető abszorbanciája, míg a másik komponens ezen a hullámhosszon gyakorlatilag egyáltalán nem nyel el fényt, így az egyik komponens koncentrációja a Lambert—



4/7. ábra. Spektrumok nikotinsav (*1*) és drotaverin-hidroklorid (*2*) egymás melletti meghatározásához Nicospan tablettában (*3*). Oldószer: 0,1 M sósav. Koncentráció: nikotinsav 0,22 mg/100 ml; drotaverin-hidroklorid 0,78 mg/100 ml; Nicospan tabletta 2,00 mg/100 ml

Beer-törvény alapján a λ_1 hullámhosszon mért abszorbanciából a (4/1) egyenlettel közvetlenül kiszámítható.

Ezzel az esettel találkozunk a Nicospan tabletta drotaverin-hidroklorid- és nikotinsav-tartalmának meghatározásánál. Mivel mindkét komponens jól oldódik 0,1 M sósavban, maga a spektrofotometriás mérés egyetlen oldatból elvégezhető.

Amint az a 4/7. ábrán látható, a drotaverin-hidrokloridnak három abszorbanciamaximuma van az ultraibolya spektrumtartományban: 241, 303 és 354 nm körül. A nikotinsavnak egyetlen maximuma van 260 nm körül (a 215 nm körül mutatkozó maximumot az alacsony hullámhosszon végzett mérés hibája miatt nem célszerű figyelembe venni). 354 nm körül a nikotinsavnak nincs mérhető fényelnyelése, vagyis a (4/13) egyenletben $a_{2,\lambda_1}=0$, tehát a 354 nm-en mért abszorbanciából a drotaverin-hidroklorid koncentrációja, c_1 kiszámítható:

$$c_1=\frac{A_{354\,\mathrm{nm}}}{a_{1,354\,\mathrm{nm}}\cdot b}. \tag{4/15}$$

A nikotinsav meghatározását c_1 ismeretében a 260 nm-en mért abszorbanciából a (4/14) egyenlet segítségével lehet elvégezni:

$$c_2=\frac{A_{260\,\mathrm{nm}}-a_{1,260\,\mathrm{nm}}\cdot c_1\cdot b}{a_{2,260\,\mathrm{nm}}\cdot b}. \tag{4/16}$$

Hosszadalmasabb, de még mindig manuálisan is elvégezhető a számítás, ha a két komponens spektruma teljesen átfedi egymást, a mérési hullámhosszakon mindkét komponens nyel el fényt. Ekkor a (4/13) és a (4/14) kétismeretlenes egyenletrendszerből ki lehet fejezni a koncentrációt:

$$c_1=\frac{a_{2,\lambda_2}\cdot A_1-a_{2,\lambda_1}\cdot A_2}{b(a_{1,\lambda_1}\cdot a_{2,\lambda_2}-a_{2,\lambda_1}\cdot a_{1,\lambda_2})} \tag{4/17}$$

$$c_2=\frac{a_{1,\lambda_1}\cdot A_2-a_{1,\lambda_2}\cdot A_1}{b(a_{1,\lambda_1}\cdot a_{2,\lambda_2}-a_{2,\lambda_1}\cdot a_{1,\lambda_2})}. \tag{4/18}$$

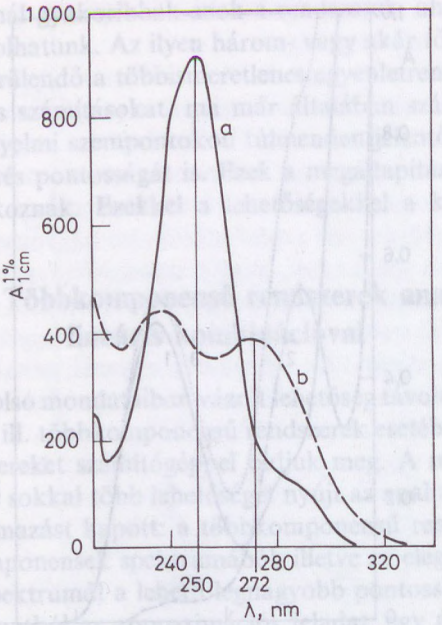
A kétismeretlenes egyenletrendszer alkalmazását a Dolor^R tabletta két komponensének, az amidazofennek és a fenacetinnek egymás melletti meghatározásával mutatjuk be [50]. A 4/8. ábrán látható spektrumon a fenacetin elnyelésének maximumhelyét, 250 nm-t és az amidazofen 272 nm-en lévő elnyelési maximumát választjuk ki a méréshez. A fajlagos abszorpciós koefficiensek etanolos oldatban:

fenacetin	250 nm	917
	272 nm	218
amidazofen	250 nm	370
	272 nm	385

Ezeket a fenti egyenletekbe helyettesítve, 1 cm-es küvetta alkalmazása esetén a két hatóanyag koncentrációja etanolos oldatban az alábbiak szerint számítható ki:

$$c(\text{fenacetin})=0{,}00141\,A_{250}-0{,}00135\,A_{272} \tag{4/19}$$

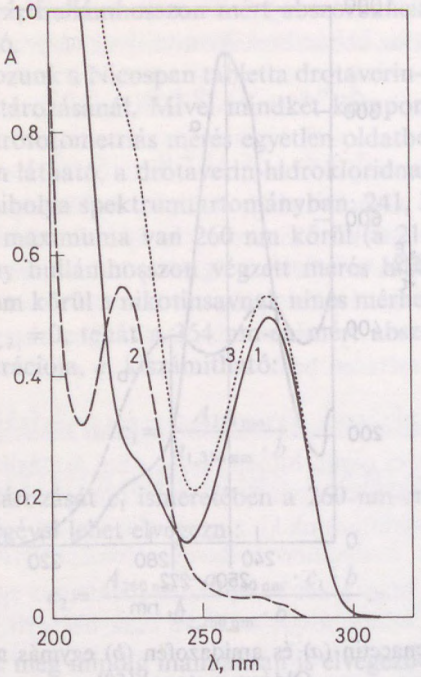
$$c(\text{amidazofen})=0{,}00337\,A_{272}-0{,}00080\,A_{250}. \tag{4/20}$$



4/8. ábra. Spektrumok fenacetin (*a*) és amidazofen (*b*) egymás melletti meghatározásához. Oldószer: etanol [50]

Megjegyezzük, hogy a tabletta harmadik komponense, az etil-morfin részben a két másik komponenshez viszonyított kis mennyisége (fenacetin: 0,3 g/tabletta, amidazofen: 0,3 g/tabletta, etil-morfin: 0,02 g/tabletta), részben a mérési hullámhosszakon nagyságrenddel alacsonyabb fajlagos abszorpciós koefficiense miatt nem zavarja egyik komponens mérését sem. Ezek miatt viszont az etil-morfin közvetlen spektrofotometriás meghatározását a másik két komponens mellett nem tudjuk elvégezni.

Ezt a módszert VIERORDT már 1873-ban leírta [125]; a módszer eredeti vagy több, némileg módosított változatának, pl. [10, 11] számtalan alkalmazása található a szakirodalomban. Ilyen alkalmazások közül többet bemutatunk a 10. fejezetben. Itt megemlítjük BAYER módszerét [10] koffein és prokain egymás melletti meghatározására injekciós készítményben 273 és 290 nm-en végrehajtott mérés alapján. Ugyancsak koffeintartalmú készítmény, az Acidotest I. tabletta, valamint különböző szulfonamid elegyek vizsgálatát írták le MILCH és munkatársai [83, 84, 85]. Amint az a 4/9. ábrán látható, a koffein maximumában (273 nm) való mérés itt sem vet fel méréstechnikai problémákat, a készítmény másik komponensének, a nátrium-benzoátnak maximumában, 224 nm-nél azonban gondot okoz, hogy ez a hullámhossz a készítmény eredő spektrumának meglehetősen meredeken leszálló ágára esik. Az ebből származó hiba csökkenthető, ha — amint ezt már az egykomponensű rendszerek tárgyalása során is javasoltuk — a meghatározást nem előre kimért fajlagos abszorpciós koefficiensek alapján, hanem a méréssel egyidejűleg vizsgált standardok segítségével végezzük el.



4/9. ábra. Spektrumok koffein (*1*) és nátrium-benzoát (*2*) egymás melletti meghatározásához Acidotest I. tablettában (*3*). Oldószer: víz. koncentráció: koffein 1,00 mg/100 ml; nátrium-benzoát 0,994 mg/100 ml; Acidotest I. tabletta 2,00 mg/100 ml

(Gy. Milch, A. Csontos, M. Borsai, E. Vadon, I. Mogács, Acta Pharm. Hung. **36**, 200 (1966) [84])

Végül megemlítjük, hogy a Vierordt-módszer kiterjesztésével, három hullámhosszon való méréssel és háromismeretlenes egyenletrendszer megoldásával háromkomponensű rendszerek analízise is elvégezhető. Csakúgy, mint ahogy azt a kétkomponensű rendszerek esetén a nikotinsav—drotaverin rendszeren bemutattuk (4/7. ábra) gyakran itt is jelentősen egyszerűsíthetők a különben igen hosszadalmas számolások, ha a három komponens közül az egyik (általában a leghosszabb hullámhosszú) maximumán a másik két komponens nem rendelkezik fényelnyeléssel. Ilyen esetet reprezentál pl. a Machek által leírt módszer [78] B_1-, B_6- és B_{12}-vitaminok egymás melletti meghatározására. Mivel ez utóbbi szelektíven nyel el 361 nm-nél, itt meghatározása szelektíven elvégezhető és fényelnyelése a B_1- és B_6-vitamin maximumhelyein (235 nm, ill. 292 nm) korrekcióba vehető. Ezután a két vitamin meghatározása már a kétkomponensű rendszereknél megismert számításmód alkalmazásával elvégezhető.

Egy másik hasonló példa Sharma és munkatársai módszere [109] meklozin, koffein és B_6-vitamin egymás melletti meghatározására. A mérési hullámhosszok 0,01 M metanolos nátrium-hidroxid-oldatban sorrendben 230, 273 és 307 nm. Ez utóbbin a B_6-vitamin fényelnyelése szelektív.

Az itt bemutatottaknál gyakoribbak azok a rendszerek, ahol ilyen egyszerűsítési lehetőséggel nem számolhatunk. Az ilyen három- vagy akár többkomponensű rendszerek vizsgálatát, elkerülendő a többismeretlenes egyenletrendszerek megoldásával járó igen hosszadalmas számításokat, ma már általában számítógépes módszerrel végezzük el, ami a kényelmi szempontokon túlmenően jelentősen növeli a módszer szelektivitását és a mérés pontosságát is. Ezek a megállapítások a kétkomponensű rendszerekre is vonatkoznak. Ezekkel a lehetőségekkel a következő alfejezetben foglalkozunk.

4.4.2. Többkomponensű rendszerek analízise lineáris kombinációval

Az előző alfejezet utolsó mondataiban vázolt lehetőség távolról sem csak azt jelenti, hogy a korábban leírt, ill. többkomponensű rendszerek esetében még sokkal bonyolultabb egyenletrendszereket számítógéppel oldjuk meg. A modern matematika és számítástechnika ennél sokkal több lehetőséget nyújt az analitikus számára. Maga a feladat is új megfogalmazást kapott: a többkomponensű rendszer spektrumát kell előállítani a tiszta komponensek spektrumából, illetve az elegy spektrumából kell a tiszta komponensek spektrumát a lehető legnagyobb pontossággal visszakapni.

Matematikai szempontból ez approximációs feladat: egy görbét kell több görbe összegeként előállítani úgy, hogy az eredő görbe a mért görbétől a legkisebb eltérést mutassa. Mivel a többkomponensű rendszerben is igaz, hogy az abszorbanciák additívak, az elegy spektruma a komponensek spektrumának összege, meg kell keresni azokat a — koncentrációval arányos — együtthatókat, amelyekkel az egyes spektrumokat meg kell szorozni, majd az így megszorzott spektrumokat összeadva kell vizsgálni a mért és a számított spektrum illeszkedésének jóságát.

A lineáris kombináción alapuló megoldáshoz az

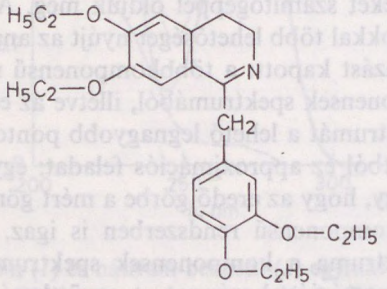
$$\begin{aligned} A_1 &= K_{1,1} \cdot c_1 \cdot b + K_{2,1} \cdot c_2 \cdot b + \ldots + K_{n,1} \cdot c_n \cdot b \\ &\vdots \\ A_m &= K_{1,m} \cdot c_1 \cdot b + K_{2,m} \cdot c_2 \cdot b + \ldots + K_{n,m} \cdot c_n \cdot b_b \end{aligned} \qquad (4/21)$$

egyenletrendszer megoldásához kell az n komponens c_1, c_2 ... c_n értékét megkeresni. A megoldandó egyenletek száma m, azon hullámhosszak száma, amelyekben a spektrofotometriás mérést elvégeztük; legalább annyi hullámhosszat kell választani, ahány komponens van a rendszerben. Fokozza a meghatározás pontosságát, ha a mérést ennél több pontban végezzük el: ilyenkor túlhatározott rendszerről beszélünk. Amint a későbbiekben látni fogjuk, a korszerű, számítógéppel összekapcsolt spektrofotométereken lehetőség van nagyon sok pont felvételére, a vizsgált spektrumtartományban akár nanométerenként mérhetjük az abszorbanciát, és a számítást a nagyon sok, esetleg több száz egyenletből számítógéppel végezhetjük el [17,93].

Ahhoz, hogy a meghatározást el lehessen végezni, több feltételnek kell teljesülnie:
— a tiszta komponensek spektrumának rendelkezésre kell állnia,
— a mérési tartományban minden egyes komponensre érvényesnek kell lennie a Lambert—Beer-törvénynek,

— a többkomponensű rendszer spektruma a komponensek spektrumának összegeként előállítható kell hogy legyen,
— a spektrumok adatainak digitalizált formában rendelkezésre kell állniuk,
— a kiértékeléshez megfelelő számítógéppel és programmal kell rendelkezni.

A tiszta komponensek spektrumát illetően érdemes megjegyezni, hogy legalább annyi standard spektrum kell, ahány komponens van a rendszerben, javítja azonban a meghatározás pontosságát, ha több standardot használunk. Ezt tehetjük úgy, hogy azonos standard különböző — de a mérendőtől nem nagyon eltérő — koncentrációjú oldatainak vesszük fel a spektrumát, vagy a standard anyagokból ismert összetételű elegyeket készítünk, és ezeknek a spektrumát is felvesszük. A két módszer kombinálható is, de a használható standardok számát a rendelkezésre álló számítógépprogram korlátozza. Minél több standardot használunk ugyanis, annál több elemű mátrixszal kell végezni a számítást, ehhez nagyobb memóriakapacitású számítógép szükséges, és a számítási idő is tetemesen megnő [103, 137].



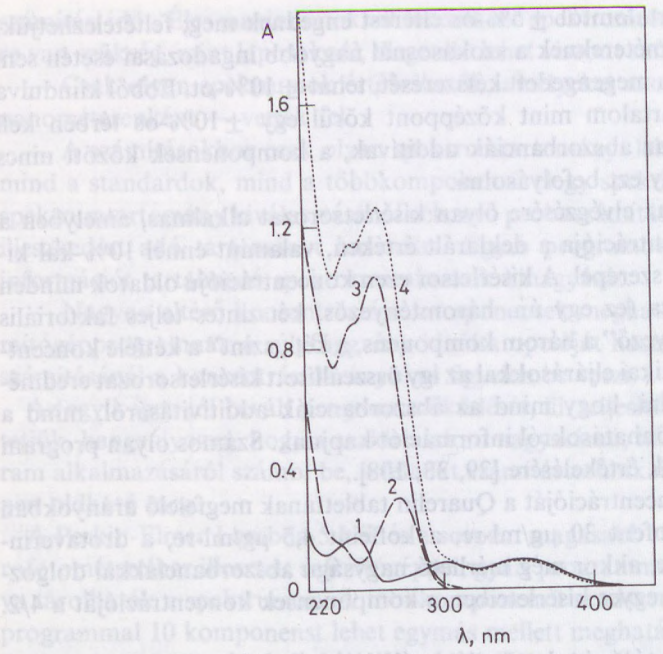
drotaverin

A módszer alkalmazását egy háromkomponensű tabletta, a Quarelin példáján mutatjuk be. A 650 mg-os Quarelin tabletta 400 mg novamidazofent, 60 mg koffeint és 40 mg drotaverin-hidrokloridot tartalmaz. Fajlagos abszorpciós koefficienseik 0,1 M sósavban:

	abszorpciós maximum (nm)	$A^{1\%}_{1\ cm}$
novamidazofen	259	270
koffein	270	495
drotaverin-hidroklorid	354	235
	301	221
	241	435

Amint ez a 4/10. ábrán látható, a spektrumok átfedik egymást; a fajlagos abszorpciós koefficiensek azonos nagyságrendűek, és ha figyelembe vesszük a komponensek arányát (10 : 1,5 : 1), a meghatározás körülményeit kedvezőtlennek mondhatjuk.

A 4/10. ábrán jól látható, hogy csak a drotaverin-hidrokloridnak van független meghatározásra alkalmas abszorpciós maximuma, 310 nm alatt a három komponens spektruma átfedi egymást, a novamidazofen spektruma pedig gyakorlatilag elfedi a másik két komponens spektrumát.



4/10. ábra. Spektrumok drotaverin-hidroklorid (*1*), koffein (*2*) és novamidazofen (*3*) egymás melletti meghatározásához Quarelin tablettában (*4*). Oldószer: 0,1 M sósav. Koncentráció: drotaverin-hidroklorid 0,40 mg/100 ml; koffein 0,60 mg/100 ml; novamidazofen 4,00 mg/100 ml; Quarelin tabletta 6,50 mg/100 ml

Mindenekelőtt meg kell vizsgálni, hogy a mérésre alkalmas koncentrációtartományban érvényes-e a Lambert—Beer-törvény. Ezt lineáris regresszióanalízissel végezhetjük el. A regresszióanalízis azt vizsgálja, hogy a mérési eredmények az $A = a + bc$ függvény által leírt egyenesen helyezkednek-e el, illetve az egyes mérési pontok milyen mértékben térnek el ettől. A mérési pontok illeszkedésének jóságát leggyakrabban a legkisebb négyzetes illesztés módszerével vizsgálják; a számítások eredményét a 4/1. táblázat mutatja be.

A gyógyszergyártás folyamán a komponensek koncentrációja bizonyos mértékben ingadozik. Ezt a bizonytalanságot a gyógyszerkönyvek is figyelembe veszik: általában

4/1. táblázat. Az abszorbancia és koncentráció közti lineáris összefüggés

Anyag neve	Abszorpciós maximum (nm)	*C* (μg/ml)	Regressziós koefficiens		Korrelációs koefficiens
			a	*b*	*r*
Novamidazofen	259	10—50	—0,058	0,026	0,9999
Koffein	272	2,5—10	—0,060	0,048	0,9999
Drotaverin HCl	353	2,50—6,25	—0,042	0,023	0,9928
	303		—0,043	0,021	0,9873
	242		—0,060	0,042	0,9862

a deklarált hatóanyag-tartalomtól ±5%-os eltérést engednek meg; feltételezhetjük, hogy a technológiai paramétereknek a szokásosnál nagyobb ingadozásai esetén sem haladja meg ez az eltérés a megengedett kétszeresét, tehát ±10%-ot. Ebből kiindulva a deklarált hatóanyag-tartalom mint középpont körül egy ±10%-os térben kell ellenőriznünk azt, hogy az abszorbanciák additívak, a komponensek között nincs olyan kölcsönhatás, amely ezt befolyásolná.

Ennek a vizsgálatnak az elvégzésére olyan kísérletsorozat alkalmas, amelyben a három komponens koncentrációja a deklarált értéken, valamint ennél 10%-kal kisebb, ill. nagyobb értéken szerepel. A kísérletsor ezen koncentrációjú oldatok minden kombinációját tartalmazza (ez egy ún. háromtényezős, kétszintes teljes faktoriális kísérletterv, a három „tényező" a három komponens, a két „szint" a kétféle koncentráció). Megfelelő matematikai eljárásokkal az így összeállított kísérletsorozat eredményeit ki lehet úgy értékelni, hogy mind az abszorbanciák additivitásáról, mind a komponensek közti kölcsönhatásokról információt kapjunk. Számos olyan program van, amely alkalmas ennek értékelésére [29, 33, 108].

Ha a komponensek koncentrációját a Quarelin tablettának megfelelő arányokban állítjuk be, a novamidazofent 30 μg/ml-re, a koffeint 4,5 μg/ml-re, a drotaverin-hidrokloridot 3,0 μg/ml-re, akkor még mérhető nagyságú abszorbanciákkal dolgozhatunk. A kísérletsorozat egyes kísérleteiben a komponensek koncentrációját a 4/2. táblázat mutatja.

A számítások megbízhatóságának növelése céljából helyes legalább három, egymástól függetlenül készített oldatban elvégezni a mérést.

Ma már a spektrofotométerek egy részéhez közvetlenül kapcsolható számítógép, és sok olyan program áll rendelkezésre, amely a standard anyagok spektrumából és a mérési pontokból elvégzi a szükséges számításokat [17, 103, 137]. Az analitikusnak nincs szüksége speciális számítástechnikai ismeretekre, arra azonban igen, hogy a program célszerű felhasználásához pontosan definiálni tudja, milyen körülmények között akar mérni, és mit akar kiszámítani. Néhány körülményre felhívjuk itt a figyelmet:

— A spektrumok felvételénél az adatsűrűséget — a mérési pontok közti távolságot — úgy kell megválasztani, hogy a spektrum finomszerkezetét észleljük, de ne mérjünk feleslegesen sok pontban, mert a mérési pontok számának növelése megnöveli a

4/2. táblázat. 2^3 teljes faktoriális kísérletterv

Kísérlet sorszáma	Novamidazofen (μg/ml)	Koffein (μg/ml)	Drotaverin HCl (μg/ml)
0	30,0	4,50	3,00
1	27,0	4,05	2,70
2	27,0	4,05	3,30
3	27,0	4,95	2,70
4	27,0	4,95	3,30
5	33,0	4,05	2,70
6	33,0	4,05	3,30
7	33,0	4,95	2,70
8	33,0	4,95	3,30

számítási időt. Éles maximumokkal rendelkező spektrumoknál nagyobb adatsűrűségre van szükség, mint laposaknál, elegendő lehet viszont szűkebb tartomány felvétele.

— Csak olyan spektrumok értékelhetők, amelyeket azonos adatsűrűséggel — pl. nanométerenként — vettek fel.

— A számításokhoz csak olyan spektrumtartományt lehet felhasználni, amelyben mind a standardok, mind a többkomponensű elegy spektruma rendelkezésre áll. A spektrumtartomány kiválasztásánál célszerű próbaszámításokat végezni, és a legjobb illeszkedést adó tartományt használni. Egyes programok lehetővé teszik a kevés információt tartalmazó spektrumszakaszok kihagyását.

— Nagyon eltérő koncentrációjú komponensek meghatározásánál célszerű a számítógépprogramnak a súlyfüggvény kínálta opcióját használni, ami az eredmények számításánál a koncentrációarányokat figyelembe veszi.

Az egyik igen jól bevált program működését, ill. teljesítőképességét röviden ismertetjük, hangsúlyozva, hogy a szakirodalom nagyszámú, házi készítésű és gyári program alkalmazásáról számol be, a feladat számítástechnikai szempontból sokféleképpen oldható meg.

A Perkin-Elmer Lambda 5-höz és a sorozat magasabb típusszámú UV-VIS spektrofotométereihez illesztett számítógéppel, gyári programmal felvehetők és digitalizálva tárolhatók a spektrumok. A többkomponensű rendszerek kiértékelésére szolgáló programmal 10 komponenst lehet egymás mellett meghatározni. A program a komponensek spektrumának lineáris kombinációit számolja, a számított spektrumot a mérthez legkisebb négyzetes illesztéssel illeszti. A számítás folyamán a program a standardok spektrumának olyan lineáris kombinációját keresi, amelyben a lineáris kombináció és a mért spektrum közti eltérés hibája minimalizálva van. A hibát a program minden mérési pontban a mért és a számított spektrum közti eltérés négyzetének összegéből számítja (root mean square error).

Ha figyelembe vesszük, hogy a Quarelin komponenseinek spektrumát 210—420 nm között kell mérni, és a mérést a kvantitatív spektrofotometriában szokásos felbontással, 1 nm-enként végezzük el, akkor a számításnál a program 211 mérési pontot használ fel, ami a Vierordt-módszerben használt néhány mérési ponthoz képest [55, 56] nagyon megnöveli a mérés pontosságát. Tovább finomítja a számítást, hogy a program a komponensek arányát figyelembe vevő súlyfüggvényt tartalmaz, ami csökkenti a nagyon eltérő koncentrációkból eredő hibákat.

A 4/3. táblázatban bemutatott mérési eredmények jól szemléltetik, hogy a kísérletsorozat ismert összetételű elegyeiben milyen pontossággal lehetett a komponenseket visszanyerni. Amint a táblázatban látható, mind a legnagyobb koncentrációban jelen lévő novamidazofen, mind a legkisebb koncentrációban jelen lévő drotaverin-hidroklorid mennyiségét a ténylegesnél kissé magasabb értéknek, a koffeinét pedig valamivel alacsonyabbnak mértük, ez az eltérés azonban még a többkomponensű rendszerek meghatározásánál a szakirodalomban ismertetett visszanyerési határoknak jól megfelel. A 95% valószínűségi szinten számított megbízhatósági tartomány mindegyik komponensnél igen szűk, ami azt igazolja, hogy ha a komponensek koncentrációja a deklarált értéküktől $\pm 10\%$-kal tér el, akkor a meghatározás jól reprodukálható.

A 4/3. táblázat értékei alapján a novamidazofennek és a drotaverin-hidrokloridnak a magasabb, a koffeinnek az alacsonyabb értéke szisztematikus eltérésnek látszik, ami

4/3. táblázat. A Quarelin tabletta komponenseinek meghatározása

Kísérlet sorszáma	Novamidazofen			Koffeinkoncentráció			Drotaverin hidroklorid koncentráció		
	beállított (μg/ml)	mért (μg/ml)	visszanyerés (%)	beállított (μg/ml)	mért (μg/ml)	visszanyerés (%)	beállított (μg/ml)	mért (μg/ml)	visszanyerés (%)
0	30,00	30,573	101,91	4,50	4,357	96,82	3,00	3,082	102,73
1	27,00	27,510	101,89	4,05	3,871	95,58	2,70	2,746	101,70
2	27,00	27,477	101,77	4,05	3,871	95,58	3,30	3,406	103,21
3	27,00	27,527	101,95	4,95	4,825	97,47	2,70	2,748	101,78
4	27,00	27,547	102,03	4,95	4,778	96,53	3,30	3,351	101,55
5	33,00	33,470	101,42	4,05	3,953	97,60	2,70	2,801	103,47
6	33,00	33,520	101,58	4,05	3,834	94,67	3,30	3,377	102,33
7	33,00	33,713	102,16	4,95	4,750	95,96	2,70	2,784	103,11
8	33,00	33,750	102,27	4,95	4,750	95,96	3,30	3,376	102,30
Átlag			101,89			96,24			102,46
Szórás			0,252			0,954			0,666
Relatív szórás %			0,25			0,99			0,65
Megbízhatósági tartomány (P=0,95)			101,69—102,70			95,51—96,24			101,91—103,07

arra utal, hogy a komponensek között, ha kismértékben is, kölcsönhatás van. Ennek mértékéről tájékozódhatunk, ha a mérési adatokból szórásanalízist végzünk [126]. A szórásanalízis programok ma már a statisztikai programcsomagok szokásos részei.

A kísérlettervet háromszoros szórásanalízis programmal kiértékelve azokat az *F*-értékeket kapjuk, amelyek jellemzően mutatják, hogy egy-egy komponens hatása vagy két komponens közti kölcsönhatás a koncentráció mért értékét szignifikánsan befolyásolja-e. A program a matematikai statisztikában gyakran használt *F*-értéket számítja ki; a számítások eredményét a 4/4. táblázat mutatja.

4/4. táblázat. A kísérletterv értékelése háromszoros szórásanalízissel

Komponensek hatása	A visszanyerésből számított *F*-értékek		
	novamidazofen	koffein	drotaverin HCl
Főhatások:			
×(1) novamidazofen	12319**	5,36*	0,91
×(2) koffein	0,85	2747**	2,36
×(3) drotaverin HCl	9,48*	0,69	1845**
Kölcsönhatások:			
×(1)×(2)	0,53	4,18	1,65
×(1)×(3)	1,46	0,99	0,31
×(2)×(3)	0,99	0,99	0,20
×(1)×(2)×(3)	0,71	5,36*	0,96
$F(1,16)=4,49$;	$P=0,95$		

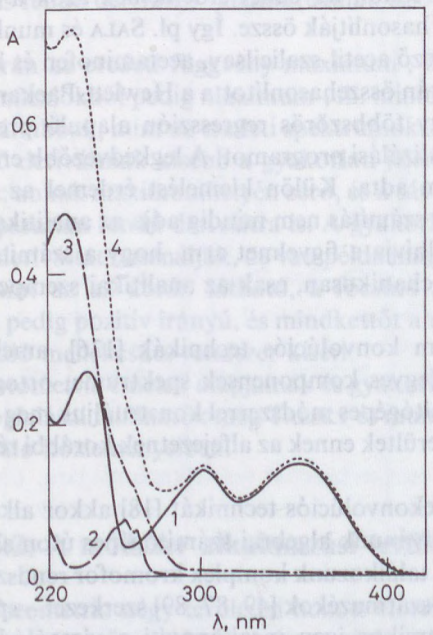
* szignifikáns

** erősen szignifikáns

A táblázat adatait értelmezve megállapíthatjuk, hogy a komponensek mért koncentrációját a saját beállított koncentrációjuk szignifikánsan befolyásolja, mégpedig olyan mértékben, hogy az erre a hatásra jellemző *F*-érték mindhárom komponensnél három nagyságrenddel nagyobb, mint a másik két komponens koncentrációjához, illetve a komponensek koncentrációja közti kölcsönhatáshoz tartozó *F*-érték. Nem lehet azonban teljesen figyelmen kívül hagyni, hogy vannak a táblázatban még olyan *F*-értékek, amelyek a szignifikanciaszint felett vannak: a koffein mért koncentrációját a novamidazofen koncentrációja, valamint a három komponens koncentrációjának kölcsönhatása szignifikánsan befolyásolja; feltehetően ennek tulajdonítható a beméréshez néhány százalékkal alacsonyabb visszamért érték; érdekes módon ugyancsak szignifikánsan befolyásolja a novamidazofen mért koncentrációját a drotaverin hidroklorid koncentrációja.

A fentieket figyelembe véve megállapíthatjuk, hogy a lineáris kombináción alapuló számítási módszer pontossága és reprodukálhatósága, valamint az eredmények megbízhatósági intervalluma alkalmasnak bizonyult a Quarelin tabletta komponenseinek meghatározására, bár az egyes komponensek mért mennyiségét a többi komponens koncentrációja kismértékben befolyásolja.

Bemutatjuk a módszer alkalmazását a Paniverin injekció meghatározására is [45]. Az injekció milliliterenként 40,0 mg fenazont, 32,1 mg drotaverin-hidrokloridot és 8,8



4/11. ábra. Spektrumok drotaverin-hidroklorid (*1*), nikotinsav (*2*) és fenazon (*3*) egymás melletti meghatározására Paniverin injekcióban (*4*). Oldószer: 0,1 M sósav. Koncentráció: drotaverin-hidroklorid 0,65 mg/100 ml; nikotinsav 0,82 mg/100 ml; fenazon 0,80 mg/100 ml.

(J. Géher, É. Szabó, J. Pharm. Biomed. Anal. **6**, 757 (1988) [45])

4/5. táblázat. A Paniverin injekció komponenseinek meghatározása

	Visszamérés (%)	Relatív szórás (%)	Megbízhatósági tartomány ($P=0,95$)
Fenazon	101,61	0,47	101,5—101,7
Drotaverin HCl	98,20	0,90	97,6—98,7
Nikotinsav	101,87	1,43	101,1—102,6

mg nikotinsavat tartalmaz, a komponensek aránya kb. 10 : 8 : 2,2. Az arány tehát kedvezőbb, mint a Quarelin tablettában. A meghatározás alapjául szolgáló spektrumokat a 4/11. ábrán mutatjuk be. A komponensek közül a Paniverinben a legkisebb mennyiségben jelen lévő nikotinsav visszanyerése kedvezőbb, mint a Quarelinben legkisebb mennyiségben lévő koffeiné (101,87%, ill. 96,24%); (lásd 4/5. táblázat).

4.4.3. Egyéb számítógépes módszerek

Két- és többkomponensű rendszerek spektrofotometriás analízisére a leírtakon kívül számos további számítógépes és szakértői rendszerrel kombinált [114] módszer áll rendelkezésre. Ezért külön figyelmet érdemelnek azok a közlemények, amelyek ezek teljesítőképességét hasonlítják össze. Így pl. Sala és munkatársai [105] az átfedő spektrumokkal rendelkező acetil-szalicilsav, acetaminofen és koffein 10 : 5 : 1 arányú elegyének vizsgálata során összehasonlította a Hewlett-Packard cég multikomponens analízis programját, egy többszörös regresszión alapuló programot, valamint egy szimplex iteratív optimalizálási programot. A legkedvezőbb eredményeket a többszörös regressziós program adta. Külön kiemelést érdemel az a megfigyelés, hogy a legjobb illeszkedést adó számítás nem mindig adja az analitikai szempontból legjobb eredményt. Ez ismét felhívja a figyelmet arra, hogy a számítástechnikai módszerek nem alkalmazhatók mechanikusan, csak az analitikai szempontok mérlegelésével és gondos ellenőrzéssel.

A különféle spektrum konvolúciós technikák [136], amelyek során különböző egyszerűbb görbékből (egyes komponensek spektruma, ortogonális és más polinomok stb.) algebrai-számítógépes módszerrel konstruáljuk meg a komplex spektrumokat, már bemutatásra kerültek ennek az alfejezetnek korábbi részében, valamint a 4.3. alfejezetben.

Az ezzel ellentétes, dekonvolúciós technikát [18] akkor alkalmazzuk, amikor egy bonyolult spektrumot kívánunk algebrai-számítógépes úton alkotóelemeire bontani. Ilyen feladattal gyakran találkozunk komplex kromofor rendszerrel rendelkező molekulák, pl. benzdiazepin-származékok [49, 87, 89] szerkezet—spektrum összefüggéseinek vizsgálata során, amikor igen megkönnyíti a vizsgálódást, ha a spektrumot Gauss-görbe jellegű elemeire bontjuk. A módszernek, amint azt az 5.3. fejezetben bemutatjuk, elsősorban nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiásan elválasztott anyagok csúcs homogenitás vizsgálata, ill. a nem megfelelően elváló csúcsok mennyiségi értékelése során van jelentősége.

Végül a digitális szűrési technikák [67], elsősorban a Kalman-szűrő [57, 59, 99] alkalmazását említjük meg háttérproblémák, ill. többkomponensű elegyek vizsgálatának kezelésére. Ezeknek a ma még szélesebb körben el nem terjedt módszereknek részletesebb tárgyalása meghaladná könyvünk kereteit.

4.5. Derivatív spektrofotometria

4.5.1. A módszer elvi alapjai

Mind a háttér korrekciója, mind pedig átfedő sávoknak a kvalitatív és kvantitatív analízis számára való elválasztása számára az utóbbi évtized legfontosabb fejleménye volt a derivatív spektrofotometria bevezetése a spektrofotometriás gyakorlatba.

Az elvét tekintve már viszonylag korán ismert módszer elterjedésére az adott lehetőséget, hogy a legutóbbi években könnyen hozzáférhetővé váltak olyan spektrofotométerek, amelyek eleinte elektronikus úton, majd mikrokomputer segítségével a spektrum felvételével egy időben képesek regisztrálni a spektrum különböző rendű deriváltjait is.

A 4/12. ábra *a* görbéin sematikusan ábrázoltunk egy idealizált Gauss-görbe típusú abszorpciós sávot (zérus rendű derivált), valamint annak első, második, harmadik és negyedik deriváltját.

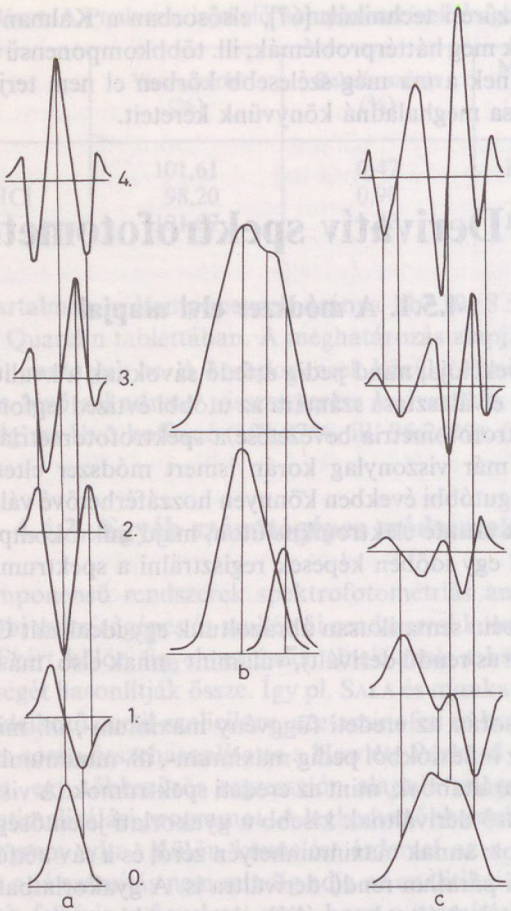
Mivel a deriválás során az eredeti függvény maximum-, ill. minimumhelyei zéró értéket vesznek fel, az inflexiókból pedig maximum-, ill. minimumhely lesz, a derivált görbék sokkal strukturáltabbak, mint az eredeti spektrumok. A viszonylag legegyszerűbben előállítható első deriváltnak kisebb a gyakorlati jelentősége; ez alig hasonlít az eredeti spektrumhoz: annak maximumhelyén zéró, és a sáv kétfelé szakad. Ugyanez vonatkozik a többi páratlan rendű deriváltra is. A gyakorlatban leggyakrabban a második és a negyedik deriváltat használják, de van példa magasabb rendű deriváltak felhasználására is. Amint az az ábrán látható, a főcsúcs a második deriváltban negatív, a negyedikben pedig pozitív irányú, és mindkettőt a rendűség növekedésével egyre bonyolultabbá váló mellékcsúcs-rendszer kíséri.

A derivatív spektrofotometria emléteti alapjainak és gyakorlati felhasználási lehetőségeinek kitűnő összefoglalásai találhatók meg Talsky és munkatársai [116], valamint Fell [37, 40] összefoglaló közleményeiben.

4.5.2. A módszer alkalmazási területei

A derivatív spektrofotometria négy területen hozott előrelépést a konvencionális (derivatív spektrofotometriás szövegekben gyakran zérórendűnek nevezett spektrumokon alapuló) spektrofotometriához viszonyítva:

1. Kvalitatív analízis. Amint azt már említettük, a derivatív spektrumok strukturáltabbak, mint az alapspektrumok, alkalmasak az utóbbiak minimális különbségeinek kihangsúlyozására, felnagyítására. Különösen érvényes ez izolált aromás gyűrűt

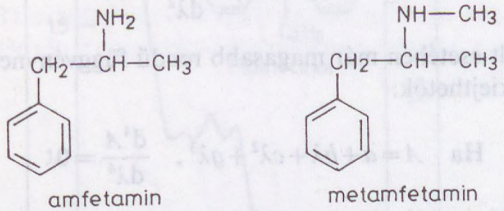


4/12. ábra. Derivált spektrumok.

a) Gauss-görbe alakú spektrum-sáv, valamint 1—4 rendű deriváltjai. *b)* Átfedő sáv kialakulása két különböző intenzitású Gauss-görbe alakú sávból. *c)* A *b)* szerinti összetett sáv, valamint 1—4 rendű deriváltjai. (G. Talsky, L. Mayring, H. Kreuzer, Angew. Chem. **17**, 785 (1978) [116])

tartalmazó anyagok finomszerkezettel rendelkező sávjára. Ennek a — nem különösebben elterjedt — alkalmazási lehetőségnek demonstrálására a 4/13. ábrán Lawrence és McNeil [75a] nyomán bemutatjuk amfetamin és metamfetamin spektrumait. Az *a* görbe mutatja az alapspektrumokat, amelyek különbsége olyan csekély, hogy az az ábrázolás során nem érzékeltethető. A *b* és *c* ábrán ábrázolt 2. derivált spektrumok is igen hasonlóak, bizonyos melléksávok intenzitásarányaiban azonban jellegzetes különbségek mutathatók ki. Az idézett dolgozat több más amfetamin-analóg kábítószer azonosítására is közöl ujjlenyomat jellegű spektrumokat. Sikerrel alkalmazták ezt a technikát az ugyancsak igen hasonló alapspektrummal rendelkező kannabinol és Δ^9-kannabinol megkülönböztetésére, sőt kvantitatív analízisére is

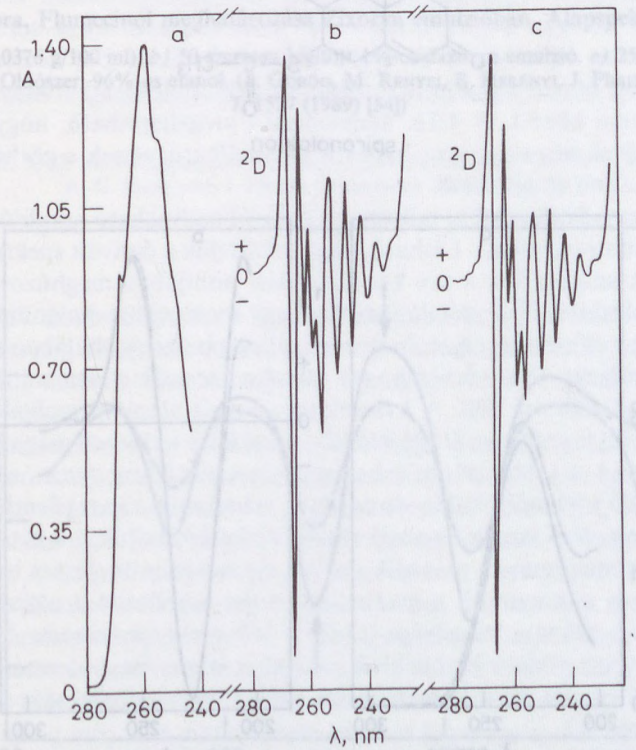
[75]. Mint érdekességet jegyezzük meg, hogy a második derivált spektrum még az izolált ketoncsoport kis intenzitású $n-\pi^*$ sávjának csekély finomszerkezetét is felerősíti, s ezt MEAL [82] felhasználta egyszerű ketonok azonosítására.



amfetamin metamfetamin

2. Monoton háttérspektrumok kiejtése a kvantitatív analízisben. A derivatív spektrofotometria egyik legfontosabb alkalmazási területe a háttérkorrekciónak a 4.3. fejezetben leírtaknál egyszerűbb és hatásosabb keresztülvitele. A deriválás szabályaiból következik, hogy a konstans hátteret már az első derivált eliminálja:

$$\text{Ha} \quad A = \text{const.}, \quad \frac{dA}{d\lambda} = 0 .$$



4/13. ábra. Amfetaminszármazékok azonosítása derivatív spektroszkópiával.

a) Amfetamin és fenil-etil-amin közös alapspektruma. *b)* Amfetamin 2. derivált spektruma. *c)* Fenil-etil-amin 2. derivált spektruma. Oldószer: 0,1 M nátrium-hidroxid. (A. H. LAWRENCE, J. D. MACNEIL, Anal. Chem. **54,** 2385 (1982) [75a])

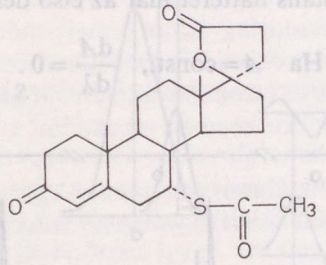
Amennyiben a háttér lineáris függvénye a hullámhossznak, a második derivált lesz zéró:

$$\text{Ha} \quad A = a + b\lambda\,, \quad \frac{d^2A}{d\lambda^2} = 0\,. \tag{4/22}$$

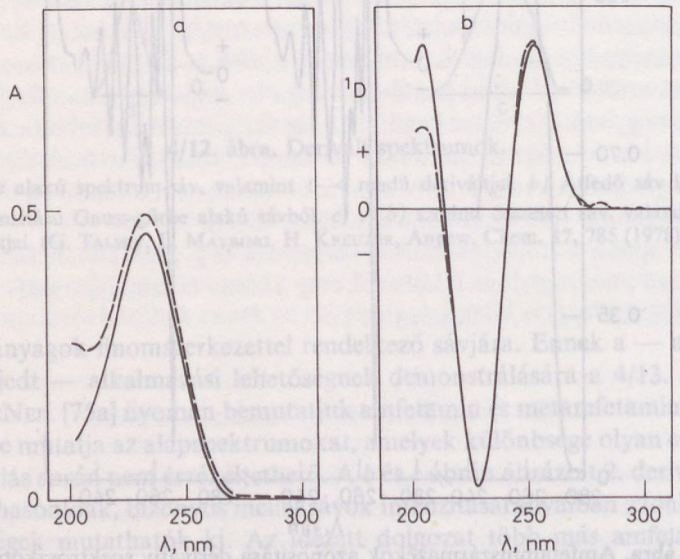
A negyedik derivált esetében már magasabb rendű függvénynek megfelelő monoton háttérgörbék is kiejthetők:

$$\text{Ha} \quad A = a + b\lambda + c\lambda^2 + g\lambda^3\,, \quad \frac{d^4A}{d\lambda^4} = 0\,. \tag{4/23}$$

Az egyszerűbb háttérproblémák megoldására gyakran már az első derivált felvétele is eredményes lehet, hiszen rövidebb szakaszra vonatkoztatva a háttér közelítőleg állandó. Ilyen eset pl. az UHLICK közleményéből [120] vett példa spironolakton

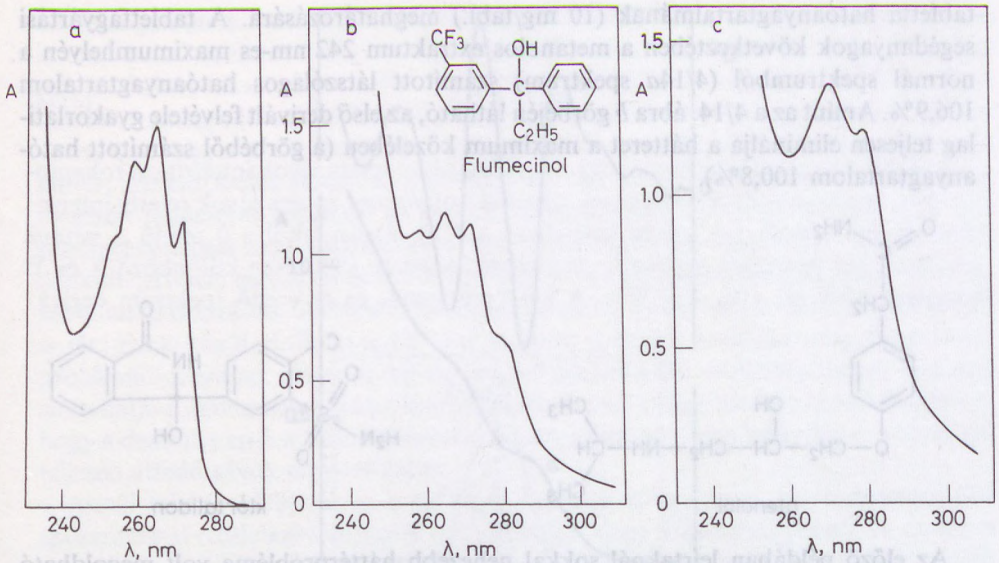


spironolakton



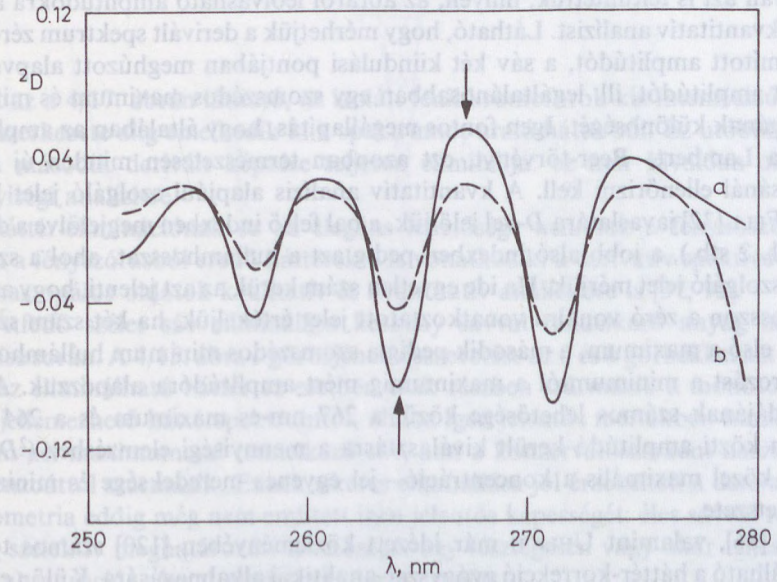
4/14. ábra. Spironolakton meghatározása tablettában derivatív spektrofotometriás módszerrel.

a) Alapspektrumok: ——— spironolakton 1 mg/100 ml – – – – – – – – tabletta extraktum; *b)* Az *a)* szerinti spektrumok 1. deriváltjai. Oldószer: metanol. (H. UHLICH, Krankenhauspharmazie **5**, 167 (1984) [120])



4/15. ábra. Flumecinol meghatározása Zixoryn emulzióban. Alapspektrumok

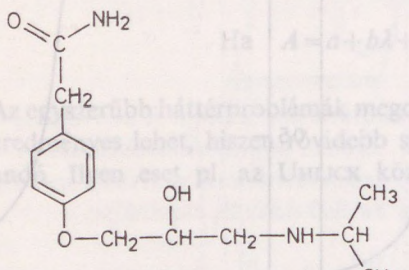
a) Flumecinol (0,0376 g/100 ml). *b)* 50-szeresen hígított 1%-os Zixoryn emulzió. *c)* 25-szörösen hígított placebó emulzió. Oldószer: 96%-os etanol. (S. Görög, M. Rényei, B. Herényi, J. Pharm. Biomed. Anal. 7, 1527 (1989) [54])



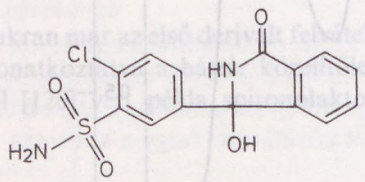
4/16. ábra. Flumecinol meghatározása Zixoryn emulzióban. Derivált spektrumok

a) A 15. ábra *a* görbéjének 2. deriváltja. *b)* A 15. ábra *b* görbéjének 2. deriváltja. (Forrás: lásd 4/15. ábra)

tabletta hatóanyagtartalmának (10 mg/tabl.) meghatározására. A tablettagyártási segédanyagok következtében a metanolos extraktum 242 nm-es maximumhelyén a normál spektrumból (4/14*a* spektrum) számított látszólagos hatóanyagtartalom 106,9%. Amint az a 4/14. ábra *b* görbéjén látható, az első derivált felvétele gyakorlatilag teljesen eliminálja a hátteret a maximum közelében (a görbéből számított hatóanyagtartalom 100,8%).



atenolol

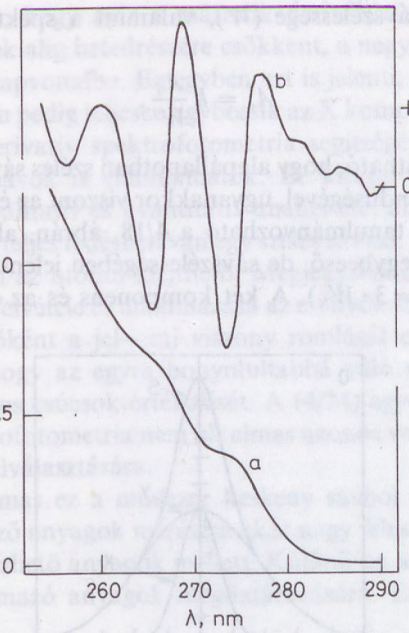


klórtalidon

Az előző példában leírtaknál sokkal nehezebb háttérprobléma volt megoldható flumecinolnak Zixoryn olajos emulzióban való meghatározása során a második derivált spektrum segítségével. A Görög és munkatársai [54] közleményéből vett 4/15. ábra *a* és *b* görbéiből látható a mélyreható különbség a hatóanyag és a készítmény spektrumai között. A 4/16. ábra alapján megállapítható, hogy a 2. derivált görbe segítségével még ez az erős háttér is eliminálható: ennek a görbének alapján a mennyiségi analízis elvégezhető.

Az ábrán azt is feltüntettük, milyen, az ábráról leolvasható amplitúdókra alapozhatjuk a kvantitatív analízist. Látható, hogy mérhetjük a derivált spektrum zéróvonalától számított amplitúdót, a sáv két kiindulási pontjában meghúzott alapvonaltól számított amplitúdót, ill. legáltalánosabban egy szomszédos maximum és minimum magasságának különbségét. Igen fontos megállapítás, hogy általában az amplitúdók követik a Lambert—Beer-törvényt, ezt azonban természetesen minden új feladat megoldásánál ellenőrizni kell. A kvantitatív analízis alapjául szolgáló jelet Fasanmade és Fell [32] javaslatára *D*-vel jelöljük, a bal felső indexben megjelölve a derivált rendjét (1, 2 stb.), a jobb alsó indexben pedig azt a hullámhosszat, ahol a számítás alapjául szolgáló jelet mérjük. Ha ide egyetlen szám kerül, az azt jelenti, hogy az adott hullámhosszon a zéró vonalra vonatkoztatott jelet értékeljük, ha két szám szerepel, akkor az első a maximum, a második pedig a szomszédos minimum hullámhossza; a meghatározást a minimumtól a maximumig mért amplitúdóra alapozzuk. A 4/16. ábra példájának számos lehetősége közül a 267 nm-es maximum és a 264 nm-es minimum közti amplitúdó került kiválasztásra a mennyiségi elemzéshez ($^2D_{267,264}$), mivel itt közel maximális a koncentráció—jel egyenes meredeksége és minimális a tengelymetszete.

Milch [86], valamint Uhlich már idézett közleményében [120] számos további példa található a háttér-korrekció gyógyszer-analitikai alkalmazására. Külön említést érdemel Hassan és Davidson [61] módszere atropin tabletta hatóanyagtartalmának mérésére tetrafenil-borátos leválasztás, majd a csapadék diklór-etános oldása után.



4/17. ábra. Atropin meghatározása tetrafenil-borátja alakjában derivatív spektrofotometriás módszerrel.

a) Alapspektrum, *b)* 2. derivált spektrum. Oldószer: diklór-etán; $c = 1{,}727 \cdot 10^{-4}$ M. (S. M. Hassan, A. G. Davidson, J. Pharm. Pharmacol. **36,** 7 (1984) [61])

Amint az a 4/17. ábrán látható, az izolált fenil kromoforok kis intenzitású sávjának finomszerkezete alig emelkedik ki a spektrumot uraló háttérből. Ez utóbbit azonban már a második derivált képzése teljesen eliminálja: ez már kiválóan alkalmas a mennyiségi analízisre.

A háttér-eliminációnak ez az elegáns lehetősége nemcsak a fényabszorpcióból, hanem a fényszórásból eredő hátterekre is vonatkozik: a derivatív spektrofotometria alkalmas opálos oldatok kvalitatív és kvantitatív analízisére is [37, 95].

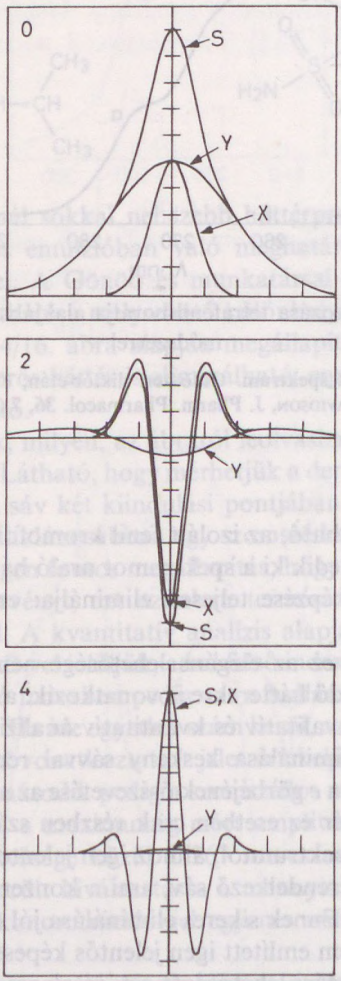
3. Átfedő széles sáv eliminálása keskeny sávval rendelkező anyag mennyiségi analízise során. A 4/15. ábra *c* görbéjének összevetése az *a* és *b* görbékkel azt tanúsítja, hogy az eliminálható háttér ez esetben csak részben származik a monoton leszálló ággal jellemezhető háttérspektrumtól, ahhoz igen jelentős mértékben hozzájárul egy 271 nm-nél maximummal rendelkező sáv, ami a konzerválószerként használt nátrium-benzoáttól származik. Ennek sikeres eliminálása jól érzékelteti a derivatív spektrofotometria eddig még nem említett igen jelentős képességét: éles sávval rendelkező anyag szelektív meghatározási lehetőségét egy részlegesen vagy akár teljesen átfedő széles abszorpciós sávval rendelkező anyag mellett.

A derivatív spektrofotometria alapvetően fontos egyenlete ui. összefüggést állapít meg az *n*-ed rendű derivatív spektrum sávintenzitása (A_n), a zéró-rendű spektrum

sávintenzitása (A_0) és sávszélessége (W), valamint a spektrum rendűsége (n) között:

$$A_n = k \frac{A_0}{W^n}. \qquad (4/24)$$

A (4/24) egyenletből látható, hogy alapállapotban széles sávok intenzitása rohamosan csökken a derivált rendűségével, ugyanakkor viszont az éles sávok relatív intenzitása nő. Ez a hatás jól tanulmányozható a 4/18. ábrán, ahol a 0 rendű S jelzésű spektrum két pontosan egybeeső, de sávszélességében jelentősen különböző X és Y komponensből áll: ($W_Y = 3 \cdot W_X$). A két komponens és az eredő spektrum deriválá-

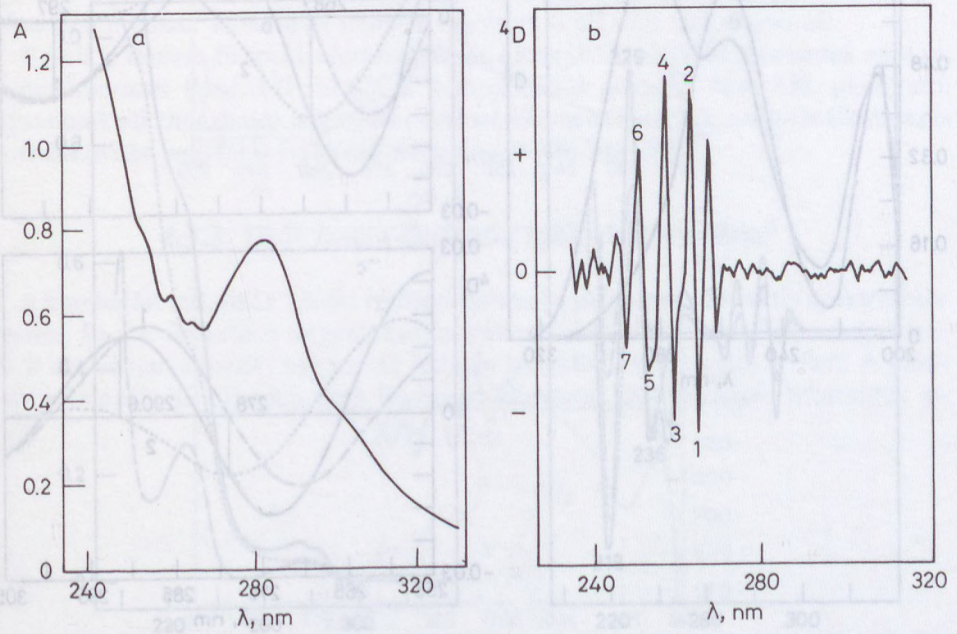


4/18. ábra. Széles sáv *(Y)* eliminálása a vele egybeeső keskeny sáv (X) mérése során a 2. és 4. derivált spektrumok alkalmazásával ($S = X + Y$).

(A. F. Fell, in Amino Acid Analysis (J. M. Rattenbury, Ed.) Ellis-Horwood—John Wiley, Chichester —New York 1981, 86—118. old. [38])

lását elvégezve látható, hogy már a második deriváltban a széles Y komponens intenzitása az eredetinek alig hetedrészére csökkent, a negyedik deriváltja pedig már teljesen beleolvad az alapvonalba. Ez egyben azt is jelenti, hogy a második rendben csaknem, a negyedikben pedig teljesen egybeesik az X komponens és az eredő *S* görbe deriváltja, vagyis a derivatív spektrofotometria segítségével nemcsak a monoton háttér, hanem széles sávok is eliminálhatók. Ez kitűnő lehetőséget teremt olyan összetett rendszerek kvalitatív és kvantitatív analízisére, ahol egy éles sáv vagy sávrendszer részleges vagy teljes fedésben van egy széles sávval. Megfelelően magas rendű derivált felvétele esetén az utóbbi kiejthető. Megjegyzendő azonban, hogy a magasabb rendű deriváltak felvétele és alkalmazása az előnyök mellett számos nehézséggel is jár. Ezek közül elsőként a jel—zaj viszony romlását említjük meg. Ugyancsak problémát jelenthet, hogy az egyre bonyolultabbá váló mellékmaximum-rendszer zavarhatja a szomszédos csúcsok értékelését. A (4/24) egyenletből is az következik, hogy a derivatív spektrofotometria nem alkalmas azonos vagy hasonló sávszélességű, teljesen átfedő sávok elválasztására.

Annál inkább alkalmas ez a módszer keskeny sávból vagy sávrendszerből álló spektrummal rendelkező anyagok mérésére akár nagy feleslegben jelenlevő, de széles elnyelési sávval jellemezhető anyagok mellett. Különösen alkalmas a módszer izolált fenil kromofort tartalmazó anyagok meghatározására. Erre látható példa a 4/19.

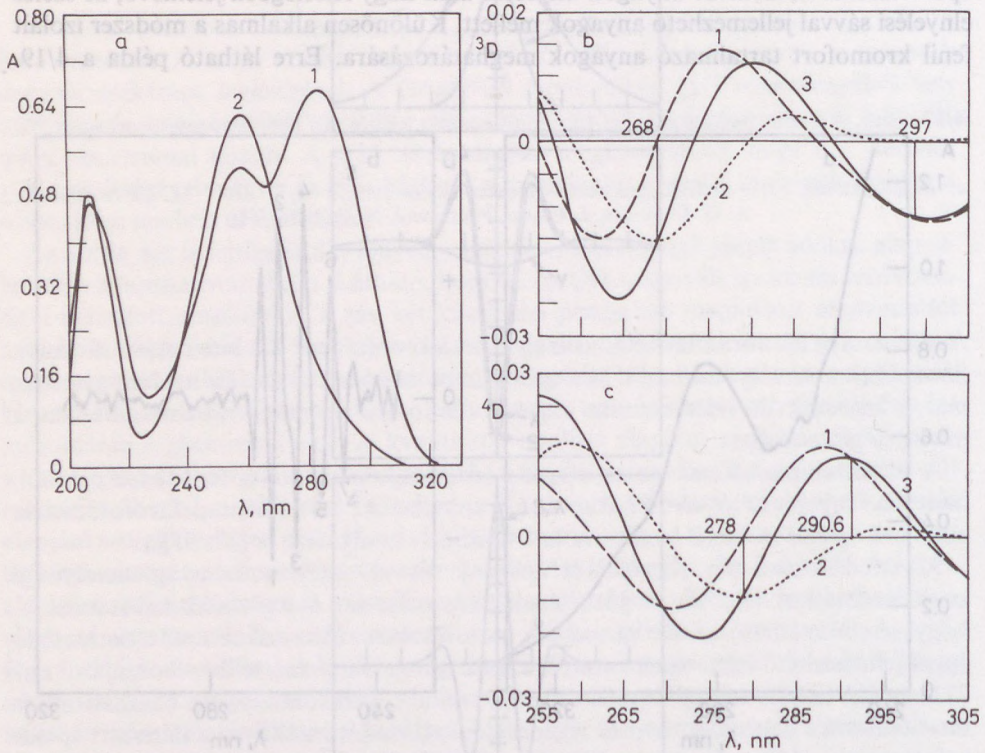


4/19. ábra. ψ-Efedrin meghatározása szirupkészítményben derivatív spektrofotometriás módszerrel.

a) ψ-Efedrint, kodein-foszfátot és triprolidint tartalmazó szirup alapspektruma híg sósavban többszörös extrakcióval való tisztítás után; *b)* Negyedik derivált spektrum. (A. G. Davidson, H. Elsheikh, Analyst **107**, 879 (1982) [26])

ábrán, ahol DAVIDSON és ELSHEIKH [26] módszerét mutatjuk be ψ-efedrin meghatározására szirupkészítményben triprolidin-hidroklorid és kodein-foszfát jelenlétében. Az *a* görbén látható, hogy a ψ-efedrin izolált aromás gyűrűjének csekély intenzitású, de éles sávrendszerből álló α-sávja éppen csak felismerhető a spektrum minimumhelyén. A *b* ábrán látható negyedik derivált már csupán a ψ-efedrinre jellemző, a zérórendű spektrumot uraló két intenzív és széles sávot sikerült eliminálni. Ennek a módszernek a relatív standard deviációja 0,5 és 1% között van; ez azt mutatja, hogy a derivatív módszerek pontossága hasonló a zérórendű spektrofotometriás módszerekéhez. Ahhoz azonban, hogy ezt elérhessük, a kísérleti körülményeket gondosan optimálni kell. Említést érdemel pl., hogy a derivatív spektrumok hőmérséklettől való függése többszöröse a zérórendű spektrumoknál észlelhető függésnek [25].

4. Két- vagy többkomponensű rendszerek analízise derivatív spektrofotometria és algebrai módszerek kombinációjával. A 4/18. ábra *b* részében két részlegesen átfedő ideális Gauss-görbe alakú sáv eredő görbéjét, valamint annak 1—4 rendű deriváltjait mutatja be. Látható, hogy a 2—4 rendű derivált görbék esetén megvalósul a két sáv

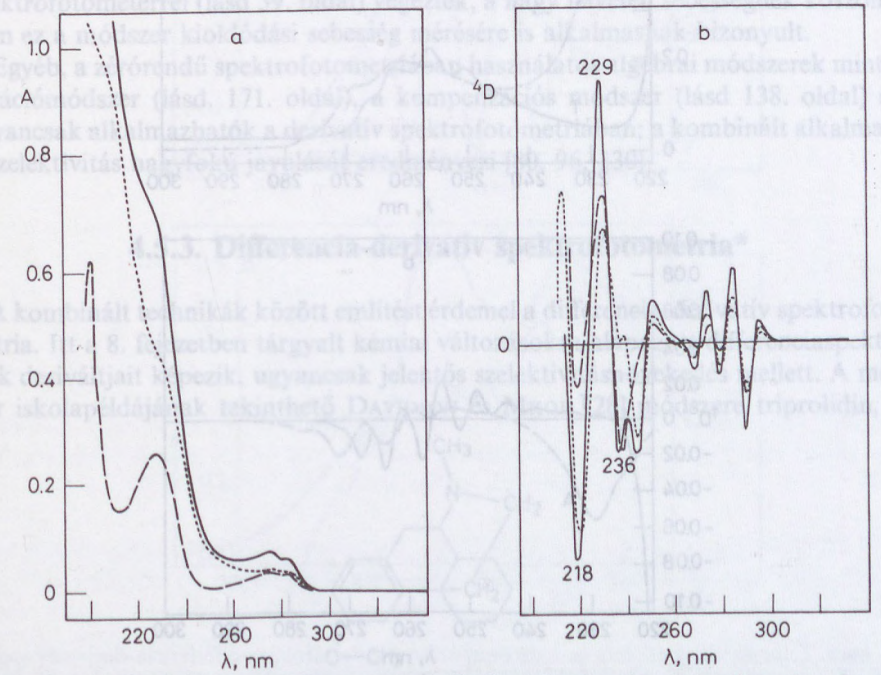


4/20. ábra. Szulfanilamid és szulfatiazol egymás melletti meghatározása derivatív spektrofotometriás módszerrel.

a) Alapspektrumok. *b)* 3. derivált spektrumok. *c)* 4. derivált spektrumok. *1.* Szulfatiazol, *2.* szulfanilamid, *3.* keverék. Oldószer: etanol—víz 1 : 9, pH 4,5. (J. J. BERZAS NEVADO, F. SALINAS. I. DE ORBE PAYA, L. F. CAPITAN-VALLVEY, J. Pharm. Biomed. Anal. **9**, 117 (1991) [16])

szétválasztása, amit ki lehet használni a két komponens kvantitatív analízisére. Így lehetőség nyílik olyan sávok elválasztására is a kvantitatív analízis számára, amelyek alapállapotban nem teszik lehetővé a Vierordt-módszer alkalmazását. A gyakorlatban a mérés alapjául szolgáló sávok általában nem tekinthetők szigorúan vett Gauss-görbéknek, s így ez a tiszta sávszétválasztás csak ritkán valósul meg. A derivált spektrumok (különösen a magasabb rendű deriváltak) erősen strukturált voltukból következően számos pozitív és negatív maximumhellyel rendelkeznek. Így gyakran könnyűszerrel lehet olyan hullámhosszakat találni, ahol a meghatározandó komponens derivált jele maximális vagy ahhoz közeli érték, a másiké viszont zéró és viszont. Ezeken a hullámhosszokon az egyes komponensek szelektív meghatározása végezhető el. Ha ilyen hullámhosszpárt nem lehet találni, az algebrai módszerek alkalmazása akkor is sokkal jobb lehetőségeket teremt a meghatározásra, mint az alapspektrumok esetében. A következőkben mindkét megoldásra bemutatunk jellemző példákat.

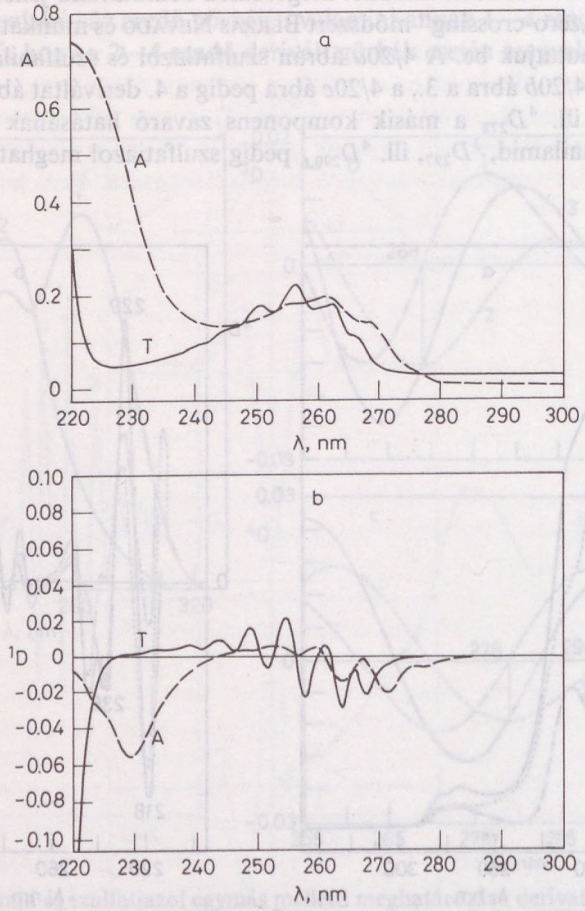
Az első, ún. „zero-crossing" módszert Berzas Nevado és munkatársai [16] módszerén keresztül mutatjuk be. A 4/20*a* ábrán szulfatiazol és szulfanilamid spektrumait mutatjuk be, a 4/20*b* ábra a 3., a 4/20*c* ábra pedig a 4. deriváltat ábrázolja. Amint az látható, $^3D_{268}$, ill. $^4D_{278}$ a másik komponens zavaró hatásának kiküszöbölésével alkalmas szulfanilamid, $^3D_{297}$, ill. $^4D_{290,6}$ pedig szulfatiazol meghatározására.



4/21. ábra. Atenolol és klórthalidon egymás melletti meghatározása derivatív spektrofotometriás módszerrel.

a) Alapspektrumok; *b)* 4. derivált spektrumok. — — — — Atenolol – – – – – – Klórthalidon ——— 1 : 1 arányú elegy. Oldószer: 95%-os etanol. (C. Vetuschi, G. Ragno, Int. J. Pharm. **65**, 177 (1990) [121])

A 4/20. ábra *b* és *c* görbéivel kapcsolatban meg kell jegyezni, hogy ezek — látszólagos ellentétben a korábban leírtakkal — távolról sem olyan strukturáltak, mint ezt az ismertetett elvek alapján egy 3. és 4. derivált spektrumtól el lehetne várni. Ennek oka az, hogy a deriválás ($\Delta A/\Delta\lambda$ képzés) alapjául a szerzők ez esetben igen nagy $\Delta\lambda$-értéket választottak (a 3. rendű derivált esetében 28, a 4. rendű esetében pedig 54 nm). A derivatív spektrumok alakja hasonlóképpen, de fokozott mértékben befolyásolható a $\Delta\lambda$-értékkel, mint az alapspektrum a résszélességgel (lásd 2.11. fejezet). Az eddig tett megállapításaink 1 nm nagyságrendű $\Delta\lambda$-értékekre vonatkoznak. A derivált spektrumok „simítása" $\Delta\lambda$ növelésével bizonyos esetekben kifejezetten előnyös lehet a kvantitatív analízis szempontjából, $\Delta\lambda$ azonban általánosságban is fontos paraméter a derivatív spektrofotometriában, amelynek optimalizálása jelentősen növelheti a módszer szelektivitását, ill. a kvantitatív módszer pontosságát.



4/22. ábra. ψ-Efedrin-hidroklorid és klórfeniramin-maleát egymás melletti meghatározása gyógyszerkészítményekben derivatív spektrofotometriás módszerrel.

a) Alapspektrumok. *b)* 1. derivált spektrumok. — — — — Klórfeniramin-maleát ——— ψ-Efedrin · HCl. Oldószer: víz. (J. M. Hoover, R. A. Soltero, P. C. Bansal, J. Pharm. Sci. **76,** 242 (1987) [63])

Az algebrai módszerek alkalmazásának illusztrálásaként először VETUSCHI és RAGNO [121] módszerét mutatjuk be atenolol és klórthalidon egymás melletti meghatározására. A 4/21*a* ábrán látható, igen hasonló spektrumok 4. deriváltjaiból 236 nm-nél csekély tengelymetszet mellett szelektíven meg lehet határozni az atenolol koncentrációját:

$$c_{\text{atenolol}} = 0{,}1060 \cdot {}^4D_{236} + 0{,}6575 \qquad r = 0{,}99995 . \tag{4/25}$$

A klórthalidon meghatározását a 229 és 218 nm közötti amplitúdóból a következő egyenlettel számíthatjuk ki:

$$c_{\text{klórthalidon}} = 0{,}03903 \cdot {}^4D_{229,218} - 0{,}06604 \cdot {}^4D_{236} \qquad r = 0{,}99988 . \tag{4/26}$$

A koncentrációk mg/dm^3, ^4D pedig a spektrumokon mm-ben leolvasott értékekben értendők.

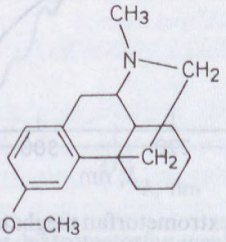
A sokhullámhosszas komputeres módszerek bevezetése (lásd 140. oldal) ezen a területen is igen komoly előrelépést jelenthet. Ennek illusztrálására bemutatjuk HOOVER és munkatársai [63] módszerét ψ-efedrin-hidroklorid és klórfeniramin-maleát egymás melletti meghatározására tabletta készítményekben.

A 4/22*a* ábrán látható, igen hasonló alapspektrumok még nem, de a 4/22*b* ábrán látható első derivált spektrumok már lehetővé teszik megfelelő program segítségével a két komponens egymás melletti meghatározását. Mivel a vizsgálatokat diódasoros spektrofotométerrel (lásd 39. oldal) végezték, a nagy felvételi sebességnek köszönhetően ez a módszer kioldódási sebesség mérésére is alkalmasnak bizonyult.

Egyéb, a zérórendű spektrofotometriában használatos algebrai módszerek mint pl. a rációmódszer (lásd. 171. oldal), a kompenzációs módszer (lásd 138. oldal) stb. ugyancsak alkalmazhatók a derivatív spektrofotometriában; a kombinált alkalmazás a szelektivitás nagyfokú javulását eredményezi [80, 96, 130].

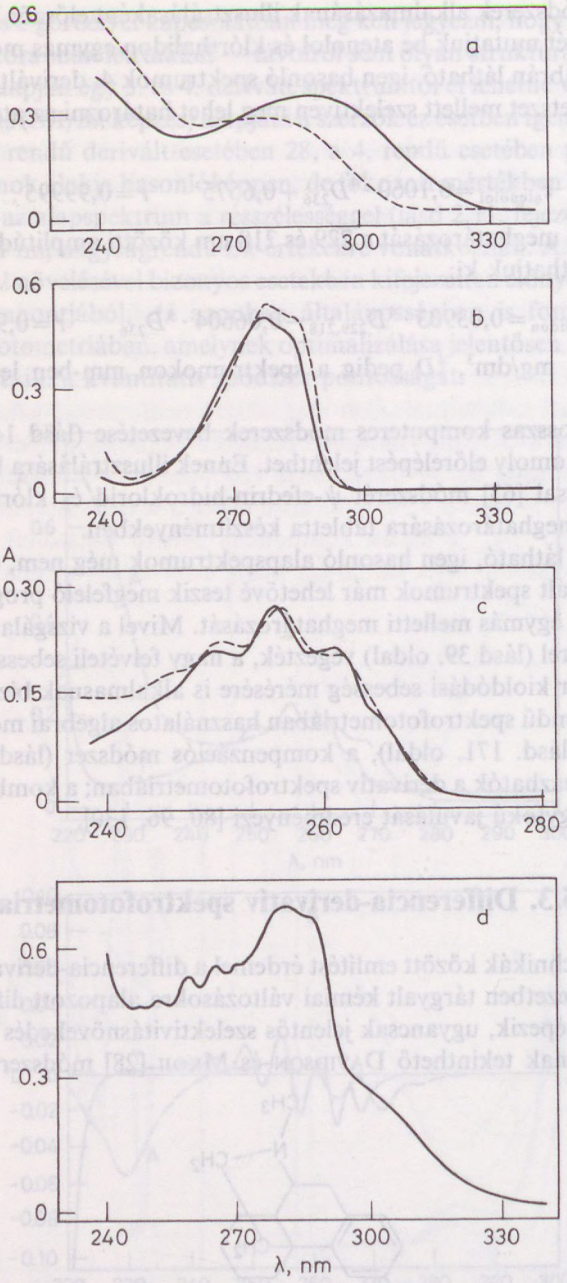
4.5.3. Differencia-derivatív spektrofotometria*

A kombinált technikák között említést érdemel a differencia-derivatív spektrofotometria. Itt a 8. fejezetben tárgyalt kémiai változásokra alapozott differenciaspektrumok deriváltjait képezik, ugyancsak jelentős szelektivitásnövekedés mellett. A módszer iskolapéldájának tekinthető DAVIDSON és MKOJI [28] módszere triprolidin, ψ-



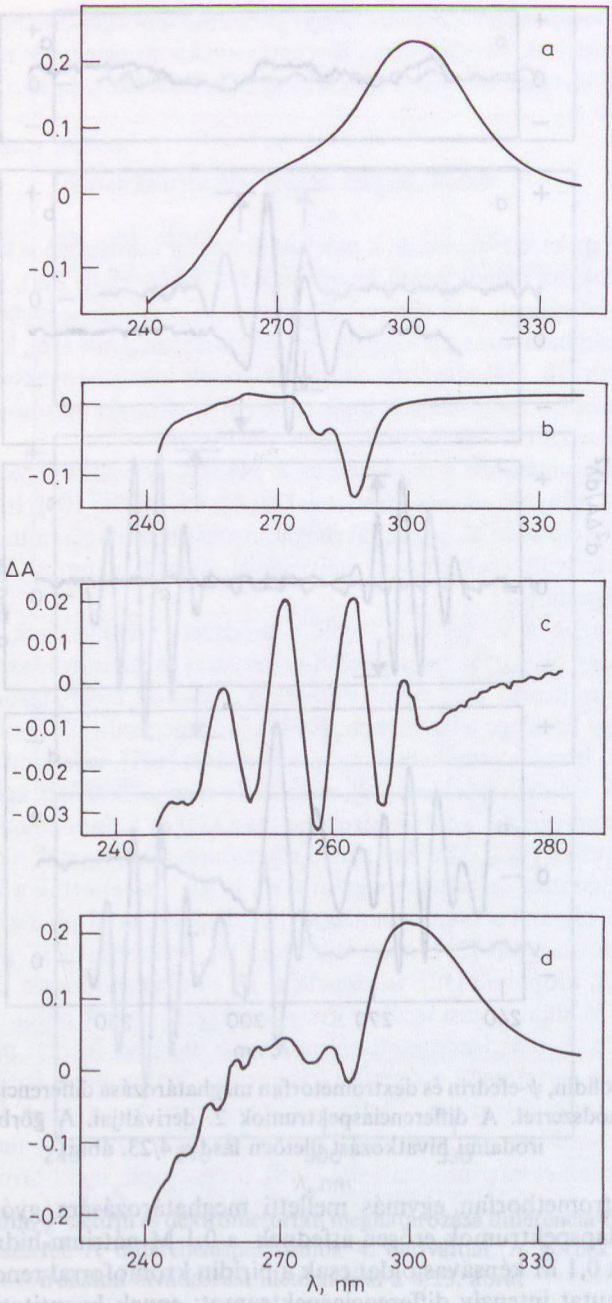
dextrometorphan

* Magát a differencia-spektrofotometriát részben nagy jelentősége miatt, főként pedig azért, mivel ez a módszer a 6. és 7. fejezetben bemutatandó kémiai reakciókon alapul, a 8. fejezetben külön tárgyaljuk.

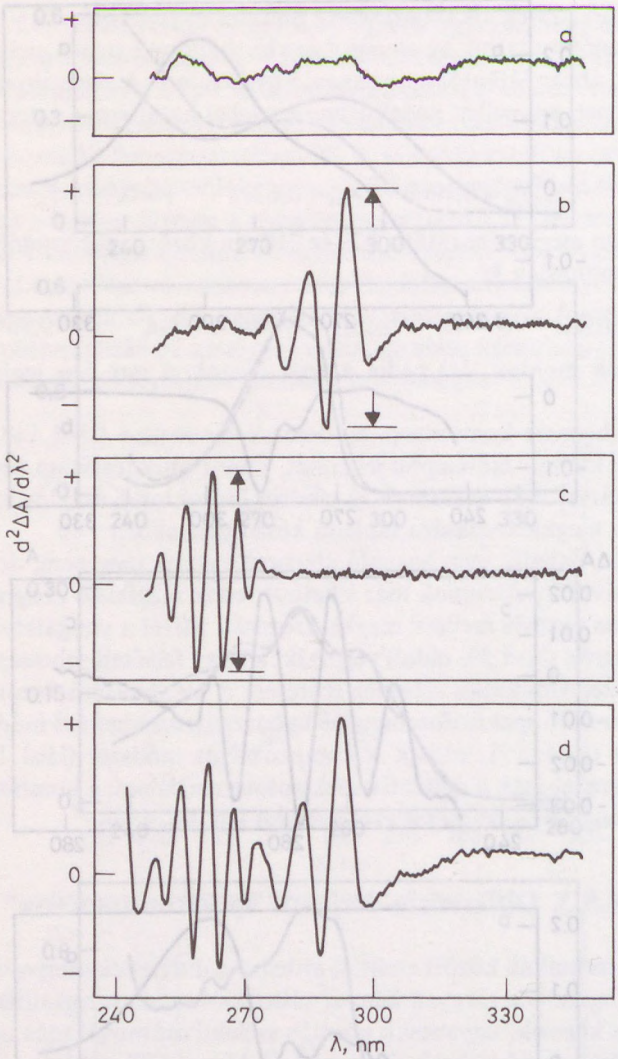


4/23. ábra. Triprolidin, ψ-efedrin és dextrometorfan meghatározása differencia-derivatív spektrofotometriás módszerrel. Alapspektrumok.

a) Triprolidin-hidroklorid 12,5 mg/liter. *b)* Dextrometorfan-hidrobromid 100 mg/liter. *c)* ψ-Efedrin-hidroklorid 300 mg/liter. *d)* Kombinált készítmény ——— 0,1 M kénsavas oldat, – – – – – – – – – 0,1 M nátrium-hidroxidos oldat. (A. G. Davidson, M. M. Mkoji, J. Pharm. Biomed. Anal. **6**, 449 (1988) [28])

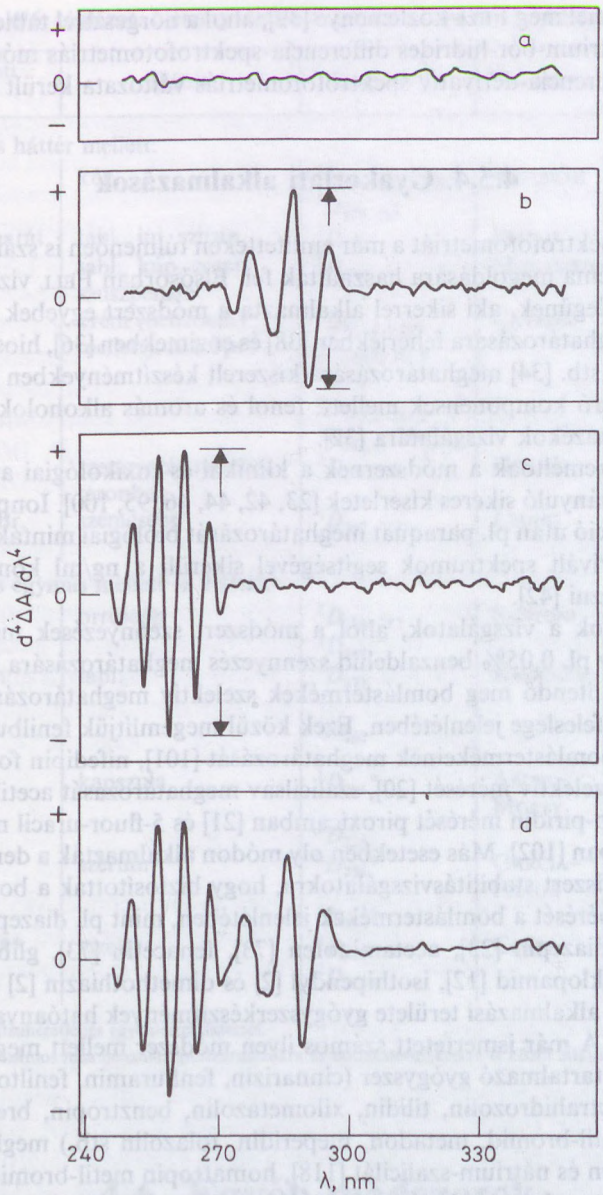


4/24. ábra. Triprolidin, ψ-efedrin és dextrometorfan meghatározása differencia-derivatív spektrofotometriás módszerrel. Differenciaspektrumok. A 0,1 M nátrium-hidroxidos oldattal szemben felvett 0,1 M kénsavas oldatok. A görbék jelzését és az irodalmi hivatkozást illetően lásd a 4/23. ábrát



4/25. ábra. Triprolidin, ψ-efedrin és dextrometorfan meghatározása differencia-derivatív spektrofotometriás módszerrel. A differenciaspektrumok 2. deriváltjai. A görbék jelzését és az irodalmi hivatkozást illetően lásd a 4/23. ábrát

efedrin és dextromethorfan egymás melletti meghatározására gyógyszerkészítményekben. Az alapspektrumok erősen átfednek, a 0,1 M nátrium-hidroxidos oldattal szemben felvett 0,1 M kénsavas oldat csak a piridin kromoforral rendelkező triprolidin esetében mutat intenzív differenciaspektrumot: ennek kvantitatív analízise 301 nm-nél elvégezhető. A másik két anyagnál, ahol a protonált nitrogén az aromás gyűrűtől távol helyezkedik el, a differenciaspektrumok intenzitása csekély ugyan, de igen strukturált voltuk miatt kiválóan alkalmasak a deriválásra. A három anyag keverékének második, különösen pedig a negyedik derivált spektrumából a széles



4/26. ábra. Triprolidin, ψ-efedrin és dextrometorfan meghatározása differencia-derivatív spektrofotometriás módszerrel. A differenciaspektrumok 4. deriváltjai. A görbék jelzését és az irodalmi hivatkozást illetően lásd a 4/23. ábrát

sávú differenciaspektrummal rendelkező triprolidin hozzájárulása kiesik, és könnyen lehetett találni olyan hullámhossz-párokat, ahol a ψ-efedrin és a dextromethorfan egymás melletti meghatározása egymás zavaró hatásának teljes kiküszöbölésével elvégezhető. A leírtak a 4/23—4/26. ábrákon tanulmányozhatók.

Említést érdemel még FELL közleménye [39], ahol a norgesztrel tabletta hatóanyag-tartalmának nátrium-bór-hidrides differencia-spektrofotometriás módszerének (lásd 8.4. fejezet) differencia-derivatív spektrofotometriás változata került bemutatásra.

4.5.4. Gyakorlati alkalmazások

A derivatív spektrofotometriát a már említetteken túlmenően is számos gyógyszer-analitikai probléma megoldására használták fel. Elsősorban FELL vizsgálatai tekinthetők úttörő jellegűnek, aki sikerrel alkalmazta a módszert egyebek között aromás aminosavak meghatározására fehérjékben [38] és enzimekben [36], hioszcin-hidrobromid, pilokarpin stb. [34] meghatározására kiszerelt készítményekben konzerválószerek és más zavaró komponensek mellett, fenol és aromás alkoholok [35], valamint fenotiazin-származékok vizsgálatára [32].

Igen figyelemreméltóak a módszernek a klinikai és toxikológiai analízisben való alkalmazására irányuló sikeres kísérletek [23, 42, 44, 46, 95, 100]. Ionpár-extrakció és ditionitos redukció után pl. paraquat meghatározását biológiai mintákban a második és negyedik derivált spektrumok segítségével sikerült a ng/ml koncentrációtartományban elvégezni [42].

Érdekesek azok a vizsgálatok, ahol a módszert szennyezések meghatározására alkalmazták, így pl. 0,05% benzaldehid szennyezés meghatározására benzil-alkoholban [30]. Itt említendő meg bomlástermékek szelektív meghatározása a bomlatlan gyógyszer nagy feleslege jelenlétében. Ezek közül megemlítjük fenilbutazon oxidatív és hidrolitikus bomlástermékeinek meghatározását [101], nifedipin fotokémiai bomlástermékének szelektív mérését [20], szalicilsav meghatározását acetil-szalicilsavban [68, 81], 2-amino-piridin mérését piroxicamban [21] és 5-fluor-uracil meghatározását 5-fluorocytosinban [102]. Más esetekben oly módon alkalmazták a derivatív spektrofotometriás módszert stabilitásvizsgálatokra, hogy biztosították a bomlatlan hatóanyag szelektív mérését a bomlástermékek jelenlétében, mint pl. diazepam, oxazepam [1], egyéb benzdiazepin [23], acetaminofen [73], fenacetin [73], glibenklamid [12], mebeverin [12], klopamid [12], isothipendyl [2] és dimethothiazin [2] esetében.

A módszer fő alkalmazási területe gyógyszerkészítmények hatóanyag-tartalmának meghatározása. A már ismertetett számos ilyen módszer mellett megemlítjük több, fenil kromofort tartalmazó gyógyszer (cinnarizin, fenfluramin, feniltoloxamin, dextropropoxifen, tetrahidrozolin, tilidin, xilometazolin, benztropin, bretylium tozilát, szkopolamin butil-bromid, metadon, meperidin, tolazolin stb.) meghatározását [3, 27], acetaminofen és nátrium-szalicilát [118], homatropin metil-bromid [71], nátrium fusidát [60], oxprenolol és klórthalidon [123], nátrium-szalicilát, koffein, metronidazol benzoát, diazepám, klorokin foszfát, paracetamol stb. [31], tiamfenikol glicinat [94], szalbutamol [58], valamint cilistatin nátrium [43], metadon, orfenadrin [19] meghatározását különböző gyógyszerkészítményekben. Néhány újabban publikált módszer főbb jellemzőit a 4/6. táblázatban foglaltuk össze.

Számos további derivatív spektrofotometriás módszer a 10. fejezet egyes alfejezeteiben kerül bemutatásra, ill. megemlítésre.

4/6. táblázat. Néhány derivatív spektrofotometriás módszer

Meghatározott vegyület	Mátrix	Derivatív jel	Első szerző	Évszám	Irodalom
Egy komponens háttér mellett:					
Cloctofol	kúp	$^2D_{298,\ 286}$ vagy $^3D_{289,\ 301}$	VETUSCHI	1988	[122]
Klemasztin fumarát	tabl., inj. szirup	$^2D_{272}$	BEDAIR	1988	[13]
Domperidon	tabl., kúp, csepp szuszpenzió	$^1D_{294}$	MOHAMED	1989	[88]
Mikonazol	krém (benzoesav mellett), hintőpor	$^2D_{285,2\ 280,8}$ $^2D_{280,8,\ 282,8}$ $^3D_{274}$	CAVRINI	1989	[22]
Ekonazol		$^2D_{285,2,\ 281,2}$ $^3D_{282,8}$, $^3D_{279,6}$			
Mesztranol	szennyezés noretisz-teronban	$^2D_{291,\ 287}$	GÖRÖG	1989	[54]
Homatropin HBr, atropin szulfát	szemcsepp	$^2D_{257,\ 254}$	LEUNG	1991	[77]
Két komponens egymás mellett + háttér:					
Nafazolin	orrcsepp	$^2D_{288,\ 282}$	SANTONI	1989	[106]
Difenhidramin		$^2D_{249}$			
Tranylcypromin szulfát	tabl.	$^4D_{271}$	KNOCHEN	1989	[70]
Trifluoperazin dihidroklorid		$^1D_{262}$			
Amoxicillin	kapszula	$^1D_{234}$*	ABDEL-MOETY	1991	[4]
Dikloxacillin		$^1D_{225}$			
Imipramin	szérum	$^2D_{254}$*	GARCIA-FRAGA	1991	[44]
Amitriptilin		$^2D_{268}$*			
Klórdiazepoxid**	vizelet	$^2D_{309}$	CORTI	1991	[23]
Oxazepam		$^2D_{316,2}$			

* Kiértékelés kétismeretlenes egyenletrendszerrel.

** A közlemény számos más benzdiazepinszármazékra és bomlástermékeikre is közöl adatokat.

4.6. Egyéb módszerek

4.6.1. A ráció módszer kétkomponensű rendszerek vizsgálatára

Kétkomponensű rendszerek két hullámhosszon való mérését gyakran az ún. ráció módszerrel oldják meg [97, 98, 138]. Ennek számos változata közül azt ismertetjük, amelynél a két meghatározandó anyag különböző összetételű modellelegyeinek két hullámhosszon (általában a maximumhelyeken) meghatározzuk az abszorbanciáit,

majd a két hullámhosszon mért abszorbanciákat sorra elosztjuk egymással, és az így kapott rációkat ábrázoljuk az összetétel függvényében. A két hullámhosszon mért A_1 és A_2 abszorbanciák R rációjára a 141. oldalon található (4/13) és (4/14) egyenletek egymással való elosztása és a rétegvastagsággal való egyszerűsítés után nyerhető a (4/27) egyenlet:

$$R = \frac{A_1}{A_2} = \frac{a_{1,\lambda_1} \cdot c_1 + a_{2,\lambda_1} \cdot c_2}{a_{1,\lambda_2} \cdot c_1 + a_{2,\lambda_2} \cdot c_2}. \tag{4/27}$$

Az 1. és 2. anyag százalékos mennyisége (100%-nak véve a két koncentráció összegét):

$$\%_1 = \frac{100c_1}{c_1 + c_2}; \quad \%_2 = \frac{100c_2}{c_1 + c_2} = 100 - \%_1. \tag{4/28}$$

Ennek figyelembevételével a (4/27) egyenlet a következő alakra hozható:

$$R = \frac{(a_{1,\lambda_1} - a_{2,\lambda_1})\,\%_1 + 100a_{2,\lambda_1}}{(a_{1,\lambda_2} - a_{2,\lambda_2})\,\%_1 + 100a_{2,\lambda_2}}. \tag{4/29}$$

A (4/29) egyenlet görbét határoz meg. Ezt a négy abszorpciós koefficiens ismeretében is megszerkeszthetjük. Akár ilyen módon szerkesztjük meg, akár a modellelegyekre mért rációk alapján empirikusan, a kalibrációs görbe alkalmas arra, hogy ismeretlen összetételű elegynél mért ráció segítségével meghatározzuk a két komponens százalékos arányát. Amennyiben a második hullámhossznak nem a második komponens maximumhelyét, hanem a két spektrum esetleges metszéspontjának (izoabszorpciós pont) hullámhosszát választjuk, vagyis $a_{1,\lambda_2} = a_{2,\lambda_2}$, akkor a (4/29) egyenlet a következő egyszerűbb alakra hozható:

$$R = \frac{(a_{1,\lambda_1} - a_{2,\lambda_1})\,\%_1 + 100a_{2,\lambda_1}}{100a_{2,\lambda_2}}, \tag{4/30}$$

tehát ilyen módon kalibrációs görbe helyett egyeneshez juthatunk. Akár a (4/29), akár a (4/30) egyenletet alkalmazzuk, a ráció módszer alternatívát jelent kétkomponensű elegyek analízisére a 4.4. fejezetben leírt, kétismeretlenes egyenletrendszer megoldásán alapuló módszer mellett.

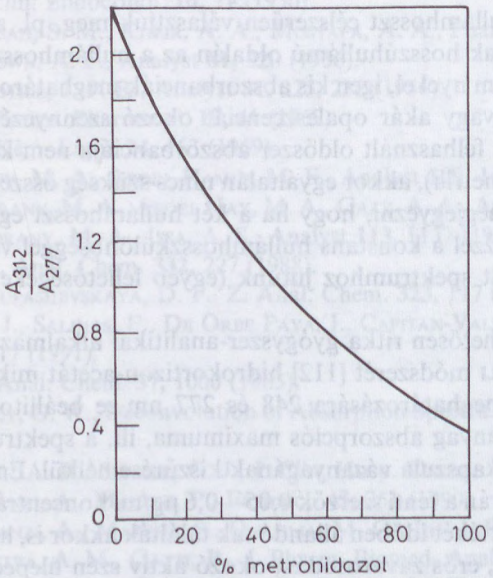
A ráció módszer előnye, hogy olyan esetekben, amikor az egyik komponens igen nagy feleslegben van jelen a meghatározandó komponenshez képest (szennyezések mérése), pontosabb eredményeket ad, mint az egyenletrendszer megoldására alapozott módszer. Bayer [10] pl. sikerrel alkalmazta ezt a módszert cianokobalamin (B_{12}-vitamin) szennyezés meghatározására az analóg szerkezetű hidroxokobalaminban. Tiszta hidroxokobalamin esetén a 361 nm-nél és 351 nm-nél mért abszorbanciák rációja, 1,58, tiszta cianokobalamin esetén pedig 0,61, az 1%-nál nagyobb cianokobalamin szennyezés meghatározására alkalmas képlet pedig:

$$\% = \frac{190 - 120R}{0{,}87R + 0{,}61}. \tag{4/31}$$

A (4/31) képlethez úgy lehet eljutni, hogy a (4/29) egyenletből kifejezzük $\%_1$-et.

Amint az a (4/29) és (4/30) egyenletekből látható, azokban nem szerepel a meghatározandó anyagok abszolút koncentrációja. Ebből következik a ráció módszer legfontosabb előnye: két komponens arányának meghatározásához nincs szükség a vizsgálandó minta pontos bemérésére. Ennek különösen akkor van jelentősége, amikor a két komponens koncentrációinak összege állandó és ismert (pl. egy kémiai reakció követésénél). Ez számos gyógyszeripari reakció igen gyors ellenőrzését teszi lehetővé. Például 4-etil-piridin ($\lambda_{max} = 252$ nm) oxidációja piridin-4-karbonsavvá (izonikotinsav) ($\lambda_{max} = 272$ nm) könnyűszerrel követhető a fenti két hullámhosszon mért abszorbanciák rációjának mérése alapján; a reakcióelegyből bemérés nélkül kivett mintákat hígítás után közvetlenül lehet mérni [51]. A 4-én-3-ketoszteroidok 240 nm-nél megjelenő sávján mért abszorbancia és a belőlük mikrobiológiai oxidációval gyártott 1,4-dién-3-keto-származékok spektrumában 266 nm körül megjelenő vállban mért abszorbancia rációjának mérése kitűnő alapot jelent a fermentáció analitikai követésére [65, 69, 104]. Amennyiben ilyen esetekben az abszolút koncentrációra is szükségünk van, azt könnyen ki lehet számítani az izoabszorpciós ponton mért abszorbanciából.

Néhány további példa a ráció módszer alkalmazására: tetrakain és norkain hidrokloridok egymás melletti mérése 311, ill. 285 nm-nél levő abszorpciós maximumaikban mért abszorbanciák rációja alapján [98], teofillin és fenobarbitál egymás melletti meghatározása az $A_{274,5}/A_{252,5}$ ráció alapján, ahol a két hullámhossz a teofillin maximuma, ill. az izoabszorpciós pont pH 9,5-es borátpufferben [138], prokain és azofen



4/27. ábra. Kalibrációs görbe metronidazol és 4-nitro izomerje egymás melletti meghatározásához a ráció módszerrel. Oldószer: 0,03 M vizes sósav.

(S. Görög, É. Csizér, Proc. 3rd Anal. Conf. Budapest, Akadémiai Kiadó, Budapest 1970, Vol. 1., 65. old. [53])

egymás melletti meghatározása fülcseppekben a 290 és 242 nm-es maximumokban mért abszorbanciák aránya alapján [107].

A ráció módszer segítségével megoldható olyan kényes feladat is, mint metronidazol (1-hidroxi-etil-2-metil-5-nitro-imidazol) és 4-nitro-izomerjének egymás melletti meghatározása. A két izomer spektruma mind szabad bázis, mind pedig protonált állapotban lényegében megegyezik. Különbség csak abban mutatkozik, hogy a bázisállandók különbözősége miatt (pK_b (metronidazol) = 11,44; pK_b (4-nitro-izomer) = 13,49) a metronidazol már alacsonyabb savasság mellett protonálódik, mint az izomer. Alkalmasan megválasztott savasság mellett (0,03 M sósav) metronidazol túlnyomó része protonált, az izomer pedig deprotonált állapotban van jelen. Ha erre a savasságra beállított oldatban mérjük meg az izomerelegy abszorbanciáját a protonált és deprotonált forma spektrumainak maximumhelyein, a rációból a 4/27. ábrán látható kalibrációs görbe segítségével számíthatjuk ki az izomerösszetételt [53].

4.6.2. Kéthullámhosszas spektrofotometria

Forgalomban vannak olyan spektrofotométerek is, amelyek két monokromátorral vannak felszerelve. Ha a két monokromatikus fénysugarat a kétsugármenetes készülékek ismertetésénél leírt módon váltakozva engedjük a vizsgálandó oldatot tartalmazó *egyetlen* küvettára esni, a detektorban az oldatnak a két hullámhosszon mérhető abszorbanciájának különbségét tudjuk közvetlenül leolvasni [41, 110, 111]. A kéthullámhosszas spektrofotometria több szempontból is előnyös mérési lehetőségeket teremt. Ha a két hullámhosszt célszerűen választjuk meg, pl. az abszorpciós maximum, valamint annak hosszúhullámú oldalán az a hullámhossz, ahol a meghatározandó anyag már nem nyel el, igen kis abszorbanciák meghatározását tudjuk elvégezni konstans háttér vagy akár opaleszcenciát okozó szennyezések jelenlétében. Ha biztosítható, hogy a felhasznált oldószer abszorbanciája nem különbözik a két hullámhosszon (kolorimetria), akkor egyáltalán nincs szükség összehasonlító oldat használatára. Érdekes megjegyezni, hogy ha a két hullámhosszt egymáshoz igen közeli értékre állítjuk, és ezzel a konstans hullámhosszkülönbséggel vesszük fel a spektrumot, az első derivált spektrumhoz jutunk (egyéb lehetőségeket illetően lásd a 4.5. fejezetet).

A módszer meglehetősen ritka gyógyszer-analitikai alkalmazásai közül kiemeljük Shively és Simonelli módszerét [112] hidrokortizon-acetát mikrokapszulák kioldódási sebességének meghatározására 248 és 277 nm-re beállított monokromátorok segítségével (a hatóanyag abszorpciós maximuma, ill. a spektrum levágásának hullámhossza) a mikrokapszula vázanyagának kiszűrése nélkül. Említést érdemel, hogy modellkísérleteik során a fenti szerzők 0,05—0,6 μg/ml koncentrációjú hidrokortizon-acetát oldatok ΔA-értékét időben állandónak találták akkor is, ha közben az oldatból jelentős mennyiségű, erős zavarosodást okozó aktív szén ülepedett ki.

4.6.3. Precíziós spektrofotometria

Különösen erősen elnyelő oldatok vizsgálata esetén az abszorbancia mérésének pontossága növelhető, ha összehasonlító oldatként nem a tiszta oldószert, hanem a meghatározandó anyag nagy pontossággal ismert koncentrációjú (a meghatározandó oldatnál valamivel hígabb) oldatát használjuk. Az összehasonlító oldat koncentrációja, valamint a nagy pontossággal meghatározott kis abszorbanciaérték ismeretében a kérdéses koncentráció meghatározható. Ennek, valamint számos más, ma már kevésbé használatos mérési technikának összefoglalása STERN és TIMMONS könyvében [115], valamint LÁNG disszertációjában [74] található meg.

Itt említjük meg, hogy a spektrofotometriás mérési technikák közül a gyógyszeranalitikában különlegesen nagy jelentősége van a differencia-spektrofotometriának. Éppen nagy jelentősége miatt ezzel a módszerrel külön (a 8.) fejezetben foglalkozunk.

Irodalom

1. ABDEL-HAMID, M. E., ABUIRJEIE, M. A., Analyst **113,** 1443 (1988).
2. ABDEL HAY, M. H., ELSAYED, M. A., BARARY, M. H., HASSAN, E. M., J. Pharm. Belg. **45,** 259 (1991).
3. ABDEL-KHALEK, M. M., ABDEL-HAMID, M. E., MAHROUS, M. S., ABDEL-SALAM, M. A., Anal. Lett. **18,** 781 (1985).
4. ABDEL-MOETY, E. M., J. Pharm. Biomed. Anal. **9,** 187 (1991).
5. ALLEN, W. M., J. Clin. Endocrinol. **10,** 71 (1950).
6. AMER, M. M., HASSAN, S. M., KHEIR, A. A., MOSTAFA, A. A., Pharmazie **33,** 344 (1978).
7. ASHTON, G. C., BROWN, A. P., Analyst **81,** 220 (1956).
8. ASHTON, G. C., TOOTILL, J. P. R., Analyst **81,** 225, 232 (1956).
9. BASTOW, R. A., J. Pharm. Pharmacol. **19,** 41 (1967).
10. BAYER J., Magyar Kém. Lapja **24,** 463 (1969).
11. BEDAIR, M., KORANY, M. A., ABDEL-HAMID, M. E., Analyst **109,** 1423 (1984).
12. BEDAIR, M. M., KORANY, M. A., ABDEL HAY, M. A., GAZY, A. A., Analyst **115,** 449 (1990).
13. BEDAIR, M. M., KORANY, M. A., ISSA, A. S., Analyst **113,** 1137 (1988).
14. BERSHTEIN, I. Y., Z. Anal. Chem. **332,** 227 (1988).
15. BERSHTEIN, I. Y., LUPASHEVSKAYA, D. P., Z. Anal. Chem. **323,** 117 (1986).
16. BERZAS NEVADO, J. J., SALINAS, F., DE ORBE PAYA, I., CAPITAN-VALLVEY, L. F., J. Pharm. Biomed. Anal. **9,** 117 (1991).
17. BLACKBURN, J. A., Anal. Chem. **37,** 1000 (1965).
18. BLASS, W. E., HALSEY, G. W., Deconvolution of Absorption Spectra. Academic Press, New York 1981.
19. BRYANT, S. L., NEEL, A. R., SEWELL, G. J., J. Clin. Hosp. Pharm. **11,** 327 (1986).
20. CARLUCCI, G., COLANZI, A., MAZZEO, P., Farmaco **45,** 751 (1990).
21. CARLUCCI, G., COLANZI, A., MAZZEO, P., QUAGLIA, M. G., Int. J. Pharm. **53,** 257 (1989).
22. CAVRINI, V., DI PIETRA, A. M., GATTI, R., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 1535 (1989).
23. CORTI, P., APREA, C., CORBINI, G., DREASSI, E., CELESTI, L., Pharm. Acta Helv. **66,** 50 (1991).
24. DALY, C., Analyst **86,** 129 (1961).
25. DAVIDSON, A. G., Analyst **108,** 728 (1983).
26. DAVIDSON, A. G., ELSHEIKH, H., Analyst **107,** 879 (1982).

27. Davidson, A. G., Hassan, S. M., J. Pharm. Sci. **73,** 413 (1984).
28. Davidson, A. G., Mkoji, L. M. M., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 449 (1988).
29. Deming, S. N., Morgan, S. L., Experimental Design: A Chemometric Approach. Elsevier, Amsterdam 1987.
30. Di Pietra, A. M., Cavrini, V., Raggi, M. A., Int. J. Pharm. **35,** 13 (1987).
31. Eboka, C. J., Adesanya, K. I., Int. J. Pharm. **51,** 263 (1989).
32. Fasanmade, A. A., Fell, A. F., Analyst **110,** 1117 (1985).
33. Felix, M., Blaha, K., Matematikai statisztika a vegyiparban. Műszaki Könyvkiadó, Budapest 1964.
34. Fell, A. F., Proc. Anal. Div. Chem. Soc. **15,** 260 (1978).
35. Fell, A. F., J. Pharm. Pharmacol. **30,** 63P (1978).
36. Fell, A. F., UV Spectrometry Group Bull. **7,** 5 (1979).
37. Fell, A. F., UV Spectrometry Group Bull. **8,** 5 (1981).
38. Fell, A. F. in Amino Acid Analysis (J. M. Rattenbury, Ed.) Ellis Horwood—John Wiley, Chichester—New York 1981, 86—118. old.
39. Fell, A. F. in Advances in Steroid Analysis. (Görög, S. ed.) Akadémiai Kiadó—Elsevier, Budapest—Amsterdam 1982, 495—510 old.
40. Fell, A. F., Chadburn, B. P., Knowles, A., „Derivative spectroscopy", in Knowles, A., Burgess, C., (ed.) Practical Absorption Spectroscopy. Chapman and Hall, London, New York 1984, 179—184. old.
41. Fell, A. F., Chadburn, B. P., Knowles, A., „Dual-wavelength spectroscopy", in Knowles, A., Burgess, C., (ed.), Practical Absorption Spectrometry. Chapman and Hall, London, New York 1984, 187—190. old.
42. Fell, A. F., Jarvie, D. R., Stewart, M. J., Clin. Chem. **27,** 286 (1981).
43. Forsyth, R. J., Haynes, D., Ip, D., Pharm. Res. **7,** S26 (1990).
44. Garcia Fraga, J. M., Jiménez Abizanda, A. I., Jiménez Moreno, F., Arias Leon, J. J., J. Pharm. Biomed. Anal. **9,** 109 (1991).
45. Géher, J., Szabó É., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 757 (1988).
46. Gill, R., Bal, T. S., Stewart, J., Forensic Sci. Soc. **22,** 165 (1982).
47. Girgis, E. H., Negm, F., Mahmoud, S., J. Pharm. Pharmacol. **36,** 840 (1984).
48. Glenn, A. L., J. Pharm. Pharmacol. **15,** 123T (1963).
49. Gonzalez-Hierro, P., Velázquez, M. M., Cachaza, J. M., Rodriguez, L. J., J. Pharm. Biomed. Anal. **5,** 395 (1987).
50. Görög, S. „Ultraibolya és látható spektrofotometria", in Szász Gy. (szerk.), Gyógyszerészi Kémia I., Medicina Könyvkiadó, Budapest 1983, 68—120. old.
51. Görög S., Magy. Kém. Lapja **20,** 503 (1965).
52. Görög, S., Csizér, É., Acta Chim. Hung. **65,** 41 (1970).
53. Görög, S., Csizér, É., Proc. 3rd Anal. Conf. Budapest, Akadémiai Kiadó, Budapest 1970, Vol. 2., 65. old.
54. Görög, S., Rényei, M., Herényi, B., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 1527 (1989).
55. Grizodub, A. I., Levin, M. G., Georgijevszkij, V. P., Zsurn. Anal. Him. **41,** 1984 (1986).
56. Grizodub, A. I., Levin, M. G., Georgijevszkij, V. P., Zsurn. Anal. Him. **39,** 1987 (1984).
57. Guoan Luo, Jiaxue Qui, Yiming Wang, Zhengwei Yu, J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 507 (1989).
58. Hackmann, E. R. M., Benetton, S. A., Santoro, M. I. R. M., J. Pharm. Pharmacol. **43,** 285 (1991).
59. Hartwell, S.: International Laboratory, March 1988.
60. Hassan, S. M., Amer, S. M., Amer, M. M., Analyst **112,** 1459 (1987).
61. Hassan, S. M., Davidson, A. G., J. Pharm. Pharmacol. **36,** 7 (1984).

62. Hiskey, C. F., Anal. Chem. **33,** 927 (1961).
63. Hoover, J. M., Soltero, R. A., Bansal, P. C., J. Pharm. Sci. **76,** 242 (1987).
64. Hosia, L., Peltonen, V., Halmekoski, J., Farm. Aikak. **81,** 194 (1972).
65. Ivaskhiv, E., Biotechn. and Bioeng. **13,** 561 (1971).
66. Jones, J. H., Clark, G. R., Harrow, L. S., J. Assoc. Agr. Chem. **34,** 135 (1951).
67. Jones, R., Leadley, B. S., J. Pharm. Biomed. Anal. **4,** 309 (1986).
68. Kitamura, K., Majima, R., Anal. Chem. **55,** 54 (1983).
69. Knight, J. C. „Analytical control of sterol bioconversions", in Görög, S. (ed.), Steroid Analysis in the Pharmaceutical Industry. Ellis Horwood, Chichester 1989, 223—236. old.
70. Knochen, M., Altesor, C., Dol, I., Analyst **114,** 1303 (1989).
71. Knochen, M., Bardanca, M., Piaggio, P., Boll. Chim. Farm. **126,** 294 (1987).
72. Korany, M., Bedair, M., El-Yazbi, F. A., Analyst **111,** 41 (1986).
73. Korany, M. A., Bedair, M., Mahgoub, H., Elsayed, M. A., J. Ass. Off. Anal. Chem. **69,** 608 (1986).
74. Láng L., Akadémiai doktori disszertáció, Budapest, 1971.
75. Lawrence, A. H., Kovar, J., Analyst **110,** 827 (1985).
75a. Lawrence, A. H., MacNeil, J. D., Anal. Chem. **54,** 2385 (1982).
76. Legrand, M., Delaroff, V., Smolik, R., J. Pharm. Pharmacol. **10,** 683 (1958).
77. Leung, C. P., Wong, K. C. C., J. Pharm. Biomed. Anal. **9,** 195 (1991).
78. Machek, G., Lorenz, F., Sci. Pharm. **31,** 17 (1963).
79. Maddams, W. F., „Numerical methods in data analysis", in Knowles, A., Burgess, C. (ed.), Practical Absorption Spectrometry. Chapman and Hall, London, New York 1984, 160—177. old.
80. Mahgoub, H., Drug Dev. Ind. Pharm. **16,** 2135 (1990).
81. Mazzeo, P., Quaglia, M. G., Segnalini, F., J. Pharm. Pharmacol. **34,** 470 (1982).
82. Meal, L., Anal. Chem. **55,** 2448 (1983).
83. Milch, Gy., Acta Pharm. Hung. **32,** 206 (1962).
84. Milch, Gy., Csontos, A., Borsai, M., Vadon, E., Mogács, I., Acta Pharm. Hung. **36,** 200 (1966).
85. Milch, Gy., Borsai, M., Mogács, I., Acta Pharm. Hung. **37,** 6 (1967).
86. Milch, Gy., Szabó É., Analusis **16,** 59 (1988).
87. Minguez, A. C., Velázquez, M. M., Rodriguez, L. J., Farmaco, Ed. Prat. **42,** 165 (1987).
88. Mohamed, M. E., Al-Khames, H. A., Al-Awadi, M., Farmaco **44,** 1045 (1989).
89. Moro, M. E., Velázquez, M. M., Rodriguez, L. J., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 1013 (1988).
90. Morton, R. A., Stubbs, A. L., Analyst **71,** 348 (1946).
91. Morton, R. A., Stubbs, A. L., Biochem. J. **41,** 525 (1947).
92. Mulder, E. J., Spruit, F. J., Keuning, K. J., Pharm. Weekblad **98,** 745 (1963).
93. Neuer, H., Z. Anal. Chem. **253,** 337 (1971).
94. Nobile, L., Cavrini, V., Raggi, M. A., Di Pietra, A. M., Int. J. Pharm. **40,** 85 (1987).
95. O'Haver, T. C., Clin. Chem. **25,** 1548 (1979).
96.. Parissi-Poulou, M., Reizopoulou, V., Koupparis, M., Macheras, P., Int. J. Pharm. **51,** 169 (1989).
97. Pernarowski, M., Knevel, A. M., Christian, J. E., J. Pharm. Sci. **50,** 943 (1961).
98. Pernarowski, M., Knevel, A. M., Christian, J. E., J. Pharm. Sci. **50,** 946 (1961).
99. Poulisse, H. N. J., Anal. Chim. Acta **112,** 361 (1979).
100. Poulou, M., Macheras, P., Int. J. Pharm. **34,** 29 (1986).
101. Quaglia, M. G., Carlucci, G., Cavicchio, G., Mazzeo, P., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 421 (1988).

102. Quaglia, M. G., Carlucci, G., Maurizi, G., Mazzeo., P., Pharm. Acta Helv. **63,** 347 (1988).
103. QUEST—UV Applications Program. Perkin-Elmer GmbH. Bodenseewerk (1983).
104. Rössler, H., Brückner, K., Naturwissensch. **48,** 695 (1961).
105. Sala, G., Maspoch, S., Iturriaga., H., Blanco, M., Cerda, V., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 765 (1988).
106. Santoni, G., Mura, P., Pinzauti,. S., Gratteri, P., La Porta, E., Int. J. Pharm. **50,** 75 (1989).
107. Santoni, G., Mura, P., Pinzauti, S., Lombardo., E., Gratteri., P., Int. J. Pharm. **64,** 235 (1990).
108. Scheffler, E., Statistische Methoden der Versuchsplanung und Auswertung. Leipzig 1974.
109. Sharma, S. C., Sharma, S. C., Saxena, R. C., Talwar, S. K., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 321 (1989).
110. Shibata, S., Angew. Chem. Ind. Ed. **15,** 673 (1976).
111. Shibata, S., Furukawa, M., Goto, K., Anal. Chim. Acta **46,** 271 (1969).
112. Shively, M. L., Simonelli, A. P., Int. J. Pharm. **50,** 39 (1989).
113. Shroff, A. P., Grodsky, J., J. Pharm. Sci. **56,** 460 (1967).
114. Smeyers Verbeke, J., Detaevernier, M. R., Massart, D. L., Anal. Chim. Acta **191,** 181 (1986).
115. Stern, E. S., Timmons, C. J., Gillam and Stern's Introduction to Electronic Absorption Spectroscopy in Organic Chemistry. Edward Arnold, London 1970, 202—219. old.
116. Talsky, G., Mayring, L., Kreuzer, H., Angew. Chem. Int. Ed. **17,** 785 (1978).
117. Tardif, R., J. Pharm. Sci. **50,** 693 (1961).
118. Tobias, D. Y., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **66,** 1450 (1983).
119. Traveset, J., Such, V., Gonzalo, R., Gelpi, E., J. Pharm. Sci. **69,** 629 (1980).
120. Uhlich, H., Krankenhauspharmazie **5,** 167 (1984).
121. Vetuschi, C., Ragno, G., Int. J. Pharm. **65,** 177 (1990).
122. Vetuschi, C., Ragno, G., Losacco, V., Boll. Chim. Farm. **127,** 193 (1988).
123. Vetuschi, C., Ragno, G., Mazzeo, P., Mazzeo-Farina, A., Farmaco Ed. Prat. **40,** 215 (1985).
124. Vezin, W. R., J. Pharm. Pharmacol. **31,** 663 (1979).
125. Vierordt, K., Die Anwendung des Spektralapparates zur Photometrie der Absorptionsspektren und zur quantitativen chemischen Analyse. Verlag der H. Laupp'schen Buchhandlung, Tübingen 1873.
126. Vincze I., Matematikai statisztika ipari alkalmazásokkal. Műszaki Könyvkiadó, Budapest 1975.
127. Wahbi, A. M., Pharmazie **26,** 291 (1971).
128. Wahbi, A. M., Abdine, H., J. Pharm. Pharmacol. **25,** 69 (1973).
129. Wahbi, A. M., Abdine, H., Korany, M. A., Pharmazie **33,** 278 (1978).
130. Wahbi, A.-A. M., Abounassif, M. A., Al-Kahtani, M. G., Analyst **111,** 777 (1986).
131. Wahbi, A. M., Belal, S., Abdine, H., Bedair, M., Analyst **106,** 960 (1981).
132. Wahbi, A. M., Belal, S., Abdine, H., Bedair, M., Talanta **29,** 931 (1982).
133. Wahbi, A. M., Ebel, S., J. Pharm. Pharmacol. **26,** 317 (1974).
134. Wahbi, A. M., Ebel, S., Steffens, U., Z. Anal. Chem. **273,** 183 (1975).
135. Wahbi, A.-A. M., Mahgoub, H., Barary, M., Analyst **114,** 505 (1989).
136. Wahbi, A. M., Unterhalt, B., Z. Anal. Chem. **282,** 31 (1976).
137. Winfield, S. A., Rhys Williams, A., J. Pharm. Biomed Anal. **2,** 561 (1984).
138. Yokoyama, F., Pernarowski, M., J. Pharm. Sci. **50,** 953 (1961).

5. Spektrofotometriás módszerek összekapcsolása kromatográfiás technikákkal

5.1. Spektrofotometriás és kromatográfiás módszerek összekapcsolásának jelentősége

Amint azt könyvünk 1. fejezetében részletesen kifejtettük, az utolsó 30—40 évben az azt megelőző időszakhoz viszonyítva csupán szerényebb fejlődés volt tapasztalható mind az ultraibolya-látható spektrofotometria módszertanában, mind pedig gyógyszer-analitikai alkalmazásában. Ezzel szemben éppen ez az időszak a kromatográfiás módszerek példátlan gyorsaságú fejlődésének és elterjedésének korszaka. A gázkromatográfia, vékonyréteg-kromatográfia és a nagyhatékonyságú oszlopkromatográfia a gyógyszeranalízisben is meghatározó jelentőségű módszerekké váltak.

Hogy a spektrofotometria más klasszikus módszerekkel ellentétben jelentőségének számottevő csökkenése nélkül jutott el a gyógyszer-analitikában a 90-es évekig, jórészt annak köszönhető, hogy ez a módszer kitűnően összekapcsolható a korszerű kromatográfiás módszerekkel.

Ha ezt a kérdést a kromatográfia fejlődésének oldaláról közelítjük meg, megállapíthatjuk, hogy ez a fejlődés elképzelhetetlen lett volna a spektrofotometria módszertanának és szemléletének alkalmazása nélkül. Ultraibolya spektrofotométereket alkalmaznak az esetek többségében mind a klasszikus kisnyomású, mind pedig a modern, nagynyomású folyadékkromatográfiában az elválasztott anyagok detektálására és mérésére. Fényabszorpció, ill. reflexió mérésén alapul az esetek döntően nagy részében a minőségi és mennyiségi elemzés a vékonyréteg-kromatográfiában, az elektroforetikus, kapillár-elektroforetikus és rokon (izoelektromos fókuszálási, izotachoforetikus stb.) módszerekben. Érdemes megjegyezni, hogy ma már több ultraibolya-látható spektrofotométer kerül forgalomba az említett technikákkal dolgozó műszerek nélkülözhetetlen tartozékaiként, mint önállóan. A detektálás és mennyiségi mérés szelektivitásának és érzékenységének fokozása céljából felhasználták a kémiai reakciókra alapozott spektrofotometria eredményeit, sőt speciális igényeik kielégítése érdekében új irányokat adtak ennek a területnek fejlődése számára.

Ha viszont a kérdést a spektrofotometria oldaláról közelítjük meg, azt állapíthatjuk meg, hogy a kromatográfiás módszerek alkalmazása éppen az ultraibolya-látható spektrofotometria legproblematikusabb oldalán, a gyenge szelektivitás terén hozott áttörést. A szelektivitás növelésére irányuló erőfeszítések ui., amelyeket könyvünk 4. fejezetében (optikai módszerek alkalmazása), valamint 6., 7., 8. és 10. fejezeteiben (kémiai reakciók felhasználása) ismertetünk, az esetek jelentős részében nem vezetnek

megfelelő eredményre: a megfelelő szelektív elválasztás feltétele igen gyakran a meghatározandó anyag elválasztása a mátrixtól, ill. a hasonló spektrummal rendelkező kísérő anyagoktól. Ez az elválasztás a legegyszerűbben és a legnagyobb hatékonysággal valamely kromatográfiás technika alkalmazásával végezhető el.

A kapcsolt módszereket a kapcsolat jellege szempontjából három csoportra oszthatjuk:

1. A kromatografálást és a spektrofotometriás mérést egymástól időben és térben elválasztva hajtják végre. Ide sorolható a kisnyomású oszlopkromatográfiásan elválasztott anyagok, ill. a vékonyréteg-kromatogramról eluált anyagok spektrofotometriás mérése. Itt maga a spektrofotometriás mérés lényegében a korábbi fejezetekben leírt módon hajtható végre.

2. A spektrofotometriás mérést és a kromatografálást időben elválasztva hajtják végre, a spektrofotometriás mérés azonban térben nincs elválasztva a kromatogramtól. Ide tartoznak a vékonyréteg-kromatogramon, ill. rokon technikákkal kapott lapokon eluálás nélkül végrehajtott *in situ* denzitometriás mérések.

3. A kromatografálás és a spektrofotometriás mérés időben és térben gyakorlatilag el nem választva kerül kivitelezésre. Ebbe a kategóriába tartozik az UV-detektorral végrehajtott nagynyomású folyadékkromatográfiás mérés, valamint a csupán az érdekesség kedvéért megemlített UV-detektoros gázkromatográfiás vizsgálat.

Amint az a felsorolásból érzékelhető, az érintett terület kiterjed a kromatográfia szinte valamennyi fontosabb ágazatára, s ezért részletes tárgyalásuk kívül esne a könyvünk számára célul kitűzött szakterületen, és messze meghaladná annak terjedelméből adódó lehetőségeket.

5.2. Spektrofotometriás mérés oszlopkromatográfiás elválasztás után

Szerves vegyületek oszlopkromatográfiás elválasztását elsősorban a preparatív kémiában használják. Mivel az oszlop nagyságától függően ez a módszer mikrogrammos nagyságrendtől tonnás nagyságrendig alkalmas az elválasztásra, a kisebb oszlopokon való elválasztást már a technika kialakulása óta alkalmazzák analitikai célokra, így a spektrofotometriás mérést megelőző elválasztásra is. (Megjegyzendő, hogy az ultraibolya spektrofotometria komoly szerephez jut a kifejezetten preparatív célzatú kromatográfiában is, ez ui. a legkényelmesebb módszere az elválasztás követésének; az oszlopot elhagyó oldat abszorbanciájának átfolyó küvetta segítségével való folyamatos vagy az egyes frakciókból vett minták szakaszos mérése segítségével a spektrofotometriásan aktív komponensek megjelenési helye lokalizálható. Az analitikai célzatú oszlopkromatográfiás elválasztás — bár jelentősége a vékonyréteg-kromatográfia széles körű elterjedésével párhuzamosan csökkent — mind a mai napig fontos módszere a gyógyszer-analitikának mind gyógyszerkészítmények, mind pedig biológiai minták vizsgálatára. Az oszlopkromatográfia hatalmas monográfiai-irodalmából két művet emelünk ki, amelyek bőven tartalmaznak gyógyszer-analitikai vonatkozású példákat is, a Deyl, Macek és Janák [9], ill. a Mikes [45] által szerkesztett műveket.

Analitikai célzatú kromatográfiás elválasztásokra általában 15—30 cm hosszú, 1—3 cm átmérőjű üvegoszlopot használnak. A töltet a klasszikus adszorpciós kromatográfiából átvett szilikagéltől és alumínium-oxidtól ioncserélő gyantákon keresztül [37] az elsősorban a biológiai minták analízisére használt, különböző kémiai módosításoknak alávetett polidextrán gélekig felöleli a kromatográfiában használt állófázisok szinte teljes választékát. Külön figyelmet érdemelnek a gyógyszer-analitikai gyakorlatban igen elterjedt folyadék-folyadék megoszlásos oszlopkromatográfiás módszerek, ahol inert hordozót (Celit, Kieselgur) vizes pufferral vagy valamely más poláris oldószerrel (dimetil-formamid, dimetil-szulfoxid, acetonitril stb.) impregnálják, eluensként pedig apoláris oldószereket alkalmaznak, esetenként ionpárképző reagensekkel kombinálva. Jellemző ennek a módszernek elterjedtségére, hogy DOYLE és LEVINE összefoglaló közleményében, amely a módszernek gyógyszerkészítményekre való alkalmazásával foglalkozik, 126 irodalmi adat található [10]. Az eluensek megválasztásával kapcsolatban általánosságban az mondható el, hogy amennyiben az eluált komponenst az ultraibolya tartományban kívánjuk mérni, akkor benzol, aceton és a mérés hullámhosszától függően egyéb oldószerek sem használhatók (lásd 43—44. oldal); amennyiben színreakciót alkalmazunk, ez a korlátozás kiesik.

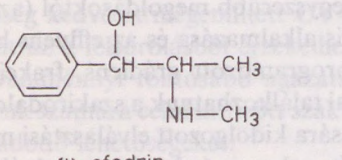
Az eluens adagolását és az effluensben a meghatározandó anyagok detektálását és mérését illetően az állapítható meg, hogy a legegyszerűbb megoldásoktól (az eluens manuális feltöltése, szakaszos grádiens manuális alkalmazása és az effluens hasonló kezelése) teljesen automatizált rendszerekig (programozott grádiens, frakcioszedő automaták alkalmazása) mindenféle megoldással találkozhatunk a szakirodalomban. Mivel a gyógyszer-analitikai feladatok megoldására kidolgozott elválasztási módszerek általában csak szerényebb célkitűzést valósítanak meg (a hatóanyag elválasztása kiszerelési segédanyagoktól vagy kromatográfiás szempontból nem különösebben problematikus más hatóanyagtól vagy bomlástermektől stb.), itt a legegyszerűbb technikai megoldások dominálnak.

Példaként a GRAHAM [28, 29] által bevezetett rendszert mutatjuk be tesztoszteronészterek elválasztására az injekciókészítésre felhasznált olajtól és a bomlásuk során keletkező szabad tesztoszterontól [28]. Az oszlop ennél a vizsgálatnál 25 × 2,2 cm-es üvegcsőben foglalt helyet, amelynek alsó vége 5 × 0,4 cm-re volt leszűkítve. A cső fenekére helyezett üveggyapot dugóra rávisszük a 4 g Celit 545 és 4 ml acetonitril összekeverésével nyert masszát, s ezt egy alumínium bot segítségével tömörítjük.

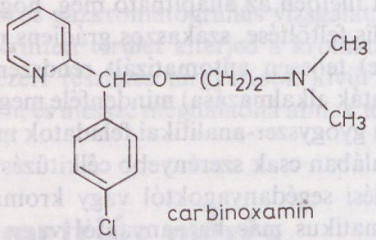
A tesztoszteron-észtereket tartalmazó tablettákat metanollal extraháljuk, az injekciókat kloroformmal hígítjuk. Az így nyert törzsoldatok 1,25 mg szteroidot tartalmazó részleteit szárazra pároljuk, 1,5—1,5 ml heptánban, ill. acetonitrilben oldjuk, majd a két oldatot 3 g Celittel elkeverjük, s az így nyert masszát az oszlop tetejére visszük. Az elúciót 250 ml heptánnal végezzük. Az első 60 ml-es frakciót külön fogjuk fel; ebben határozzuk meg a tesztoszteron-észtereket, a második, 190 ml-es frakcióban pedig a bomlástermék szabad tesztoszteront. A meghatározást végrehajthatjuk 240 nm-nél a telítetlen ketoncsoport direkt mérésével vagy ugyanazon funkciós csoportnak izonikotinsav-hidrazidos reakciója után a látható spektrumtartományban (lásd 427. oldal). A kromatográfiás elválasztás a tesztoszteron elkülönítésén túlmenően eltávolítja az olajnak mindkét fotometriás meghatározást zavaró komponenseit, nem távolítja viszont el a konzerválószerként alkalmazott benzil-alkoholt; az együtt eluá-

lódik az első frakcióban a tesztoszteron-észterekkel. Ilyen esetekben tehát csak az izonikotinsav-hidrazidos módszert használhatjuk.

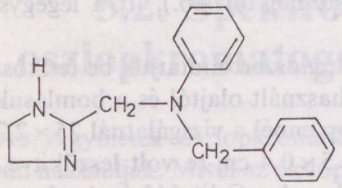
Az ismertetett klasszikus példa után a módszer egyre ritkuló irodalmából egy új módszert mutatunk be, Lopez Silva és munkatársai módszerét, két összetett gyógyszerkészítmény komponenseinek meghatározására [41]. Az elválasztásra 14,5 cm hosszú és 3,2 cm átmérőjű, foszfát pufferrel impregnált Kieselgurral töltött oszlop szolgált. Az elválasztás alapját a különböző bázicitású komponensek a puffer optimalizált pH-ján az oszlopon való különböző mértékű visszatartása képezi. A puffer pH-optimuma az antazolin ($pK_a = 10{,}1$)—nafazolin ($pK_a = 10{,}9$) kombináció esetében 6,0; a ψ-efedrin ($pK_a = 9{,}9$)—carbinoxamin ($pK_a = 8{,}1$) kombináció esetében pedig 6,7 volt. Az előbbi kombináció analízise során 150 ml kloroformmal extrahálva az antazolin kvantitatíven eluálódik, míg a nafazolint az oszlop visszatartja. Az utóbbi kombinációnál 100 ml kloroformmal a carbinoxamin eluálódik, míg a ψ-efedrin nem. A visszatartott komponenseket 0,1 M sósavval eluálják. Ez utóbbi oldatok megfelelő hígítása után közvetlenül, míg a kloroformos oldatok esetében bepárlás és 0,1 M sósavas oldás után az abszorpciós maximumok helyén a spektrofotometriás mérés elvégezhető (nafazolin: 281 nm, antazolin: 241 nm, ψ-efedrin: 256,5 nm, carbinoxamin: 264 nm).



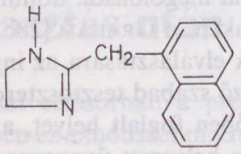
Ψ-efedrin



carbinoxamin



antazolin



nafazolin

5.3. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

5.3.1. Általános kérdések. Kvantitatív analízis

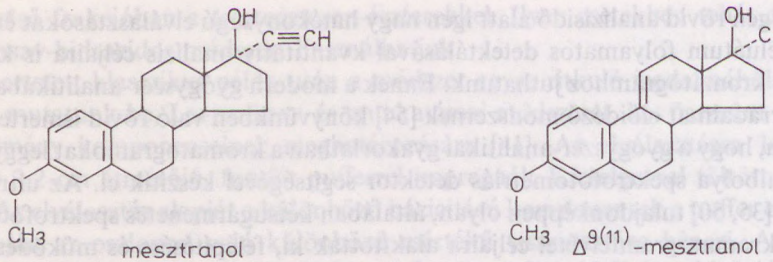
Az előző fejezetben tárgyalt klasszikus oszlopkromatográfia jelentőségét messze felülmúlja az analitikai gyakorlatban a modern nagyhatékonyságú vagy nagynyomású oszlopkromatográfia, ahol nagynyomású pumpa segítségével olyan finom szemcseméretű szorbenssel töltött oszlopon is keresztül tudjuk préselni az eluenst, amely atmoszferikus nyomás mellett gyakorlatilag áthatolhatatlan lenne. Ez azt eredménye-

zi, hogy igen rövid analízisidő alatt igen nagy hatékonyságú elválasztásokat érhetünk el, s az eluátum folyamatos detektálásával kvantitatív analízis céljaira is kiválóan alkalmas kromatogramhoz juthatunk. Ennek a modern gyógyszer-analitikában valóságos forradalmat előidéző módszernek [54] könyvünkben való rövid ismertetését az indokolja, hogy a gyógyszer-analitikai gyakorlatban a kromatogramokat leggyakrabban ultraibolya spektrofotometriás detektor segítségével készítik el. Az ultraibolya detektor [35, 50] tulajdonképpen olyan, általában kétsugármenetes spektrofotométer, amelyet kromatogramfelvétel céljaira alakítottak ki, felépítésére és működésére vonatkozóan azonban főbb vonásaiban a 2.4. és 2.6. fejezetben leírtak érvényesek.

Fényforrásként a legegyszerűbb és legolcsóbb detektoroknál higanylámpát alkalmaznak, ami 254 nm-nél teszi lehetővé a kromatogram detektálását. A vizsgálat alapját képező hullámhosszak számát megfelelő szűrők és foszforok segítségével növelhetjük, az esetek többségében azonban — csakúgy mint a korszerű spektrofotométerekben általában — folyamatos hullámhossz-beállítást lehetővé tevő deutériumlámpát, ill. a látható tartományban volfrámlámpát használnak. Az itt alkalmazott rácsos monokromátor felbontása természetesen lényegesen szerényebb, mint a spektrofotométerként használt műszerek esetében. A kromatográfiás oszlop után közvetlenül csatlakozik a mérőcella, amely térfogatának a sávszélesedés elkerülése céljából minimálisnak, a hasznos cellahossznak viszont az érzékenység növelése céljából minél nagyobbnak kell lenni. A korszerű detektorok cellatérfogata nem haladja meg az 5—10 µl-t, de vannak forgalomban 1—2 µl-es mikrocellával felszerelt készülékek is, a cellahossz pedig eléri a 10 mm-t. A spektrofotometriás detektor teljesítőképességét döntően határozza meg a jelfogó érzékenysége és lehetőleg igen széles lineáris dinamikus tartománya, ui. a spektrofotométernek detektorként való felhasználása esetén gyakrabban van szükség igen kis abszorbanciakülönbségek elfogadható jel—zaj viszony melletti regisztrálására, mint a hagyományos spektrofotometria esetében. Nyomelemzésnél pl. a legérzékenyebb detektorokat olyan módon is lehet használni, hogy a regisztráló egység teljes skálája 0,005 abszorbancia egységnek felel meg.

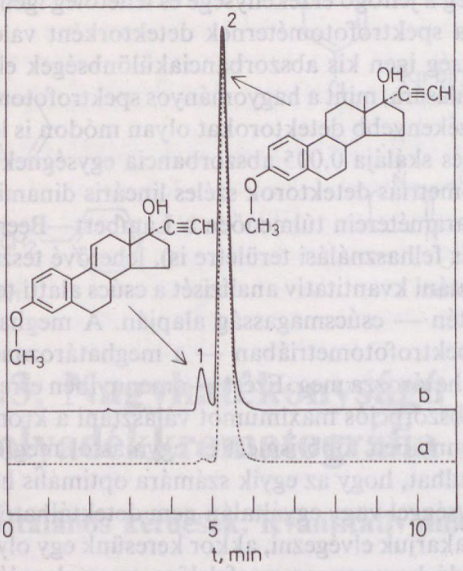
Az ultraibolya fotometriás detektorok széles lineáris dinamikus tartománya (amit a jelfogó megfelelő paraméterein túlmenően a Lambert—Beer-törvény érvényessége biztosít erre a speciális felhasználási területre is), lehetővé teszi ismert komponensek megfelelő kalibráció utáni kvantitatív analízisét a csúcs alatti terület vagy — megfelelően éles csúcsok esetén — csúcsmagasság alapján. A meghatározás érzékenységét — csakúgy mint a spektrofotometriában — a meghatározandó anyag moláris abszorpciós koefficiense határozza meg. Ezért — amennyiben erre a detektor lehetőséget nyújt — célszerű az abszorpciós maximumot választani a kromatogram felvételének hullámhosszául. Amennyiben több ismert és egymástól megfelelően elváló komponensünk van, előfordulhat, hogy az egyik számára optimális hullámhosszon a másik csak igen kis érzékenységgel vagy egyáltalán nem detektálható. Ha több komponens kvantitatív analízisét akarjuk elvégezni, akkor keresünk egy olyan hullámhosszt, ahol valamennyi vizsgálandó komponens megfelelően nagy elnyeléssel rendelkezik, s ott vesszük fel a kromatogramot. Másik alternatíva, többször felvenni a kromatogramot az egyes meghatározandó komponensek spektrumainak maximumhelyein.

Vannak forgalomban olyan ultraibolya detektorok is, amelyeknél a detektort irányító komputerbe beprogramozható, hogy az egyes csúcsok között a detektor



monokromátora optimális hullámhosszértékre váltson. Ilyen tekintetben a legkorszerűbb megoldást a diódasoros ultraibolya spektrofotométerrel mint detektorral ellátott készülékek jelentik. Ezek lehetővé teszik a több hullámhosszon való szimultán detektálást. Ennek illusztrálására az 5/1. ábrán bemutatjuk 9(11)-dehidro-mesztranol szennyezés meghatározását mesztranolban. Látható az igen jelentős érzékenységnövekedés, ha a főkomponens maximumhelye (280 nm) helyett a szennyezés maximumhelyén (261 nm) detektáljuk a kromatogramot [26].

A gyógyszer-analitikában vizsgált anyagok nagy többsége rendelkezik olyan fényelnyeléssel, hogy valamilyen alkalmas hullámhosszon detektálható legyen. Még az UV-inaktívnak tekinthető anyagok is rendelkeznek igen rövid hullámhosszaknál a detektálást lehetővé tevő elnyeléssel: 200 nm körül már elenyészően kisszámú kivételtől eltekintve valamennyi gyógyszer-analitikai szempontból jelentős anyag detektál-



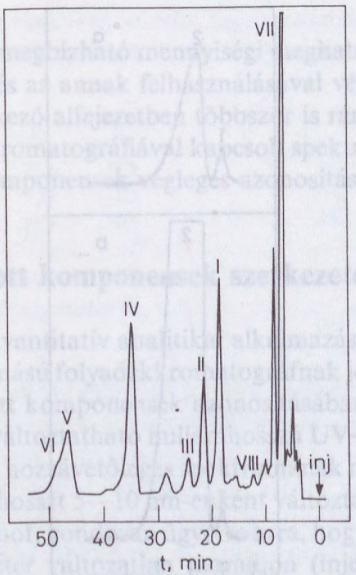
5/1. ábra. 0,5% 9(11)-dehidro-mesztranol (*1.* csúcs) szennyezést tartalmazó mesztranol (*2.* csúcs) folyadékkromatogramja. Oszlop: 250 × 4 mm 10 μm LiChrosorb RP-18; eluens: metanol-víz 9 : 1; 1 ml/perc.

a) 280 nm-es felvétel; *b)* 261 nm-es felvétel. (S. Görög, A. Laukó, B. Herényi, J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 697 (1988) [26])

ható kisebb-nagyobb érzékenységgel. A nagyon alacsony hullámhossznál való mérés azonban — hasonlóan a spektrofotometriához — itt is felvet egy sor problémát: csak igen jó minőségű, jól karbantartott detektorral mérhetünk, az eluensként használt oldószerekkel szemben különleges követelményeket kell támasztani. Csak víz, egyszerű alkoholok és szénhidrogének, valamint acetonitril használhatók, ezek is csak akkor, ha nagy tisztaságúak („HPLC grade" minőségű oldószerek).

Amennyiben a vizsgálandó minta nemcsak ismert komponenseket tartalmaz, igen óvatosan kell eljárnunk a hullámhossz(ak) megválasztásánál. Ha ui. csupán a főkomponens spektrumának maximumhelyén mérünk, könnyen előfordulhat, hogy nem detektálunk akár jelentős mennyiségben jelenlevő, de az adott hullámhosszon el nem nyelő kísérő anyagot, szennyezést, bomlásterméket. Ilyen esetben célszerű az optimális hullámhossz mellett még 200 nm tájékán is felvenni a kromatogramot.

A korszerű, elektronikus integrátorral ellátott készülékek az egyes komponensek csúcs alatti területeit közvetlenül kifejezik az össz-terület százalékában. Ezeket az értékeket csak abban az esetben fogadhatjuk el akárcsak közelítő értékként az egyes komponensek százalékos arányára vonatkozóan, ha az adott hullámhosszon valamennyi komponens abszorpciós koefficiense közelítőleg azonos. Ilyen esetet mutatunk be az 5/2. ábrán, ahol egy fermentlében levő ergolénvázas alkaloidok kromatogramja látható [39]. Mivel valamennyi származék spektrofotometriásan aktív lizergsav

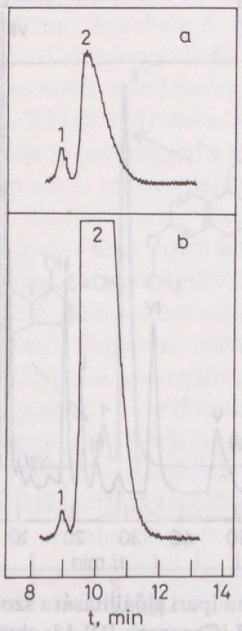


5/2. ábra. Ergokornin — ergokriptin ipari előállítására szolgáló fermentlé folyadék-kromatogramja. Oszlop: 250 × 4 mm 10 μm LiChrosorb RP-18; eluens: tetrahidrofurán — 0,01 M vizes ammónium-acetát 4 : 6; 1,5 ml/perc; 322 nm. I. ergokornin; II. α-ergokriptin; III. β-ergokriptin; IV. ergokorninin; V. α = ergokriptinin; VI. β-ergokriptinin; VII. ergometrin; VIII. ergometrinin.

(B. Herényi, S. Görög, J. Chromatogr. **238**, 250 (1982) [30])

komponense azonos, és csupán a spektrofotometriásan inaktívnak tekinthető peptid részben van köztük különbség, ezért ez esetben a területarányokból lehetséges a komponensek mólarányainak jó közelítéssel való meghatározása. Az esetek nagyobb részében azonban ez a feltétel nem teljesül; az integrátoron leolvasott százalékos értékek még tájékoztató adatokat sem szolgáltatnak az elegy összetételére vonatkozóan, hiszen az egyes komponensek abszorpciós koefficiensei között akár több nagyságrend különbség is lehet az adott hullámhosszon. Így igen nagyfokú körültekintésre van szükség akkor, ha a módszert gyógyszer-alapanyagok szennyezettségi profiljának meghatározására kívánjuk alkalmazni, és nem ismerjük valamennyi szennyezés szerkezetét és spektrumát. Amint azt már említettük, előfordulhat, hogy bizonyos szennyezéseket egyáltalán nem detektálunk, másokat viszont erősen felnagyítva észlelünk. Ez utóbbi megállapítást természetesen úgy is megfogalmazhatjuk, hogy a módszer kitűnő lehetőséget teremt bizonyos szennyezések, bomlástermékek stb. igen nagy érzékenységű meghatározására. Illusztrációként egyrészről megemlítjük a 4,5-dihidro, ill. $\Delta^{5(10)}$ származékok mint szennyezések meghatározását noretiszteronban. Ezek a konjugált kötési rendszert nem tartalmazó származékok még százalék nagyságrendű jelenlétük esetén sem adnak jelet a telítetlen ketoncsoportot tartalmazó noretiszteron maximumhelyén, 240 nm-nél.

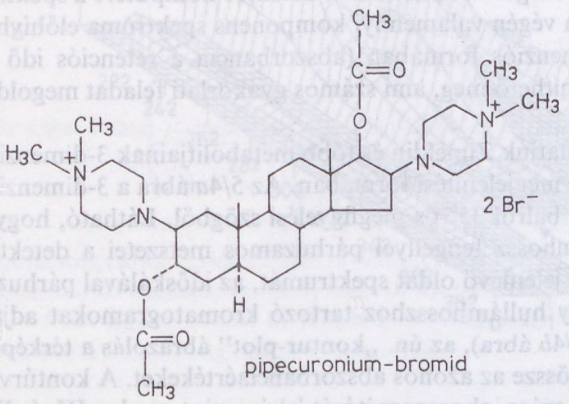
A másik esetre példaként az 5/3. ábrán bemutatjuk dehidro-pipecuronium-bromid szennyezés meghatározását pipecuronium-bromidban.



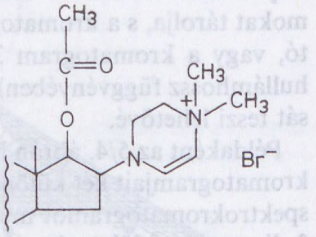
5/3. ábra. 2′(3′)-dehidro-pipecuronium bromid (*1.* csúcs) folyadékkromatográfiás meghatározása pipecuronium bromidban (*2.* csúcs). Oszlop: LiChrosorb SI-60 (5 μm), 250 × 4,6 mm. Eluens: metanol-acetonitril-cc. NH_3 43 : 43 : 14 elegyben oldott 100—100 mM ammónium-klorid és ammónium-karbonát [55].

a) 235 nm; *b)* 215 nm. (GAZDAG M., GÖRÖG S. nem közölt eredmények)

A teljesen telített vázzal rendelkező főkomponens miatt a kromatogram detektálását rövid hullámhossznál (215 nm) kell végezni. Mivel azonban a főkomponens moláris abszorpciós koefficiense még itt is viszonylag csekély érték, hiszen a kromoforok az acetoxi- és tercier aminocsoportokra korlátozódnak, az enamin típusú, intenzív spektrummal rendelkező szennyezés mennyiségét már ezen a hullámhosszon is erősen túlértékeljük, ha annak csúcsintenzitását a főkomponensére vonatkoztatjuk. Spektrumának maximumhelyén (235 nm-nél) detektálva az 1%-nyi mennyiségben jelenlevő szennyezés már egyenesen főkomponensnek látszik [22].



pipecuronium-bromid



dehidro-pipecuronium-bromid

A vázolt problémák miatt megbízható mennyiségi meghatározást csak a „szennyezés-standard" előállításával és az annak felhasználásával végzett kalibrációval lehet végezni. Amint arra a következő alfejezetben többször is rámutatunk, ennek a standardnak fontos szerep jut a kromatográfiával kapcsolt spektroszkópiai módszerekkel valószínűsített szerkezetű komponensek végleges azonosításában is.

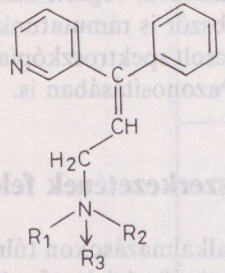
5.3.2. Az elválasztott komponensek szerkezetének felderítése

Az eddigiekben felvázolt kvantitatív analitikai alkalmazásokon túlmenően az UV-detektorral ellátott nagynyomású folyadékkromatográfnak jelentős alkalmazási lehetőségei vannak az elválasztott komponensek azonosításában és szerkezetfelderítésében is. Még a legszerényebb változtatható hullámhosszú UV-detektor is lehetővé teszi az elválasztott komponensek hozzávetőleges spektrumának meghatározását. E célból úgy járunk el, hogy a hullámhosszt 5—10 nm-enként változtatva, sorozatban ismételten felvesszük a kromatogramot, gondosan ügyelve arra, hogy a hullámhossz kivételével a többi felvételi paraméter változatlan maradjon (injektált térfogat, áramlási sebesség stb.). Ezután az azonos retenciós idővel eluálódó komponensre vonatkozóan a hullámhossz függvényében ábrázoljuk a csúcsmagasságot vagy a csúcs alatti területet. Ezzel a rendkívül idő- és munkaigényes módszerrel természetesen csak igen gyenge minőségű spektrumot kaphatunk részint a kényszerűségből nagyra választott hullámhossz-intervallumok, részint pedig a készülék monokromátorának gyenge felbontása miatt. A folyadékkromatográfia kezdeti szakaszában forgalomba kerültek

olyan készülékek, amelyek detektorába regisztráló egységet építettek be. Ezeknél a ma már elavultnak tekinthető készülékeknél úgy jártak el, hogy a kromatográfiás csúcs elérése után az áramlást megállították, majd a spektrumot álló rendszer mellett vették fel („stopped flow" módszer).

Ez idő szerint a legkényelmesebb és legmagasabb színvonalú megoldást a diódasoros detektorral ellátott készülék jelenti [14, 17, 18, 23]. Ez a detektor lényegében a 35. és 39. oldalon ismertetett elvek szerint működik. Az a körülmény, hogy a teljes spektrum felvétele milliszekundum nagyságrendű idő alatt elvégezhető, lehetővé teszi a spektrum felvételét az áramlás megállítása nélkül. A detektor komputere a spektrumokat tárolja, s a kromatogram végén valamennyi komponens spektruma előhívható, vagy a kromatogram 3-dimenziós formában (abszorbancia a retenciós idő és hullámhossz függvényében) jeleníthető meg, ami számos gyakorlati feladat megoldását teszi lehetővé.

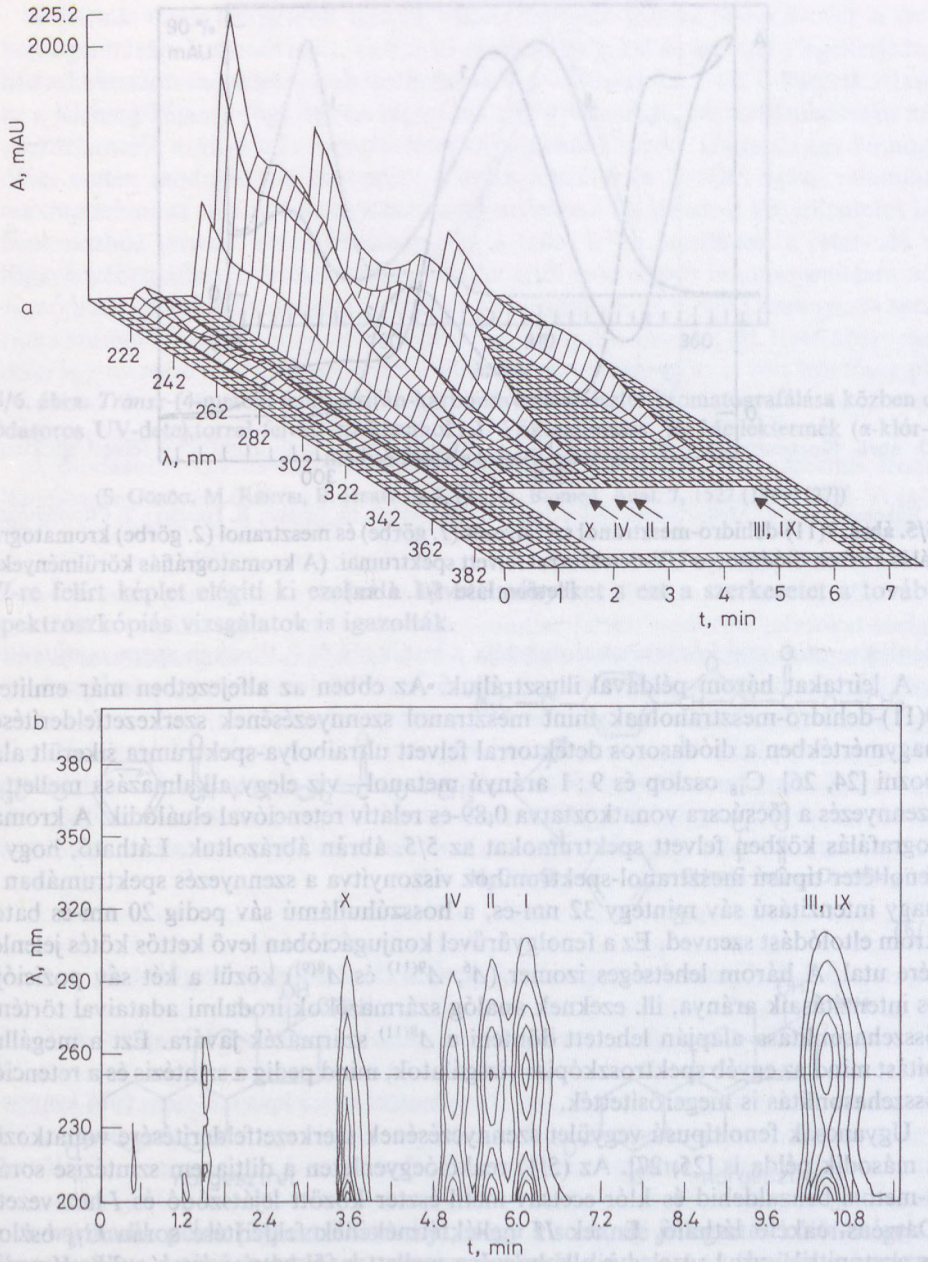
Példaként az 5/4. ábrán bemutatjuk Zimeldin és főbb metabolitjainak 3-dimenziós kromatogramjait két különböző megjelenítési formában. Az 5/4*a* ábra a 3-dimenziós spektrokromatogramot mutatja balról 35°-os megfigyelési szögből. Látható, hogy a 3-dimenziós felületnek a hullámhossz tengellyel párhuzamos metszetei a detektor cellájában egy adott pillanatban jelenlevő oldat spektrumát, az időskálával párhuzamos metszetek pedig az egy-egy hullámhosszhoz tartozó kromatogramokat adják meg. A másik megadási mód (5/4*b* ábra), az ún. „kontur-plot" ábrázolás a térképek szintvonalaihoz hasonlóan köti össze az azonos abszorbanciaértékeket. A kontúrvonalak aszimmetriája általában a csúcs inhomogenitását jelzi, amint az pl. a III. és IX. jelzésű metabolitok összeolvadt csúcsának esetében látható [15].



R_1	R_2	R_3	
CH_3	CH_3	—	I (Zimeldin)
CH_3	H	—	II
CH_3	CH_3	O	III
H	H	—	IV
CH_3	OH	—	IX

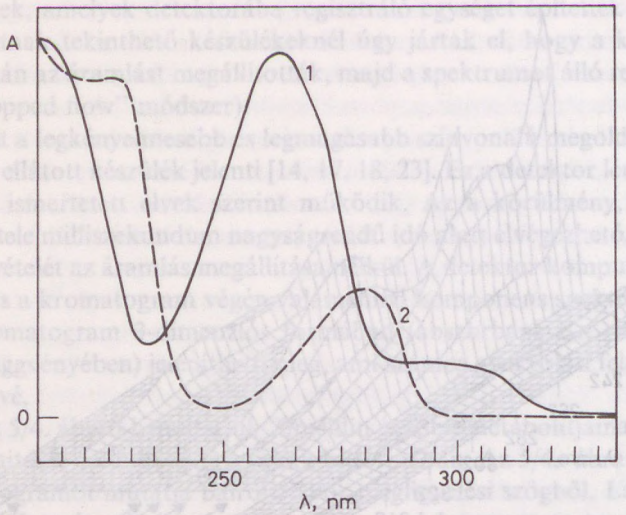
II E-izomerje: X.

Különösen fontos alkalmazási terület a folyadékkromatográfiásan elválasztott melléktermékek, szennyezések és bomlástermékek azonosítása. Bár — amint erre a 3. fejezetben rámutattunk — az ultraibolya spektrofotometria lehetőségei a szerkezetfelderítésben gyengébbek az NMR és tömegspektrometriához viszonyítva, szerencsés esetekben igen könnyen juthatunk igen hasznos adatokhoz. Ez akkor következik be, ha a vizsgált csúcshoz tartozó spektrum jelentősen vagy jellegzetesen különbözik a főkomponens hasonló körülmények között felvett spektrumától. Ennek birtokában, és ismerve a minta előéletét, gyakran fel lehet írni a munkahipotézis alapját képező szerkezetet, amit azonban mindenképpen meg kell erősíteni vagy egyéb spektroszkópiai módszerekkel és/vagy a feltételezett szerkezetű anyag szintézisével, majd a termék kromatográfiás retenciós idejének a kérdéses komponens retenciós idejével való egyeztetésével.



5/4. ábra. Zimeldin és metabolitjainak 3-dimenziós folyadék-kromatogramjai. Oszlop: 100 × 2,9 mm Nucleosil C-18 5 μm. Eluens: acetonitril — 0,05 M nátrium-hidrogén-szulfát, $6 \cdot 10^{-4}$ M *N,N*-dimetil-*N*-oktil-amin; pH 1,9—2,0 1 : 9; 1 ml/perc [49]. I—X: lásd szöveg.

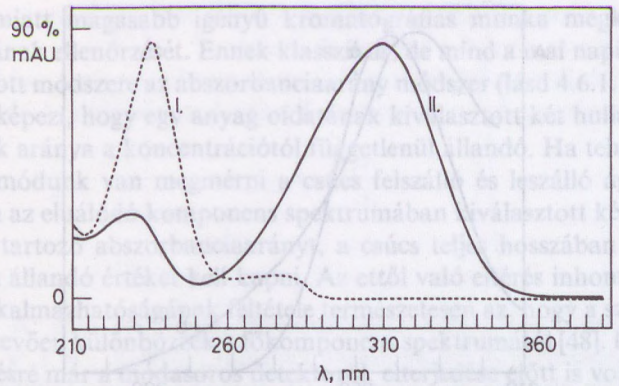
a) Térbeli ábrázolás; *b)* Kontúr-plot ábrázolás. Kontúr intervallumok: 10, 25, 50, 100, 125, 150, 175, 200 milliabszorbancia egység. (A. F. Fell, B. J. Clark, H. P. Scott, J. Pharm. Biomed. Anal. **1,** 557 (1983) [15])



5/5. ábra. 9(11)-dehidro-mesztranol szennyezés (*1.* görbe) és mesztranol (*2.* görbe) kromatografálás közben diódasoros UV-detektorral felvett spektrumai. (A kromatográfiás körülményeket illetően lásd 5/1. ábra)

A leírtakat három példával illusztráljuk. Az ebben az alfejezetben már említett 9(11)-dehidro-mesztranolnak mint mesztranol szennyezésének szerkezetfelderítését nagymértékben a diódasoros detektorral felvett ultraibolya-spektrumra sikerült alapozni [24, 26]. C_{18} oszlop és 9 : 1 arányú metanol—víz elegy alkalmazása mellett a szennyezés a főcsúcsra vonatkoztatva 0,89-es relatív retencióval eluálódik. A kromatografálás közben felvett spektrumokat az 5/5. ábrán ábrázoltuk. Látható, hogy a fenol-éter típusú mesztranol-spektrumhoz viszonyítva a szennyezés spektrumában a nagy intenzitású sáv mintegy 32 nm-es, a hosszúhullámú sáv pedig 20 nm-es batokróm eltolódást szenved. Ez a fenolgyűrűvel konjugációban levő kettős kötés jelenlétére utal. A három lehetséges izomer (Δ^6, $\Delta^{9(11)}$ és $\Delta^{8(9)}$) közül a két sáv pozíciója és intenzitásaik aránya, ill. ezeknek analóg származékok irodalmi adataival történő összehasonlítása alapján lehetett dönteni a $\Delta^{9(11)}$ származék javára. Ezt a megállapítást mind az egyéb spektroszkópiai vizsgálatok, mind pedig a szintézis és a retenció-összehasonlítás is megerősítették.

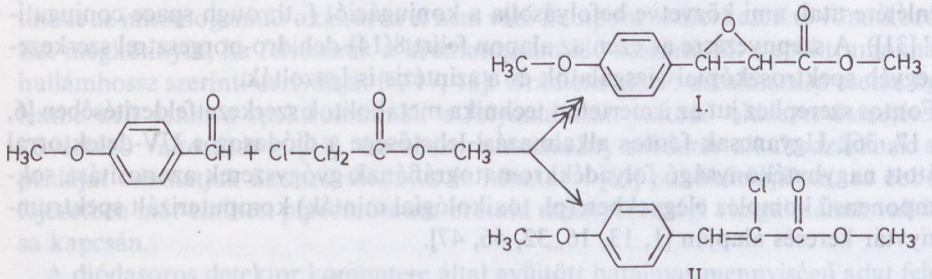
Ugyancsak fenoltípusú vegyület szennyezésének szerkezetfelderítésére vonatkozik a második példa is [25, 27]. Az (5/1) reakcióegyenleten a diltiazem szintézise során 4-metoxi-benzaldehid és klór-ecetsav-metil-észter között lejátszódó és *I*-hez vezető Darzens-reakció látható. Ennek *II* melléktermékének felderítése során C_{18} oszlop és acetonitril—víz 1 : 1 elegye alkalmazása mellett a főkomponens $k' = 3{,}8$, *II* pedig $k' = 10{,}6$ értékkel eluálódik. A diódasoros UV-spektrumok az 5/6. ábrán láthatók. A fenol-éter típusú *I* spektrumához viszonyítva *II* spektrumában a még az előző példához képest is lényegesen erőteljesebb (73 nm-es) batokróm eltolódás, amelynek során a hosszúhullámú sáv a fősáv alá kerül, két kettős kötésnek a fenolgyűrűvel való konjugációját mutatja. Az adott kiindulási anyagokból kiindulva a reakciósémában



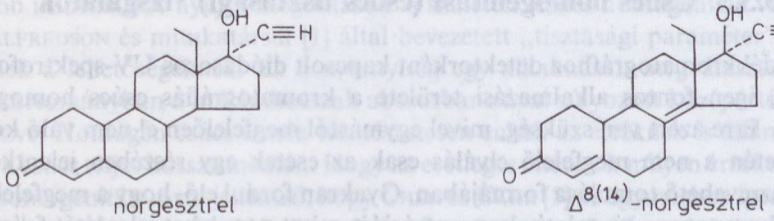
5/6. ábra. *Transz*-(4-metoxi-fenil)-oxirán-karbonsav-metil-észter kromatografálása közben diódasoros UV-detektorral felvett spektrumok. I. Főkomponens. II. Melléktermék (α-klór-4--metoxi-fahéjsav-metil-észter).

(S. Görög, M. Rényei, B. Herényi, J. Pharm. Biomed. Anal. 7, 1527 (1989) [27])

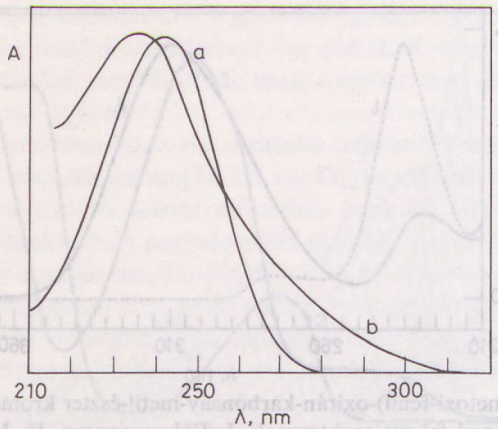
II-re felírt képlet elégíti ki ezeket a követelményeket s ezt a szerkezetet a további spektroszkópiás vizsgálatok is igazolták.



(5/1)



A harmadik példa [24] azt illusztrálja, hogy kisebb, de jellegzetes különbségek is diagnosztikus értékűek lehetnek szennyezéseknek diódasoros ultraibolya-spektrumuk alapján történő azonosításánál. Norgesztrelnek C_{18} oszlopon metanol—víz 7 : 3 elegyben való kromatografálása során a 0,84-es relatív retencióval eluálódó szennyezés, valamint a főkomponens spektrumait az 5/7. ábrán ábrázoltuk. Mindkettő jellegzetes 4-én-3-keton spektrum. A szennyezés spektrumában tapasztalható enyhe hipszokróm eltolódás és sávszélesedés a szteránvázat kimerevítő 8(14) kettős kötés



5/7. ábra. Norgesztrel kromatografálása közben diódasoros UV-detektorral felvett spektrumok.

a) Főkomponens; *b)* Melléktermék (8(14)-dehidro-norgesztrel). (S. Görög, B. Herényi, J. Chromatogr. **400**, 177 (1987) [24])

jelenlétére utal, ami közvetve befolyásolja a konjugációt („through space conjugation" [31]). A szennyezésre az ezen az alapon felírt 8(14)-dehidro-norgesztrel szerkezetet egyéb spektroszkópiai vizsgálatok és a szintézis is igazolták.

Fontos szerephez jut az ismertetett technika metabolitok szerkezetfelderítésében [6, 15, 17, 36]. Ugyancsak fontos alkalmazási lehetősége a diódasoros UV-detektorral ellátott nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiának gyógyszerek azonosítása sokkomponensű komplex elegyekben (pl. toxikológiai minták) komputerizált spektrumkönyvtár keresés alapján [1, 13, 16, 32, 46, 47].

5.3.3. Csúcs homogenitási (csúcs tisztasági) vizsgálatok

A folyadékkromatográfhoz detektorként kapcsolt diódasoros UV-spektrofotométer másik, igen fontos alkalmazási területe a kromatográfiás csúcs homogenitás vizsgálata. Erre azért van szükség, mivel egymástól megfelelően el nem váló komponensek esetén a nem megfelelő elválás csak az esetek egy részében jelentkezik a csúcsok észrevehető torzulása formájában. Gyakran fordul elő, hogy a megfelelően el nem váló komponens kis relatív koncentrációja miatt nem lehet jelenlétét felismerni. Az is előfordul, hogy két igen közeli retenciós idővel eluálódó komponens hasonló intenzitású csúcsa olvad össze megfelelőnek látszó szimmetriájú csúccsá, vagy a retenciós idők teljes azonossága esetén valóban egyetlen csúcs jelentkezik. Ez a jelenség pozitív hibát (esetenként igen súlyos hibát) okozhat elsősorban többkomponensű elegyek (biológiai minták, szennyezettségi profilok stb.) egy-egy komponensének mennyiségi elemzésében.

A leírtak miatt magasabb igényű kromatográfiás munka megköveteli a csúcs homogenitásának ellenőrzését. Ennek klasszikus, de mind a mai napig legelterjedtebben alkalmazott módszere az abszorbanciaarány módszer (lásd 4.6.1. fejezet). Alapját az a jelenség képezi, hogy egy anyag oldatának kiválasztott két hullámhosszán mért abszorbanciák aránya a koncentrációtól függetlenül állandó. Ha tehát egy homogén csúcs esetén módunk van megmérni a csúcs felszálló és leszálló ágán, valamint a maximumban az eluálódó komponens spektrumában kiválasztott két jellegzetes hullámhosszhoz tartozó abszorbanciaarányt, a csúcs teljes hosszában a retenciós idő függvényében állandó értéket kell kapni. Az ettől való eltérés inhomogenitásra utal. A módszer alkalmazhatóságának feltétele természetesen az, hogy a szennyezés spektruma számottevően különbözzék a főkomponens spektrumától [48]. Ilyen abszorbanciaarány-mérésre már a diódasoros detektorok elterjedése előtt is volt lehetőség pl. a „stopped flow" technika alkalmazásával [64] vagy két különböző hullámhosszra beállított sorbakötött detektor segítségével [61].

A diódasoros UV-detektorok elterjedésével természetesen tetszés szerinti abszorbanciaarány mérése és folyamatos regisztrálása egyszerű rutinfeladattá válik. A módszert a legáltalánosabban HPLC-módszerek validálása során szinte kötelezően alkalmazzák, és megfelelően optimalizált rendszer esetén általában azt állapítják meg, hogy a csúcs homogén. Amennyiben inhomogenitást észlelünk, a kromatográfiás csúcs felszálló és leszálló ágán, valamint a maximumban felvett spektrum adatokat szolgáltathat az inhomogenitás okaira, az el nem váló komponens szerkezetére vonatkozóan. Ezt megkönnyíti, ha felvesszük a kromatogram idő szerinti, ill. a spektrumoknak a hullámhossz szerinti deriváltját [6, 17, 18]. Grádiens elúció alkalmazása esetén figyelembe kell venni a spektrumoknak a folyamatosan változó oldószer-összetételből következő változását is [11]. Az abszorbanciaarány módszer alkalmazásának szép példáját találhatjuk Szepesi, Gazdag és Mihályfi [65] publikációjában, az ebben a fejezetben már említett pipecuronium-bromid szennyezettségi vizsgálatának validálása kapcsán.

A diódasoros detektor komputere által gyűjtött hatalmas mennyiségű adat feldolgozásának fejlesztése révén az egyszerű abszorbanciaarány módszernél érzékenyebb és több információt nyújtó megoldások is születtek csúcs homogenitás vizsgálatára. Az Alfredson és munkatársai [1] által bevezetett „tisztasági paraméter" pl. egyike ezeknek a lehetőségeknek. Ez a mennyiség egy alkalmasan megválasztott hullámhossztartományban a hullámhosszak abszorbanciával súlyozott középértéke nm-ben kifejezve. Homogén csúcs esetén természetesen ennek az értéknek is állandónak kell lenni a csúcs teljes hossza mentén. Hogy az esetleges eltérések milyen érzékenyen jelzik az inhomogenitást, arra jellemző, hogy Chen és Carr [5] az egymáshoz igen közel álló spektrummal és retenciós idővel rendelkező temazepam (3,32 perc) és lormetazepam (3,29 perc) (a képleteket lásd 378. oldal) vizsgálata során még 0,5% lormetazepam szennyezést is ki tudott mutatni temazepamban.

Ha az eddig ismertetett kvalitatív jellegű módszerek alkalmazása során azt észleljük, hogy a kromatográfiás csúcs inhomogén, tehát a mennyiségi elemzés közvetlenül nem végezhető el, akkor általában a kromatográfiás körülmények megváltoztatásával igyekszünk az elválasztást megjavítani. Ha erre valamilyen oknál fogva nincs lehetőségünk, az ún. spektrumszuppressziós módszerek alkalmazásával lehetőség nyílik

részlegesen vagy teljesen átfedő csúcsok algebrai-dekonvolúciós úton való elválasztására és ezek után a mennyiségi analízis elvégzésére.

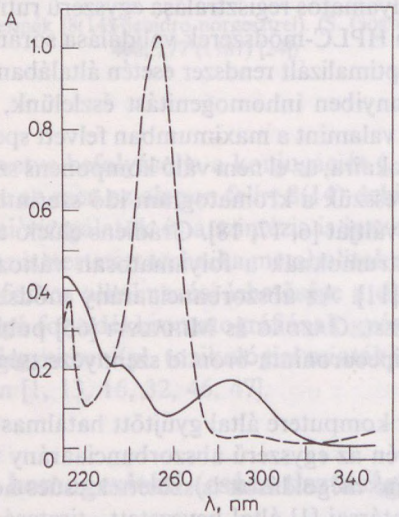
A legegyszerűbb ilyen megközelítés CARTER és munkatársainak módszere [4], akik az abszorbanciaarányt a kromatogramok lineáris kombinációjává alakítják át:

$$\frac{A_{\lambda_1}}{A_{\lambda_2}} = k_{1,2} \,. \tag{5/2}$$

Innen

$$A_{\lambda_1} = k_{1,2} \cdot A_{\lambda_2} \,. \tag{5/3}$$

$k_{1,2}$ az elnyomandó komponens spektrumából állapítható meg. A legegyszerűbb esetben két izoabszorpciós hullámhosszt keresünk, ahol $k_{1,2} = 1$, s így $A_{\lambda_1} = A_{\lambda_2}$, különbségük pedig zéró lesz. Példaként az 5/8. ábrán bemutatjuk karbamazepin (lásd 401. oldal) és szennyezésének, az akridonnak spektrumait. A két kiválasztott hullámhossz a tökéletesen együtt eluálódó két csúcs detektálására 256 és 307 nm volt.

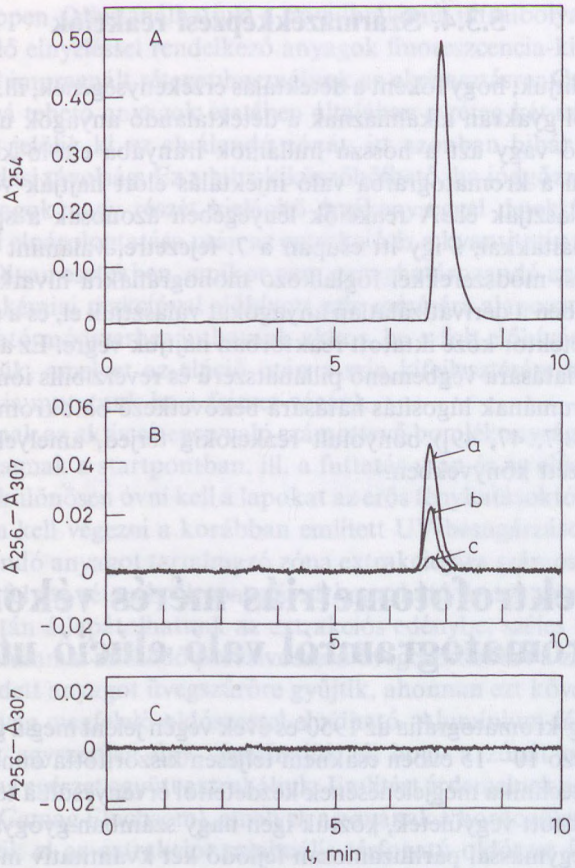


5/8. ábra. Ultraibolya spektrumok ——— Karbamazepin – – – – akridon. Oldószer: metanol-víz 55:45; $c = 10$ mg/liter.

(G. T. CARTER, R. E. SCHIESSWOHL, H. BURKE, R. YANG, J. Pharm. Sci. **71**, 317 (1982) [4])

Az eredmény az 5/9. ábrán látható. Az *A* kromatogram a két átfedő csúcs 254 nm-nél detektálva. A *C* kromatogram tiszta karbamazepin görbéje, ami a csúcsnak a fenti két hullámhosszon mért abszorbancia különbségének regisztrálása révén történt teljes elnyomását jelzi. A *B* kromatogram *a*, *b* és *c* görbéi azt jelzik, hogy a főkomponens elnyomása után 0,1% nagyságrendű szennyezés is jól mérhető.

A spektrálszuppressziós módszert FELL és munkatársai a két hullámhosszas módszer sok hullámhosszra való továbbfejlesztésével, a komputer által tárolt gyakorlatilag valamennyi abszorbanciaadat felhasználásával az eddig ismertetetteknél nehe-



5/9. ábra. Akridon szennyezést tartalmazó karbamazepin folyadékkromatogramjai. Oszlop: 300 × 3,9 mm fordított fázisú oszlop. Eluens: metanol-víz 55 : 45, 1 ml/perc. Injektált mennyiség: kb. 5 μg karbamazepin. A hullámhosszakat, ill. azok kombinációit lásd az ábrán.

A) 1% akridont tartalmazó karbamazepin; *B.a)* 1% akridont tartalmazó karbamazepin; *B.b)* 0,5% akridont tartalmazó karbamazepin; *B.c)* 0,1% akridont tartalmazó karbamazepin; *C)* Karbamazepin akridon szennyezés nélkül. (G. T. CARTER, R. E. SCHIESSWOHL, H. BURKE, R. YANG, J. Pharm. Sci. **71**, 317 (1982) [4])

zebb problémák nagyobb érzékenységű és pontosságú megoldására tették alkalmassá [15, 19]. Bár ennek a módszernek matematikai részletei túlhaladják könyvünk kereteit, megemlítjük, hogy MARR, HORVÁTH, CLARK és FELL közleményükben [44] beszámoltak az eredetileg két átfedő csúcsban eluálódó komponensre kidolgozott módszer továbbfejlesztéséről többkomponensű rendszerekre. Ezt *Catharanthus roseus* extraktum HPLC analízise során átfedő csúcsot adó ajmalicin, vinkrisztin és katarantin egyes komponenseinek a másik kettő elnyomása után történő kvantitatív meghatározásával illusztrálták.

5.3.4. Származékképzési reakciók

Végül megemlítjük, hogy főként a detektálás érzékenységének, ill. szelektivitásának növelése céljából gyakran alkalmaznak a detektálandó anyagok ultraibolya-látható elnyelését növelő vagy azt a hosszú hullámok irányába eltoló kémiai reakciókat. Ezeket általában a kromatográfba való injektálás előtt hajtják végre, s így már a származékot választják el. A reakciók lényegében azonosak a spektrofotometriás célra is felhasználtakkal, s így itt csupán a 7. fejezetre, valamint a kromatográfiás származékképzési módszerekkel foglalkozó monográfiákra hivatkozunk [3, 21, 39, 40]. Számos esetben a derivatizálatlan anyagokat választjuk el, és a származékképzést az oszlop és a detektor közé iktatott reaktorban hajtjuk végre. Ez a származékképzés pH-változtatás hatására végbemenő pillanatszerű és reverzíbilis ionizációtól (pl. barbiturátok spektrumának lúgosítás hatására bekövetkező batokróm eltolódására alapozott módszer [7, 47, 49]) bonyolult reakciókig terjed, amelyekre számos példa található az idézett könyvekben.

5.4. Spektrofotometriás mérés vékonyréteg-kromatogramról való elúció után

A vékonyréteg-kromatográfia az 1950-es évek végén jelent meg a gyógyszeranalízisben, s a következő 10—15 évben csaknem teljesen kiszorította onnan a papírkromatográfiát. Az új technika megjelenésének kezdeteitől érvényesült a törekvés felhasználására az elválasztott vegyületek, köztük igen nagy számban gyógyszerek kvantitatív analízisére. Az egymással párhuzamosan fejlődő két kvantitatív módszer, az elúciós és *in situ* módszerek közül ebben a fejezetben az előbbit tárgyaljuk.

Nem lehet célja ennek az összeállításnak a vékonyréteg-kromatográfia alapjainak és technikájának akárcsak vázlatos ismertetése sem. A nagyszámú monográfia és kézikönyv közül Stahl alapvető könyvét [53], Tyihák [60], Touchstone és Dobbins [56] műveit, valamint Treiber [59], továbbá Sherma és Fried [52] közelmúltban megjelent könyveit, a gyógyszer-analitikai alkalmazások területéről pedig Macek könyvét [42] említjük meg.

Az elsősorban a kromatográfiás elválasztás hatékonysága szempontjából fontos tényezők a kvantitatív mérés sikerét is jelentősen befolyásolják, hiszen nem megfelelően elváló foltok kvantitatív mérése csak nagy hibával lehetséges. Így a szorbens és a kifejlesztő folyadékrendszer helyes megválasztása mellett jelentős tényező a rétegre való felvitel módja. Megfelelően illékony oldószer felhasználásával a réteg megsértése nélkül minimális felületre kell felvinni a vizsgálandó oldat pontos térfogatát. A csíkban való felvitel előnye az, hogy nagyobb mennyiségű anyag felvitele mellett is jobb az elválasztás, mint a pontszerű felvitel esetében.

A kromatogram kifejlesztése és az oldószer eltávolítása után a kvantitatív analízis sikerét meghatározó első lépés az eluálandó zóna kijelölése. Színes vagy hosszúhullámú ultraibolya fényben (366 nm) fluoreszkáló anyagok esetében ez könnyen elvégez-

hető. Hasonlóképpen felhasználhatjuk a rövidhullámú ultraibolya tartományban (254 nm) megfelelő elnyeléssel rendelkező anyagok fluoreszcencia-kioltását, ha fluoreszkáló anyaggal impregnált réteget használunk az elválasztásra. Csak kémiai reakció útján láthatóvá tehető anyagok esetében általában a réteg két szélén futtatják le a reakciót, és így jelölik ki az eluálandó zónát; itt azonban hibát okozhat a nem egyenletes vándorlási távolság. Ez a hiba kiküszöbölhető, ha jódgőzzel hívunk elő: az ui. a szerves anyagok nagy részét kielégítő érzékenységgel detektálja, s az esetek többségében a jód elpárologtatása után az extrakció és a kvantitatív mérés zavartalanul elvégezhető. Olyan esetekben, amikor nem a meghatározandó anyag saját fényelnyelésére, hanem kémiai reakcióval előhívott szín mérésére alapozzuk a meghatározást, jól használható módszerhez juthatunk akkor, ha a folt előhívását ugyanazzal a reagenssel végezzük, amelyet az elúció után a szín kifejlesztésére használunk (erre gyakorlati példát is mutatunk be a fejezet végén).

Egyes anyagoknak az aktív rétegen való számottevő bomlékonysága miatt minimalizálni kell az anyagnak a startpontban, ill. a futtatás után és az elúció előtt a lapon eltöltött idejét, és különösen óvni kell a lapokat az erős fényhatásoktól. Ilyen meggondolásból óvatosan kell végezni a korábban említett UV-besugárzásos detektálást is.

A meghatározandó anyagot tartalmazó zóna extrakciójára számos megoldás ismeretes. Az üvegre felvitt rétegekről spatulával kaparható le az anyagot tartalmazó szorbens, amit aztán átlapátolhatunk az extrakciós edénybe, széles körben használnak azonban vákuummal működő porszívószerű üvegeszközöket a zóna leszippantására. Ezek a leszedett anyagot üvegszűrőre gyűjtik, ahonnan ezt követően a szorbensen megkötött anyag megfelelő oldószerrel eluálható. Alumínium fóliára felvitt kész réteg extrakcióját egyszerűen úgy végezhetjük el, hogy a zónát ollóval kivágjuk, felaprítjuk, majd az egészet együtt extraháljuk. Említést érdemelnek azok az extraháló berendezések (pl. Camag Eluchrom), amelyek a zónának a hordozólapról való eltávolítása nélkül végzik el az extrakciót minimális térfogatú oldószer felhasználásával.

Oldószerként az eluálandó anyag oldékonyságától függően az oldószerek (elsősorban a közepesen polárisok) széles skáláját használják. A kötődés mértékétől függően egyszerű rázogatás is elégséges lehet a kvantitatív extrakcióhoz, de szükség lehet erőteljes oldószeres kezelésre (pl. Soxhlet-extrakcióra) is. Gyógyszervegyületek széles körével nyert tapasztalatok alapján megállapítható, hogy igen nehéz teljesen kvantitatív visszanyerést elérni: néhány százalékos irreverzíbilis adszorpcióval gyakran kell számolni. Ha ennek mértéke valóban nem haladja meg a néhány százalékot, az ebből származó negatív hiba kiküszöbölhető, ha a vizsgált minta foltja mellé ugyanarra a lapra kb. ugyanolyan mennyiségben standardokat is felviszünk, s a számolásnál az ilyen módon kezelt standardra nyert jelet használjuk. Az extrakcióval kapcsolatban még azt is érdemes megjegyezni, hogy amennyiben a kiextrahált réteganyagot szűréssel különítjük el az extraktumtól, a szorbens kolloidális méretű részecskéi könnyen átmehetnek a szűrőn, s ez fényszóródás révén hibát okozhat a spektrofotometriás mérésnél; ezért célszerűbb szűrés helyett centrifugálást alkalmazni.

A vázolt módon előkészített oldatban a meghatározandó komponens különféle analitikai módszerekkel határozható meg. Leggyakrabban saját fényelnyelésen, ill. kémiai reakción alapuló spektrofotometriás módszert alkalmaznak. Elúción alapuló spektrofotometriás módszerek igen nagy számban találhatók az irodalomban. Ezek

közül számos kerül ismertetésre a 10. fejezetben. Itt csak két könyvrészletre hívjuk fel a figyelmet. SHELLARD alapvető könyvében COURT fejezete [8] foglalja össze a terület metodikai problémáit és korai irodalmát. Részletes fejezet foglalkozik a területtel TOUCHSTONE és DOBBINS könyvében [56] is.

Amennyiben a mérést saját ultraibolya fényelnyelésre alapozzuk, sok gondot okoznak a rétegről leoldódó szennyezések, amelyek spektrumai tipikus háttérelnyelésként jelentkeznek. Ezek hatása a réteganyag előzetes oldószeres extrakciójával vagy a rétegen a felcseppentés előtt a kifejlesztő elegy előzetes kifuttatásával csökkenthető, de a rövidhullámú (240 nm alatti) ultraibolya tartományban való mérést lehetőség szerint célszerű elkerülni. A háttérproblémák megoldását illetően a 4.3. fejezetre utalunk, ezen a speciális területen azonban az bizonyult a legcélravezetőbb módszernek a háttér kiküszöbölésére, hogy a mérések során összehasonlító oldatként olyan elegyet használunk, amely a kromatogram üres zónájából vett, a vizsgált zónával azonos területű és azonos körülmények között extrahált réteganyagot tartalmaz. Az irodalomban található igen nagyszámú alkalmazási példa közül MACIOCI és FIOTEK [43] módszerét mutatjuk be kloramfenikol, hidrokortizon és metil-parabén meghatározására kenőcs készítményben. A készítmény metanolos extraktumát viszik fel szilikagél rétegre a megfelelő standardokkal együtt. Diklór-metán—*n*-butanol—aceton 254 : 30 : 14 elegyével való futtatás után a foltokat fluoreszcenciakioltás alapján jelölik ki. Az extrakciót a lapról való lekaparás után metanollal való 10 perces rázogatással végzik el, majd az oldatot centrifugálják. A három meghatározandó komponenst (a fenti sorrendben) 274, 242, ill. 255 nm-nél való abszorbanciamérés segítségével határozzák meg. Összehasonlító oldatként azonos módon készített üres réteg extraktumot használnak. A visszanyerési értékek 98,9%, 100,9% és 96,4% voltak, s a relatív standard deviáció egyik esetben sem haladta meg a 0,6%-ot. (A COURT [8] által összegyűjtött nagyszámú módszer relatív standard deviációja ennél nagyobb érték, de a korszerűnek tekinthető módszerek esetében általában nem haladja meg a 2—3%-ot.)

A saját elnyelésen alapuló módszernél gyakrabban alapozzák a mérést kémiai reakcióval előhívott szín mérésére. Ebben az esetben a rétegről kioldódó anyagok fényelnyelése nem okoz problémát, és spektrofotometriásan nem kielégítően aktív anyagok meghatározása is elvégezhető. A mérésre felhasználható reakciók ugyanazok, amiket kromatográfiás elválasztás nélkül alkalmaznak (lásd 7. fejezet), és a reakció, valamint a spektrofotometriás mérés kivitelezése sem különbözik különösebben a nem kromatográfiás módszereknél követett gyakorlattól.

Példaként HORVÁTH [33] módszerét ismertetjük Digitalis lanata digoxin, ill. enzimatikus, majd nátrium-metoxidos előkezeléssel digoxinná alakítható komponenseinek meghatározására. Az enzimes hasítás után etil-acetátos extrakció, szárazra párolás, majd nátrium-metoxidos dezacetilezés következik. A metanol-kloroformos oldatot visszük fel a szilikagél rétegre a megfelelő standardokkal együtt. A kifejlesztést diklór-metán—metanol—víz 85 : 13,5 : 1,5 elegyében végezzük. A foltok bejelölése céljából a lapot bepermetezzük xanthidrol reagenssel (0,1%-os oldat jégecet—kénsav—sósav 96 : 3 : 1 elegyében), s az előhívást 50 °C-ra való melegítéssel végezzük. Az alumínium fóliára felvitt lapról kivágjuk a minta és a standard megfelelő zónáit. A rétegről való extrakciót 5 ml 80 °C-os jégecettel 15 percig végezzük, majd ugyancsak

80 °C-on 2 percig reagáltatjuk az oldatot 5 ml fenti xanthidrol reagenssel. Az abszorbancia leolvasását 530 nm-nél végezzük el reagens összehasonlító oldattal szemben. A módszer relatív standard deviációja 2,5%, ami jellemző értéknek tekinthető a hasonló módszerek pontosságára. Mivel az elúciós módszereknek a leírtak alapján számos hibaforrása van, a fenti pontosság csak igen gondos, precíz munkával és megfelelő gyakorlat birtokában érhető el. Ez a körülmény, valamint a módszer meglehetősen idő- és munkaigényes volta az utóbbi időben háttérbe szorította ezt a módszert olyan laboratóriumokban, ahol mód van az elválasztást igénylő problémák vékonyréteg-denzitometriás (lásd a következő alfejezet) vagy nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás megoldására. Ugyanakkor a módszer egyszerűsége és bármilyen szerényen felszerelt laboratóriumban való felhasználhatósága ma is széles körben biztosítja alkalmazását.

5.5. Vékonyréteg-denzitometria*

Az előző fejezetben tárgyalt elúciós módszer legproblematikusabb pontja az elválasztott anyagok visszanyerése a rétegről az analízis céljaira. Ez a legtöbb hiba forrása; ez határolja be a módszer érzékenységét; ez az oka a módszer idő- és munkaigényességének. Ezért már a rétegkromatográfia kezdeteitől érvényesült a törekvés az elválasztott anyagok fényelnyelésén alapuló kvantitatív analízisnek a lapról való eluálás nélkül, ún. *in situ* módszerrel való végrehajtására. Az előző fejezetben is említett, 1968-ban megjelent könyvben már terjedelmes fejezet tárgyalta a denzitometria lehetőségeit a kvantitatív vékonyréteg-kromatográfiás analízisben [51].

A kezdeti módszerek, ahol a mérést elsősorban a folt planimetriásan mért területe és a benne levő anyag koncentrációja közötti összefüggésre alapozták, számos bizonytalansági tényezőt tartalmaztak: a műszerek csekély érzékenysége miatt a rétegre viszonylag sok, 10—100 μg anyagot kellett felvinni, ennek következtében nemlineáris kalibrációs görbéket kellett használni. A mért folt területe erősen függött a felvitt folt területétől, az R_f-értéktől stb.

A denzitométerek fejlődése az utolsó 10—20 évben mélyreható változásokat hozott az *in situ* kvantitatív vékonyréteg-denzitometria lehetőségei vonatkozásában. Ez nagyarányú fejlődést eredményezett a felhasználás területén is; számos területen, így a gyógyszer-analitikában is a vékonyréteg-denzitometria a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával és a gázkromatográfiával egyenrangú módszerré fejlődött. Ezt specializált monográfiák megjelenése jelzi [2, 38, 58]; továbbá számos vékonyréteg-kromatográfiás könyv jelentős része foglalkozik a denzitometria elméletével, módszertanával és gyakorlati alkalmazásaival [20, 42, 52, 53, 57, 59, 60, 62].

A fényreflexió mérésével kapcsolatos elméleti és gyakorlati alapokat illetően könyvünk 2.13. fejezetére utalunk. A modern vékonyréteg-denzitometria előnyös tulajdonságait a következőkben foglaljuk össze.

* Lásd még a 2.13. fejezetet.

a) Kitűnő érzékenység. Reflexiós és transzmissziós technikával általában 0,5—5 μg/folt az optimális méréstartomány. Fluorimetriás módszerrel vagy a fenti technikákkal, de mikrooptika alkalmazásával ez 10—100 ng/foltra csökkenthető. Ez 2—3 nagyságrenddel nagyobb érzékenység annál, ami az elúciós technikával elérhető, és kb. megfelel a lángionizációs detektorral végzett gázkromatográfiás, ill. az UV-detektorral végzett nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfiás detektálás érzékenységének.

b) Lineáris kalibráció. Amint arra már a 2.13. fejezetben utaltunk, a fenti alacsony koncentrációk vizsgálata esetén lineáris kalibrációhoz juthatunk olyan esetekben is, ahol nagyobb koncentrációk esetén már görbét kapnánk. (Ez azt jelenti, hogy a denzitogramon, ahol egy-egy kromatográfiás foltnak egy-egy csúcs felel meg, a csúcsmagasság vagy még inkább az integrátorral meghatározható csúcs alatti terület lineáris függvénye a kromatogramra felvitt anyag mennyiségének.)

c) A HPTLC technika alkalmazhatósága. Az első két pontban leírtak alapján kézenfekvő, hogy a denzitometria kitűnően összekapcsolható a nagyhatékonyságú vékonyréteg-kromatográfiával (HPTLC) [2, 38]. Így nemcsak a módszer érzékenysége, hanem felbontó képessége is megközelíti, ill. egyes esetekben el is éri a gáz- és nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfiáét.

d) Vizsgálatok lehetőségei az ultraibolya tartományban. Mivel a ma használatos igényesebb denzitométerek már fel vannak szerelve ultraibolya fényforrással, ill. detektorral is, lehetőség nyílik számos vegyület mérésére saját fényelnyelése alapján, származékkészítés nélkül.

e) Reflexiós spektrumok felvételének lehetősége. Ismeretlen elegyek vizsgálata esetén igen nagy előnyt jelent a korszerű denzitométerek által biztosított lehetőség reflexiós spektrumok felvételére, mivel ezek általában igen hasonlóak az oldatfázisban felvett abszorpciós spektrumokhoz. Egy ilyen spektrumot (2/19. ábra) a 61. oldalon mutattunk be.

f) Nagy mérési kapacitás és nagyfokú rugalmasság. Mivel a kromatográfiás rendszer optimálása a készüléktől függetlenül végezhető el, és mivel a denzitogram felvétele a legrövidebb időt veszi igénybe a munkafolyamatok közül (mintaelőkészítés, felvitel a lapra, kifejlesztés), egyetlen denzitométer több szimultán dolgozó kromatográfus analitikus által termelt kromatogramok mérésére alkalmas.

g) Sokoldalú mérési lehetőségek. Ezen egyrészt azt értjük, hogy a módszer alkalmas a saját fényelnyelésen alapuló mérés mellett kémiai reakciókra alapozott mérésre is. Ezen belül alkalmazhatunk kémiai reakciót a kromatografálás előtt (ez esetben a denzitometrálható származékot választjuk el) vagy utána, amikor is az elválasztott foltot tesszük láthatóvá és ezáltal denzitometrálhatóvá megfelelő reagenssel való bepermetezés vagy abba való bemártás útján. Ez utóbbi esetben a mérés feltétele, hogy a jelenlevő reagensfelesleg ne zavarja a denzitometriás mérést. Az ilyen célra felhasznált kémiai reakciók döntő többségükben megegyeznek a kémiai reakciókra alapozott nemkromatográfiás spektrofotometriás analízisben használt reakciókkal (lásd 7. fejezet).

Másrészről a sokoldalú mérési lehetőségek a műszeres mérési technika oldalán jelentkeznek. Lehetőség van transzmissziós módban, reflexiós módban és fluoreszcencia módban való mérésre. Ez utóbbi mód, amely megfelelően erős fluorofor vagy ezzé átalakítható anyagok esetében a mérési tartományt a pikogramm koncentrációtarto-

mányba tolhatja el, nem képezi tárgyát könyvünknek. Transzmissziós módban csak színes foltokat mérhetünk üveglapra felvitt réteg alkalmazásával. A legáltalánosabban a reflexiós üzemmód használható.

Mindkét üzemmódban lehet egy- és kétsugármenetes készülékkel is mérni. Ez utóbbi esetben folyamatosan pásztázzuk a réteg üres sávját is: ilyen módon csökkenthetők a réteg egyenetlenségeiből, a réteg és az oldószerek szennyezéseiből stb. származó zavaró hatások, javul a jel—zaj viszony és az alapvonal egyenletessége. Hasonló hatás érhető el a kétmonokromátoros, két hullámhosszon szimultán pásztázó és a két hullámhosszon nyert jel különbségét regisztráló készülékkel [12, 63]. (A kéthullámhosszas mérési elv részleteit illetően lásd a 4.7. fejezetet.)

A legtöbb készülék esetében a kromatogram felvételét szolgáló fénynyaláb a jó felbontás érdekében keskeny, de szélessége lehetővé teszi a folt teljes szélességének egyidejű pásztázását, használatosak azonban az ún. „flying spot" denzitométerek is, amelyeknél olyan mérési mód is van, ahol a közelítőleg pontszerű fénynyaláb alatt a kromatogramot nemcsak a kromatogram futási irányában (vagy arra merőlegesen) mozgatjuk, hanem egyidejűleg mindkét irányban váltakozva, „cikk-cakkban" vagy más megfelelő út mentén úgy, hogy a kromatogram csúcsában a folt valamennyi pontjáról összegyűjtött jelek összegzését regisztrálhatjuk.

A sokféle műszeres megoldás és mérési technika lehetővé teszi az adott feladathoz legmegfelelőbb megoldás kiválasztásánál a nagyfokú rugalmasságot. Ennek eredményeként a vékonyréteg-denzitometriát széles körben használják a gyógyszer-analitikában a legváltozatosabb problémák (köztük a gyógyszer-analitika legkényesebb problémáinak) megoldására: gyógynövény-analitika, alapanyagok szennyezettségi profiljának vizsgálata, kiszerelt készítmények hatóanyagtartalmának meghatározása és stabilitásának vizsgálata, sőt biológiai minták vizsgálata is. Az idézett könyvek számos módszert közölnek, nagy a száma az irodalomban megjelent közleményeknek is; ezeknek akárcsak vázlatos ismertetése azonban már kívül esne könyvünk célkitűzésein.

Példaképpen mindössze egyetlen módszert, Horváth és Iványi [34] módszerét mutatjuk be vinblasztin meghatározására *Catharantus roseus* kivonatában. A drogban mintegy 0,02%-ban jelenlevő hatóanyag meghatározása nagyszámú, a vinblasztinnál sok esetben nagyobb (néhány esetben nagyságrendileg nagyobb) mennyiségben jelenlevő társalkaloid mellett valóban igen kényes feladat. A meghatározást 10 g szárított drogból végezzük el. Itt nem részletezett etil-acetátos extrakció, az extraktum szárazra párolása és a maradék 10 ml 1 : 1 arányú metanol-kloroform elegyben való oldása után nyert oldat 6μl-ét visszük fel megfelelő mennyiségű vinblasztin standard oldat társaságában 5 mm hosszú csík formájában a 20 × 20 cm-es, alumínium fóliás szilikagél 60 lapra. Kétdimenziós futtatás után (I: etil-acetát—benzol—etanol—10%-os ammónia 100 : 5 : 23 : 2,3; II. diklór-metán—metanol—víz 100 : 7 : 0,7) a foltokat 254 nm-es ultraibolya fényben megjelöljük, majd denzitometrálunk. A reflexiós módban végzett felvételnél a vinblasztin saját spektrumának (lásd 3/24. ábra, 107. oldal) maximumhelyén, 289 nm-nél mérünk; az alkalmazott rés hossza 10 mm, szélessége 0,2 mm. A vinblasztintartalmat a csúcs alatti területből a standard csúcs alatti terület segítségével számítjuk ki. Megfelelő standardok alkalmazásával ugyanarról a kromatogramról más alkaloidok is hasonlóan mérhetők. A relatív standard deviáció 7,5%, ez azonban egyszerűbb feladatok megoldása esetén 1—2%-ig csökkenthető.

Irodalom

1. Alfredson, T., Sheehan, T., Lenert, T., Aamodt, S., Correia, L., J. Chromatogr. **385,** 213 (1987).
2. Bertsch, W., Hara, S., Kaiser, R. E., Zlatkis, A. (ed.), Instrumental HPTLC, Hüthig Verlag, Heidelberg 1980.
3. Blau, K., King, G. S., Handbook of Derivatives for Chromatography. Heyden, London 1978.
4. Carter, G. T., Schiesswohl, R. E., Burke, H., Yang, R., J. Pharm. Sci. **71,** 317 (1982).
5. Chan, H. K., Carr, G. P., J. Pharm. Biomed. Anal. **8,** 271 (1990).
6. Clark, B. J., Fell, A. F., Scott, H. P., Westerlund, D., J. Chromatogr. **286,** 261 (1984).
7. Clark, C. R., Chan, J.-L., Anal. Chem. **50,** 635 (1978).
8. Court, W. E., „Quantitative Thin-Layer Chromatography using Elution Techniques", in E. J. Shellard: Quantitative paper and Thin-Layer Chromatography. Academic Press, London—New York 1968, 29—49. old.
9. Deyl, Z., Macek, K., Janák, J., (ed.) Liquid Column Chromatography. Elsevier, Amsterdam—Oxford—New York 1975.
10. Doyle, T. D., Levine, J., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **61,** 172 (1978).
11. Drouen, A. C. J. H., Billiet, H. A. H., De Galan, L., Anal. Chem. **56,** 971 (1984).
12. Ebel, S., Herold, G., Arch. Pharm. **309,** 660 (1976).
13. Ebel, S., Mueck, W., Z. Anal. Chem. **331,** 359 (1988).
14. Fell, A. F., Anal. Proc. **20,** 356 (1983).
15. Fell, A. F., Clark, B. J., Scott, H. P., J. Pharm. Biomed. Anal. **1,** 557 (1983).
16. Fell, A. F., Clark, B. J., Scott, H. P., J. Chromatogr. **316,** 423 (1984).
17. Fell, A. F., Scott, H. P., J. Chromatogr., Biomed. Appl. **273,** 3 (1983).
18. Fell, A. F., Scott, H. P., Gill, R., Moffat, A. C., Chromatographia **16,** 69 (1982).
19. Fell, A. F., Scott, H. P., Gill, R., Moffat, A. C., J. Chromatogr. **282,** 123 (1983).
20. Frei, R. W., „Reflectance Spectroscopy in Thin-Layer Chromatography" in A. Niederwieser, G. Pataki: Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods. Vol. II. 1—61. old., Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor 1971.
21. Frei, R. W., Lawrence, J. F., Chemical Derivatization in Analytical Chemistry. Vol. 1—2, Plenum Press, New York, London 1982.
22. Gazdag, M., Görög, S., nem közölt eredmények.
23. George, S. A., Maute, A., Chromatographia **15,** 419 (1982).
24. Görög, S., Herényi, B., J. Chromatogr. **400,** 177 (1987).
25. Görög, S., Herényi, B., Rényei, M., Georgakis, A., Balogh, G., Csehi, A., Gizur, T., Magyar Kém. Folyóirat **95,** 504 (1989).
26. Görög, S., Laukó, A., Herényi, B., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 697 (1988).
27. Görög, S., Rényei, M., Herényi, B., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 1527 (1989).
28. Graham, R. E., Biehl, E. R., Kenner, C. T., J. Pharm. Sci. **68,** 871 (1979).
29. Graham, R. E., Kenner, C. T., J. Pharm. Sci. **62,** 1845 (1973).
30. Herényi, B., Görög, S., J. Chromatogr. **238,** 250 (1982).
31. Herrmann, E. C., Hoyer, G.-A., Chem. Ber. **112,** 3748 (1979).
32. Hill, D. W., Kelley, T. R., Langer, K. J., Anal. Chem. **59,** 350 (1987).
33. Horváth, P., Acta Pharm. Hung. **52,** 133 (1982).
34. Horváth, P., Iványi, G., Acta Pharm. Hung. **52,** 150 (1982).
35. Hubert, J. F. K. (ed.), Instrumentation for High-performance Liquid Chromatography. Elsevier, Amsterdam—Oxford—New York 1978.

36. Huber, L., Zech, K., J. Pharm. Biomed, Anal. **6,** 1039 (1988).
37. Inczédy, J., Analytical Applications of Ion Exchangers. Pergamon Press, Oxford 1967.
38. Kaiser, R. E. (ed.), Instrumental High Performance Thin-Layer Chromatography. Institute for Chromatography, Bad Dürkheim 1982.
39. Knapp, D. R., Handbook of Analytical Derivatization Reactions. Wiley, New York 1979.
40. Lawrence, J. F., Frei, R. W., Chemical Derivatization in Liquid Chromatography. Elsevier, Amsterdam—Oxford—New York 1976.
41. Lopez Silva, F., Bocic Vildosola, R., Vallejos Ramos, C., Alvarez Lueje, A., An Real Acad. Farm. **56,** 19 (1990).
42. Macek, K. (ed.), Pharmaceutical Applications of Thin-Layer and Paper Chromatography. Elsevier, Amsterdam—London—New York 1972.
43. Macioci, F., Fiotek, C., Boll. Chim. Farm. **114,** 468 (1975).
44. Marr, J. G. D., Horváth, P., Clark, B. J., Fell, A. F., Anal. Proc. **23,** 254 (1986).
45. Mikes, O. (ed.), Laboratory Handbook of Chromatographic and Allied Methods. Ellis Horwood, Chichester 1979.
46. Minder, E. I., Schaubhut, R., Vonderschmitt, D. J., J. Chromatogr. **419,** 135 (1987).
47. Minder, E. I., Schaubhut, R., Vonderschmitt, D. J., J. Chromatogr., Biomed. Appl. **428,** 369 (1988).
48. Schieffer, G. W., J. Chromatogr. **319,** 387 (1985).
49. Scott, E. P., J. Pharm. Sci. **72,** 1089 (1983).
50. Scott, R. P. W., Liquid Chromatography Detectors. Elsevier, Amsterdam—Oxford—New York 1977.
51. Shellard, E. J., „Quantitative Thin-Layer Chromatography using Densitometry", in E. J. Shellard, Quantitative Paper and Thin-Layer Chromatography. Academic Press, London—New York 1978.
52. Sherma, J., Fried, B. (ed.), Handbook of Thin-Layer Chromatography. Marcel Dekker, New York, 1991.
53. Stahl, E., Die Dünnsicht-Chromatographie. Berlin—Göttinger—Heidelberg, Springer Verlag 1965.
54. Szepesi, G., HPLC in Pharmaceutical Analysis. Vol. I, II, CRC Press, Boca Raton 1990—1991.
55. Szepesi, G., Gazdag, M., Mihályfi, K., J. Chromatogr. **464,** 265 (1989).
56. Touchstone, J. C., Dobbins, M. F., Practice of Thin-Layer Chromatography. Wiley, New York 1978.
57. Touchstone, J. C., Rogers, D. (ed.), Thin-Layer Chromatography: Quantitative Environmental and Clinical Applications. Wiley, New York 1980.
58. Touchstone, J. C., Sherma, J. (ed.), Densitometry in Thin-Layer Chromatography, Wiley, New York, 1979.
59. Treiber, L. R. (ed.), Quantitative Thin-Layer Chromatography and its Industrial Applications. Marcel Dekker, New York 1987.
60. Tyihák E. (szerk.), A rétegkromatográfia zsebkönyve. Műszaki Könyvkiadó, Budapest 1979.
61. White, P. C., J. Chromatogr. **200,** 271 (1980).
62. Zlatkis, A., Kaiser, R. E. (ed.), HPTLC — High Performance Thin-Layer Chromatography. Elsevier (Amsterdam), Institute of Chromatography (Bad Dürkheim) 1977.
63. Yamamoto, H., Kurita, T., Suzuki, J., Hira, R., Nakano, K., Makabe, H., Shibata, K., J. Chromat. **116,** 29 (1976).
64. Yost, R., Stoveken, J., MacLean, W., J. Chromatogr. **134,** 73 (1977).

6. Kémiai reakciókra alapozott módszerek

6.1. Kémiai reakciók alkalmazását szükségessé tevő tényezők a spektrofotometriás gyógyszeranalízisben

Az eddigiek során elsősorban a spektrofotometriás analízis olyan lehetőségeit tárgyaltuk, ahol a meghatározás a vizsgált anyagok saját ultraibolya-látható fényelnyelésére volt alapozható. Több ízben mutattunk rá tárgyalásunk során ennek a lehetőségnek korlátaira mind a mérés alkalmazhatósági területe, mind pedig szelektivitása, érzékenysége és hatékonysága vonatkozásában. A lehetőségek kiterjesztésének egyik fontos eszköze az az út, amikor a spektrofotometriás mérést előzetes kémiai reakcióval kombináljuk: a reakció termékét vetjük alá a spektrofotometriás analízisnek. Az alkalmazott reakciót úgy választjuk meg, hogy hatására a meghatározandó anyag spektruma hosszúhullámú eltolódást szenved, s eközben esetleg intenzitása is megnő. Ennek a lehetőségnek felhasználása a következő területeken jelentheti a spektrofotometriás analízis alkalmazásának kiterjesztését.

a) Spektrofotometriásan inaktív anyagok mérése. Amint azt már a korábbi fejezetekben tárgyaltuk, a 220 nm alatt abszorpciós maximummal rendelkező vegyületek kvantitatív analízisének komoly nehézségei vannak: ezeket általában spektrofotometriásan inaktív anyagoknak tekintjük. A spektrofotometriás inaktivitás molekulaszerkezeti alapjait a 3.3. és 3.4. fejezetekben tárgyaltuk, ahol számos példát is bemutattunk a gyógyszereknek és rokonvegyületeknek erre a csoportjára. Mivel ezek a vegyületek számos olyan funkciós csoportot tartalmaznak (hidroxil, oxo stb.), amelyek reagáltathatók olyan reagensekkel, amelyek az anyag spektrumát eltolják a hosszúhullámú ultraibolya vagy látható tartományba, a mérés kiterjeszthető a spektrofotometriásan inaktív vegyületek döntő többségére is.

b) A mérés szelektivitásának növelése. Igen gyakran olyan esetben is alkalmazunk kémiai reakciót a spektrofotometriás mérés előtt, amikor a meghatározandó anyag megfelelő saját elnyeléssel rendelkezik, de az elnyelés nem elég szelektív az adott feladat megoldásához. Ilyen esetek pl., amikor fenolok és fenol-éterek vagy spektrofotometriásan aktív alkoholok és acilszármazékaik vannak egymás mellett, és az igen hasonló spektrumok miatt az egymás melletti meghatározást nem lehet elvégezni. Hasonló az eset spektrofotometriásan aktív karbonsavak és észterszármazékaik egymás melletti meghatározása esetén. Ilyen esetekben a vegyületpár egyik tagjának szelektív reagáltatásával toljuk el a spektrumot olyan tartományba, ahol a meghatározás már szelektíven elvégezhető. Ilyen módon a 4.3. fejezetben tárgyalt lehetőségek mellett ez a megoldás is módot nyújt háttérproblémák megoldására.

c) A mérés érzékenységének növelése. Gyakran fordul elő, hogy a spektrofotometriásan aktív anyagok saját fényelnyelése lehetővé teszi ugyan bizonyos problémák megoldását, más esetekben viszont ez túlságosan gyenge ahhoz, hogy olyan meghatározásokat végezzünk, ahol nagyobb érzékenységre van szükség. Ha ilyen esetben találunk olyan reakciót, amelynek segítségével a vegyület spektrumának intenzitását jelentősen növelni lehet, a probléma megoldható.

Tipikus példaként a fenolos hidroxilcsoportot tartalmazó ösztrogéneket említjük meg. Ezek 280 nm körül megjelenő α-sávja 2000 körüli moláris abszorpciós koefficiensével számos gyógyszer-analitikai probléma megoldását lehetővé teszi. Kényesebb feladatok megoldásához (igen kis hatóanyag-tartalmú tabletták analízise stb.), különösen pedig biológiai minták ösztrogéntartalmának meghatározásához azonban ez az érzékenység már nem elég. Ezért széles körben használnak meghatározásukra színes termékekhez vezető reakciókat. Ezek moláris abszorpciós koefficiensei elérhetik a 30—40 000-es értéket (lásd 10.13.2. fejezet).

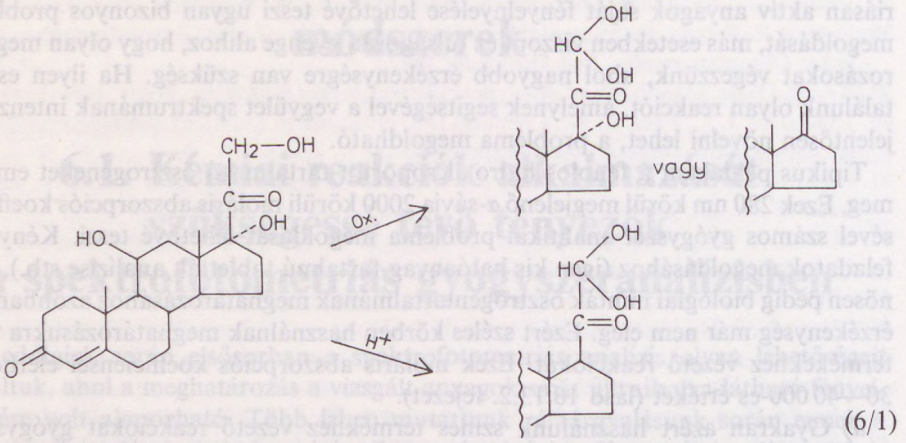
d) Gyakran azért használunk színes termékhez vezető reakciókat gyógyszerek spektrofotometriás analízisében, hogy lehetőséget teremtsünk ilyen anyagok mérésére alkalmas berendezések használatára. Amint ezt az 1.1. fejezetben tárgyaltuk, a spektrofotometriás analízis hőskorában erre azért volt szükség, mivel az analízis számára rendelkezésre álló műszerek döntő többsége csupán a látható spektrumtartományban nyújtott mérési lehetőséget. Ennek a műszertípusnak korszerű változatai ma elsősorban a klinikai gyógyszeranalízisben használatosak szélesebb körben, ezért színreakciók alkalmazásának ma ezen a területen van a legnagyobb jelentősége. Itt említjük meg azt is, hogy a 9.10. fejezetben tárgyalt mechanikus és automata analizátorok jelentős része is fotometriás detektorral rendelkezik: ezért ezeknek az analizátoroknak fontos része a színreakció előhívásához szükséges reagenseket adagoló pumparendszer és a reakciótér.

6.2. A reakció kiválasztásának szempontjai

Ha az előző fejezetben röviden érintett szempontok közül a szelektivitásra való törekvés játssza a fő szerepet, akkor mérlegelni kell a kitűzött célt, és ennek alapján eldönteni, hogy a molekula melyik funkciós csoportján célszerű végrehajtani a reakciót, ami a megfelelő szelektivitású meghatározást lehetővé teszi. Példaként kortikoszteroidok, pl. hidrokortizon gyógyszerkészítményekben való meghatározásának problémáját vázoljuk. A legegyszerűbb esetekben a meghatározást a 240 nm-nél meglehetősen nagy intenzitással megjelenő saját elnyelési sávra is alapozhatjuk. Ha a feladat csupán a hidrokortizon spektrumának szelektív eltolása a látható tartományba, hogy megszabaduljunk a 240 nm-nél zavaró idegen fényelnyeléstől, használhatjuk a telítetlen 3-as ketoncsoport izonikotinsav-hidrazidos kondenzációján alapuló módszert (lásd 10.13.2. fejezet).

Amennyiben azonban a meghatározást stabilitási vizsgálat céljaira kívánjuk felhasználni, akkor abból kell kiindulni, hogy hidrokortizonnak mind az oxidatív, mind

pedig a hidrolitikus bomlása a 21-es szénatomon játszódik le.



(6/1)

Amint az a (6/1) reakciósémán látható, valamennyi bomlástermék tartalmazza a Δ^4-3-keto-csoportot, tehát a saját fényelnyelésen alapuló módszer semmi esetre sem alkalmas stabilitási vizsgálatokra. Ugyancsak alkalmatlanok erre a célra a ketoncsoportokkal, ill. a hidroxilcsoportokkal való reakción alapuló módszerek, ezeket ui. a bomlás csak részlegesen érinti, úgyhogy a bomlástermék is többé-kevésbé pozitív reakciót adna. Így alkalmatlan stabilitási vizsgálatok céljaira az előzőekben említett izonikotinsav-hidrazidos módszer is.

A stabilitás vizsgálatára csupán a C-17-es oldallánc redukáló sajátságain alapuló módszerek alkalmasak, ezt a tulajdonságot ui. a (6/1) séma valamennyi reakciója során elveszti a molekula. Ennek megfelelően sikerrel alkalmazták stabilitási vizsgálatok céljaira azt a módszert, amely azon alapul, hogy a sértetlen oldallánc színes formazánokká redukálja a színtelen tetrazólium reagenseket (10.13.2. fejezet).

Ha viszont hidrokortizont szelektíven akarjuk meghatározni pl. 21-észter-származékai jelenlétében, még ez a megoldás sem vezet eredményre. Az erősen lúgos közegben végbemenő tetrazóliumos reakciók körülményei között ui. a hidrokortizon-észterek hidrolizálnak. Így nem használható ki az a körülmény, hogy az észterek közvetlenül nem reagálnak a tetrazólium reagensekkel. Ebben az esetben sikerrel alkalmazható az a 435. oldalon tárgyalt kétlépéses eljárás (lásd 10/19 reakcióséma), amelyben először a 21-es hidroxilcsoportot oxidáljuk aldehiddé (ezt a reakciót az észter nem adja), majd a kialakult α-dioxo-vegyületet 4,5-dimetil-*o*-fenilén-diaminnal kinoxalinszármazékká kondenzáljuk, ami 350 nm körül rendelkezik intenzív fényelnyeléssel [3].

A szelektivitás mellett a másik fontos szempont, amit a spektrofotometriás mérést megelőző kémiai reakció kiválasztásánál mérlegelünk, a mérés érzékenysége. Kivételes esetektől eltekintve általában arra törekszünk, hogy a reakciótermék moláris abszorpciós koefficiense legalább 5—10 000 legyen. A legtöbb gyógyszer-analitikai feladat megoldására elégséges a 10—20 000 közti tartomány, a legnagyobb érzékenységet igénylő feladatok megoldásához (mint gyógyszerek, ill. metabolitjaik meghatározása biológiai mintákban) szükség van azonban ezeknél nagyobb intenzitású spektrumokat ($\varepsilon > 50\,000$) eredményező reakciók alkalmazására is.

Mivel a legfontosabb gyógyszerek analitikai irodalmában igen nagyszámú kémiai reakcióra alapozott módszer található, egy adott feladat megoldására általában még akkor is több lehetőség között választhatunk, ha a szelektivitás és érzékenység szempontjait figyelembe véve a fentiek szellemében megszorításokat teszünk.

A reakció kiválasztásának további szempontjai közül első helyen a reakció egyértelmű kémiájára vonatkozó követelményt említjük meg. A fotometria hőskorában a mindenáron színes termék képzését erőltető kutatás számos olyan módszert eredményezett, amelynek kémiai alapjai tisztázatlanok voltak, s amelyekről a későbbi kutatás megállapította, hogy a színes származék korántsem kvantitatív, egyirányú reakció terméke. Ezeknek a módszereknek a reprodukálhatósága, megbízhatósága általában nem megfelelő. A korszerű gyógyszeranalízisben azt tekinthetjük irányelvnek, hogy új módszer kidolgozása esetén csak olyan módszert írhatunk le, amelynél ismerjük a lejátszódó kémiai reakciót, és meggyőződtünk róla, hogy a reakció egyirányú és lehetőleg kvantitatíven játszódik le. Régi, klasszikus reakciók esetén sok esetben még a gyógyszerkönyvek is engedményeket tesznek; ilyen esetben azonban különösen nagy gonddal kell optimalizálni a módszert és betartani a módszer alkalmazása során az optimálisnak talált körülményeket.

Fontos szempont a reakció kiválasztásánál alkalmazásának idő- és munkaigényessége. Mindenképpen hátrány a hosszú reakcióidő, különösen pedig az a körülmény, ha a spektrofotometriás mérés előtt a reakcióterméket kirázással vagy még inkább ha kromatográfiás módszerrel el kell választani a reagens feleslegétől: előnyben kell részesíteni az olyan módszereket, ahol a reagens feleslege nem zavarja a meghatározást. Amint arra a következő fejezetben rámutatunk, fontos szempont még a reakciótermék stabilitása a reakció, ill. a mérés körülményei között.

Több, irodalomban leírt, egyenrangúnak látszó, spektrofotometriás célra alkalmazott reakció közül a legmegfelelőbb kiválasztásánál fontos szempontként kell értékelni a reakció alkalmazásával elérhető analitikai pontosságot. Az irodalomban megadott pontossági adatok összehasonlító értékelésénél azonban nagyfokú óvatosságra van szükség, mivel a módszer pontosságát dokumentáló adatok a különböző dolgozatokban igen különböző színvonalúak lehetnek.

Hasonlóképpen igen óvatosan kell eljárni akkor, ha kifejezetten biológiai minták vizsgálatára leírt módszert akarunk gyógyszerkészítmények analízisére adaptálni. A biológiai minták analízisének pontosságigénye ui. általában kisebb, s ezeknek a módszereknek a pontossága igen sokszor nem felel meg a gyógyszerkészítmények analízisével szemben támasztott nagyobb igényeknek.

6.3. A módszer optimalizálásának szempontjai

Ha egy adott feladat megoldására kiválasztottuk a legalkalmasabb reakciót, a következő szempontok figyelembevételével kell elvégezni a módszer optimalizálását.

6.3.1. Az oldószer, az oldatösszetétel és a hígítás

Szerencsés esetben a reakció és a spektrofotometriás mérés oldószere (sőt esetleg a gyógyszerkészítmény hatóanyagának extrakciójára felhasznált oldószer is) azonos lehet. Gyakran azonban a helyzet nem ilyen egyszerű: pl. az extrakció vagy a reakció oldószere nem alkalmas a spektrofotometriás mérés lefolytatására, a mérés szempontjából ideális oldószer viszont nem alkalmas a reakció, ill. az extrakció lefuttatására. Ilyen esetekben extrakcióval vagy bepárolással és újra oldással oldószert kell cserélni.

Gyakran egyszerű megoldást jelent az is, hogy a reakciót viszonylag tömény oldatban végezzük, majd a spektrofotometriás méréshez jelentősen hígítjuk az oldatot az alkalmas oldószerrel. A hígítás kérdésével kapcsolatban általában a következők állapíthatók meg. Ha bőven áll rendelkezésre vizsgálandó anyag, nagyobb beméréssel (50—100 mg) dolgozunk, a reakciót viszonylag tömény oldatban futtatjuk le, és az oldatot erősen meghígítjuk. Ha a rendelkezésre álló anyag mennyisége csekély, néhány milligrammot mérünk be mikromérlegen, és a reakciót abban a hígításban végezzük el, amelyben a mérést lefolytatjuk. Lényegében ez a helyzet kis hatóanyagtartalmú készítmények és biológiai minták vizsgálatánál is. A legnagyobb érzékenységet akkor tudjuk elérni, ha a kevés oldószerben feloldott anyaghoz csupán a reagenseket adjuk hozzá, és a mérést további hígítás nélkül végezzük. A végtérfogattal szemben ez esetben az egyedüli követelmény, hogy az elegendő legyen a küvetta megtöltésére; ez 5—10 ml-t, sőt mikroküvetta esetén mindössze 1 ml-t jelent. Ez a megoldás 10 μg nagyságrendűre csökkenti a meghatározható legkisebb anyagmennyiséget (sőt igen érzékeny reakció és mikroküvetta alkalmazása esetén akár 1 μg-ig). Ilyen nagy érzékenységre általában csak a biológiai analízisben van szükség, gyógyszerkészítmények analízisében ritkábban, ezért ott azt a nagyobb pontosságot lehetővé tevő megoldást alkalmazzuk, hogy a reakció után az oldat térfogatát mérőlombikban való hígítással állítjuk be pontos értékre.

6.3.2. Reagenskoncentráció

Olyan reagensfelesleget kell választani, amely biztosítja azt, hogy a reakció megfelelő sebességgel, lehetőleg egyensúly- és mellékreakció-mentesen játszódjék le. Ilyen szempontból természetesen a nagy reagensfelesleg tekinthető kedvezőnek. A reagens koncentrációja azonban csak abban az esetben növelhető tetszés szerint, ha a reagens fényelnyelése a reakciótermék maximumhelyén megfelelően csekély érték az utóbbihoz viszonyítva. Ez esetben a reagens csekély fényelnyelése nem zavar, hiszen azt természetesen azonos koncentrációban bevisszük az összehasonlító oldatba is. Túlságosan magas fényelnyelésű összehasonlító oldat azonban kerülendő, mivel ez esetben — bár a reagensfelesleg fényelnyelése itt is kiesik — a mérés spektrális tisztasága csökken, és számolni kell a meghatározás érzékenységének csökkenésével is. Amennyiben ui. a reagens fényelnyelése összemérhető a termék fényelnyelésével, akkor — mivel a termék keletkezése közben vele ekvivalens reagens eltűnik — a mért fényelnyelés lényegesen kisebb lesz, mint annak a keletkező termék spektrális sajátságai alapján lennie kellene. Az ilyen körülmények között mért abszorpciós koefficiens

csak látszólagos abszorpciós koefficiens lesz. Ezért az ilyen spektrális sajátságú reagensek alkalmazását lehetőleg el kell kerülni, vagy végső esetben a reakciótermékeket és a reagens feleslegét extrakcióval vagy valamilyen kromatográfiás módszerrel el kell választani egymástól.

A leírt szempontok figyelembevételével az egyébként optimálisnak talált feltételek mellett a spektrum maximumhelyén fel kell venni a reagenskoncentráció—abszorbancia függvényt. Ez kis reagenskoncentrációk esetén természetesen emelkedő tendenciát mutat, majd az abszorbancia további koncentrációnövelésre már állandóvá válik. Semmi esetre sem szabad a méréshez az emelkedő szakaszról választott koncentrációt alkalmazni. Ez esetben ui. a meghatározandó anyag magasabb koncentrációinál negatív eltérés mutatkozna a Lambert—Beer-egyenlettől. Ugyanebből az okból a reagenskoncentráció—abszorbancia összefüggés vizsgálatánál a meghatározandó anyag állandónak tartott koncentrációját célszerű olyan értékre beállítani, ami megfelel annak a maximális koncentrációnak, ahol a módszert alkalmazni kívánjuk. A gyakorlatban ahhoz a koncentrációhoz képest, ahol az abszorbancia a reagens koncentrációjának függvényében állandóvá válik, 50—100%-kal magasabb értéket választunk.

6.3.3. Az oldat pH-ja

A legtöbb spektrofotometriás módszer esetében fontos szempont az oldat pH-jának helyes megválasztása. Általában ezt a kérdést ketté kell választani: külön kell megvizsgálni a reakció lefuttatásának optimális pH-ját, majd a kvantitatív reakció után a termék spektrofotometriás mérésének pH-optimumát.

Ami a reakcióelegy pH-jának optimalizálását illeti, ezt a kérdést is kétféle szempontból kell mérlegelni. A pH változtatásával változhat a reakció sebessége; ilyen szempontból természetesen minél gyorsabb reakcióra törekszünk. Egyensúlyra vezető reakciók esetén a pH befolyásolhatja a reakció kvantitatív lefutását is. Ezt a kérdést is meg kell vizsgálni és az eredmények alapján meghatározni az optimális pH-t. Amennyiben ez az érték 2 és 12 közé esik, pufferoldatot kell használni, ügyelni kell azonban arra, hogy az közömbös anyag legyen mind a reakció, mind pedig a spektrofotometriás mérés szempontjából.

A mérendő oldat pH-jának optimalizálásáról a 3.16. fejezetben már részletesen írtunk. A kérdés lényege az, hogy sav, ill. bázis karakterű reakciótermékek esetén, ahol a spektrumnak pH-függése van, olyan pH-n célszerű dolgozni, ahol a termék vagy teljesen protonált vagy pedig deprotonált formában van jelen. Hogy a két változat közül melyiket választjuk, azt azon az alapon dönthetjük el, hogy melyik úton érhető el nagyobb érzékenység, ill. szelektivitás, de mérlegelni kell a reakciótermék stabilitásának pH-függését is.

Mivel a reakció és a spektrofotometriás mérés optimális pH-ja nem feltétlenül azonos, a mérés előtt a pH-t gyakran meg kell változtatni.

6.3.4. A hőmérséklet

Kivételes esetektől eltekintve a spektrofotometriás mérést szobahőmérsékleten végezzük, a reakció lefuttatásának hőmérséklete azoban ettől gyakran eltér. Melegítést alkalmazunk, ha a reakció szobahőmérsékleten nem kielégítően gyors, míg hűtést, ha valamilyen mellékreakciót kívánunk elkerülni. Megjegyzendő, hogy a magasabb hőmérséklet alkalmazásával óvatosan kell bánni, mivel itt nemegyszer olyan mellékreakciók léphetnek fel, amelyek sebessége szobahőmérsékleten elhanyagolhatóan csekély.

Óvatosan kell kezelni a „szobahőmérséklet" fogalmát is, hiszen abban akár 10 °C-os ingadozások is előfordulhatnak. Mivel az átlagos kémiai reakciók sebessége 10° hőmérséklet emelés hatására 2—3-szorosára nő, érthető, hogy ez komoly hibák forrása lehet.

Általánosságban azt szögezhetjük le, hogy akár szobahőmérsékleten, akár attól eltérő körülmények között dolgozunk, a hőmérsékletet 1 °C pontossággal kell megadni, ill. betartani. A hőmérsékletet és a reakcióidőt úgy kell megválasztani, hogy 1—2 °C hőmérsékletváltozás hatására ne változzék meg az abszorbancia.

6.3.5. Reakcióidő. A termék stabilitása

Ez a legfontosabb tényezők közé tartozik a spektrofotometriás mérés kidolgozása során. Az egyébként optimálisnak talált körülmények között feltétlenül meg kell vizsgálni a termék spektrumának maximumhelyén a reakcióidő—abszorbancia összefüggést. Ideális esetnek azt tekinthetjük, amikor az összefüggést egy hosszabb-rövidebb ideig emelkedő szakasz után állandóvá váló görbe jellemzi. Az állandóvá válás azt jelenti, hogy a spektrofotometriásan aktív reakciótermék a reakció körülményei között megfelelően stabilis. Ilyen esetekben biztonsági okokból az abszorbancia állandóvá válásához szükséges reakcióidő 1,5—2-szeresét választjuk a gyakorlati alkalmazáshoz. Megjegyzendő, hogy gyakorlati szempontok miatt a többórás reakcióidő nem kívánatos. Ennek csökkentését a reagenskoncentráció növelésével, esetleg a pH változtatásával, főként azonban a hőmérséklet emelésével érhetjük el.

Sokkal több gondot okoznak azok a reakciók, ahol a reakciótermék instabilitása miatt az idő—abszorbancia összefüggés maximumgörbével írható le. Ha az abszorbancia csökkenésének sebessége nem túlságosan nagy, vagyis nem haladja meg az óránkénti 5—10%-ot, kellő körültekintéssel még el lehet végezni a mérést, az olyan, különösen a régi biokémiai irodalomban gyakran leírt, színreakciók alkalmazásától azonban óvakodni kell, ahol az idő—abszorbancia görbe maximuma túlságosan éles. Könnyű ui. belátni, hogy ilyen esetekben már a maximális abszorbancia elérése előtt számottevő bomlás következik be; az időgörbe alakja számos, nehezen reprodukálható tényező függvénye, és így súlyos hibát követhetünk el még akkor is, ha párhuzamosan vizsgált standard anyagra mért abszorbanciára alapozzuk a számítást.

A termék stabilitásával kapcsolatban megjegyzendő, hogy olyan esetekben, amikor a reakcióelegy és a mérendő oldat összetétele jelentősen eltér egymástól, nemcsak a reakció, hanem a spektrofotometriás mérés körülményei között is meg kell vizsgálni a termék stabilitását.

6.3.6. A reakció kvantitatív lejátszódása

Korszerű, megfelelő színvonalú módszerről csak abban az esetben beszélhetünk, ha biztosítani tudjuk, hogy a reakciónk az adott körülmények között sztöchiometrikus és kvantitatíven lejátszódó legyen. Ez utóbbi megítélésénél nem elég, ha megkeressük azt a reakcióidőt, ami után már nem nő tovább a fényelnyelés. Sok esetben ui. egyensúly állhat be viszonylag kis konverzió mellett is, vagy még jellemzőbben a főreakció konverzióját szimultán futó mellékreakciók is csökkenthetik. Meg kell keresni tehát azokat a paramétereket (reagenskoncentráció, oldószer, pH stb.), amelyek a reakciót a teljessé válás irányába befolyásolják. Előnyben kell részesíteni azokat a reakciókat, amelyeknél a spektrofotometriásan aktív származék tiszta állapotban előállítható és spektrumadatai megállapíthatók. Általában ui. nehézséget jelent annak meghatározása, milyen abszorbancia esetén beszélhetünk 100%-os konverzióról. A kezünkben levő izolált reakciótermékre mért abszorpciós koefficiens és a reakcióelegyből mért abszorbancia összehasonlításával ez a feladat könnyen megoldható.

6.3.7. Összehasonlító oldatok

Alapvetően meghatározza a kémiai reakciókra alapozott spektrofotometriás mérés sikerét, milyen következetesen érvényesítjük azt az elvet, hogy az összehasonlító oldat, amivel szemben a mért oldat abszorbanciáját meghatározzuk, a meghatározandó komponens kivételével minden komponenst olyan mennyiségben tartalmazzon, mint maga a mérendő oldat (oldószerek, reagens, puffer stb.). Igen fontos továbbá az is, hogy ez az oldat ugyanolyan kezelésen menjen keresztül, mint a mérendő oldat (azonos reakcióidő, hőmérséklet stb.). Csak ilyen módon lehet ui. biztosítani azt, hogy a mérés során kiessen valamennyi olyan fényelnyelés, amely nemkívánatos hátteret okozna a reakció során keletkező spektrumhoz.

6.3.8. A Beer-törvény érvényessége

Kémiai reakcióra alapozott módszer kidolgozása vagy az irodalomból való átvétele során különösen fontos annak megvizsgálása, hogy követi-e a termék oldatának fényelnyelése a Beer-törvényt, vagyis lineáris összefüggés van-e a meghatározandó anyag koncentrációja és az analitikai hullámhosszon (általában a sáv maximumában) mért abszorbancia között. A linearitástól való esetleges eltérés a 4.2. fejezetben leírtakon túlmenően kémiai reakciókra alapozott módszerek esetén általában arra mutat, hogy helytelenül történt a reagens koncentrációjának, pH-jának vagy más paraméterének optimalizálása, tehát ez az ellenőrzés tulajdonképpen az eddig leírt szempontok alapján elvégzett optimalizálás kontrolljának tekinthető. Amennyiben a nyert kalibrációs egyenesnek akár pozitív, akár negatív tengelymetszete van, ez általában arra utal, hogy helytelenül készítettük el az összehasonlító oldatot. Kivéve a teljesen áttekinthetetlen kémiai alapokkal rendelkező reakciókra alapozott módszere-

ket, a paraméterek szisztematikus változtatásával általában elérhető a zérót megközelítő tengelymetszetű, lineáris kalibráció. Az ezt megadó regressziós egyenes egyenletének megadása feltétlenül részét képezi egy módszer megfelelően igényes leírásának. Azt is meg kell adni, hogy az egyenlet érvényessége milyen koncentrációtartományra vonatkozik. Kémiai reakciókra alapozott módszer esetében ui. a véges reagens felesleg miatt a linearitási tartomány általában szűkebb, mint a saját elnyelésre alapozott módszereknél. Legtöbbször megelégszünk azzal, hogy a linearitás a 0—1,5 abszorbancia tartományban érvényesüljön. A felső határhoz tartozónál nagyobb koncentrációjú oldat abszorbanciamérésénél, ill. az abból való koncentrációszámításnál durva hibát követhetünk el.

6.3.9. Standardok alkalmazása

Amint az az eddigi szempontok tárgyalásából is látható, a kémiai reakciókra alapozott spektrofotometriás módszerek kidolgozása lényegesen kényesebb, több hibaforrást magában hordozó feladat, mint a saját fényelnyelésre alapozott módszereké. A meghatározás szisztematikus hibájának csökkentése céljából még a tárgyalt valamennyi paraméter pontos betartása esetén is feltétlenül szükséges a vizsgált anyaggal párhuzamosan, teljesen azonos körülmények között futtatni egy reakciót standard tisztaságú anyagból készült oldattal. Miután a koncentráció—abszorbancia összefüggés linearitásáról már korábban megbizonyosodtunk, itt már elegendő a kalibrációs egyenes egy vagy esetleg két pontjának ellenőrzése abban a koncentrációtartományban, ahol a vizsgált oldat abszorbanciája várható. A számításokat a standardra kapott abszorbanciaértékek segítségével végezzük el. Amennyiben ezt elmulasztjuk, már akkor is elkövethetünk kisebb-nagyobb hibát, ha a számítást egy, saját magunk által korábban meghatározott abszorpciós koefficiensre alapozzuk, amennyiben azonban kémiai reakcióval egybekötött spektrofotometriás módszer esetén irodalomból vett abszorpciós koefficienssel számolunk, a hiba egészen durva is lehet.

A leírt elvek következetes érvényesítése mindenképpen növeli a meghatározás pontosságát, azzal a hátránnyal jár azonban, hogy a meghatározáshoz szükségünk van nagy tisztaságú standardra (vagy ahhoz gondosan hozzámért pontosan ismert hatóanyagtartalmú ún. „working standard"-ra). Ennek elkerülése céljából még gyógyszerkönyvi szinten is létezik olyan megközelítés, hogy a vizsgálati leírás tartalmazza a számítás alapjait képező abszorpciós koefficienst. Ez a megközelítés jellemző pl. a Brit Gyógyszerkönyv számos, saját fényelnyelésen, sőt kémiai reakción alapuló cikkelyére is. Ez esetben joggal tételezhetjük fel, hogy a cikkelyek kidolgozói a gondosan optimalizált módszer alkalmazása során nagy pontossággal határozták meg az abszorpciós koefficienst. Ha a módszer alkalmazói igen gondosan validált mérési körülmények között nagy pontossággal reprodukálják a módszert, a standard elhagyásából származó hiba természetesen minimalizálható. Ez azonban nem érvényes a szakirodalomban publikált módszerek jelentős részében található, nem kielégítően pontos abszorpciós koefficiensek alkalmazására. Egészben véve sokkal nagyobb biztonságot eredményez az az előzőekben leírt, és pl. az Amerikai Gyógyszerkönyv által következetesen képviselt szemlélet, hogy mind a saját fényelnyelésre alapozott,

mind pedig a kémiai reakciókkal egybekötött spektrofotometriás méréseket standard mellett végeztetjük el.

Ha a módszer szisztematikus hibáját gyógyszereknek bonyolultabb mátrixokban való meghatározása során standardok alkalmazásával kívánjuk minimalizálni, a hiba csökkentésére további lehetőséget jelent, ha a standardot nem önmagában vizsgáljuk, hanem bevisszük abba a környezetbe, ahol a meghatározandó komponenst mérni akarjuk (a standard hozzámérése a meghatározandó komponenst nem tartalmazó „üres" tabletta, injekció stb. összeállításhoz vagy akár „üres" vérszérumhoz stb.). Bizonyos esetekben hasznosan alkalmazható az elektroanalitikában gyakran, a spektrofotometriás analízisben ritkábban használt „standard addíciós" módszer. Itt a standardot a meghatározandó anyagot tartalmazó mintához keverik hozzá ismert koncentrációban, és a számítást az így, ill. standard hozzáadása nélkül nyert abszorbanciákra alapozzák.

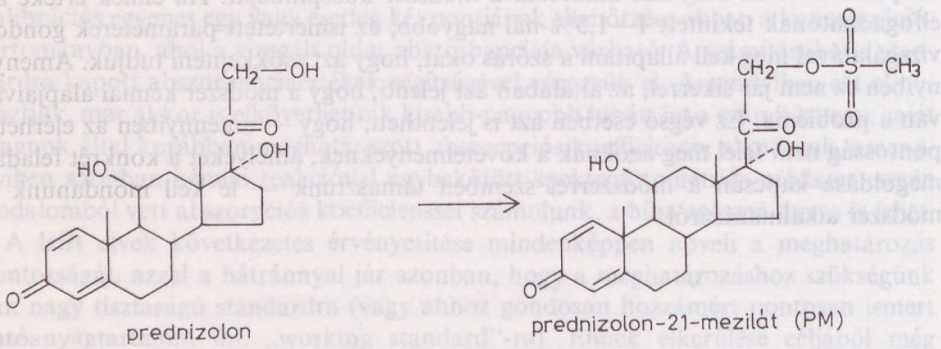
6.3.10. Hibaanalízis

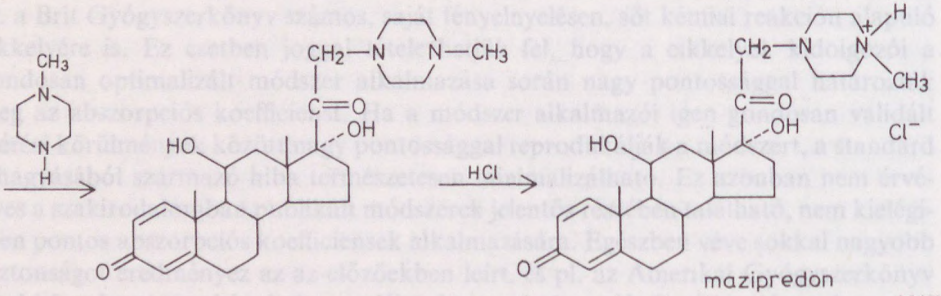
Egy analitikai módszer egy adott feladatra való alkalmazhatóságának döntő kritériuma a vele mérhető pontosság. A szisztematikus hiba csökkentésének lehetőségeiről az előző alfejezetben írtunk. Ettől elkülöníthető probléma a módszerrel elért eredmények szórásának kérdése. Új módszer kidolgozása vagy irodalmi módszer adaptálása esetén meg kell határozni a módszer középhibáját. Ha ennek értéke az elfogadhatónak tekintett 1—1,5%-nál nagyobb, az ismertetett paraméterek gondos vizsgálatával meg kell állapítani a szórás okát, hogy azt csökkenteni tudjuk. Amennyiben ez nem jár sikerrel, az általában azt jelenti, hogy a módszer kémiai alapjaival van a probléma. Ez végső esetben azt is jelentheti, hogy — amennyiben az elérhető pontosság nem felel meg azoknak a követelményeknek, amelyeket a konkrét feladat megoldása kapcsán a módszerrel szemben támasztunk — le kell mondanunk a módszer alkalmazásáról.

6.4. Egy gyakorlati példa: a reakció kiválasztása és optimalizálása prednizolon-21-mezilát meghatározására; a módszer alkalmazása mazipredonban szennyezésként való meghatározására

6.4.1. Az analitikai feladat

A mazipredont, a Richter Gedeon Vegyészeti Gyár vízoldékony prednizolonszármazékát, a Depersolon^R készítmények hatóanyagát prednizolonból állítják elő [9]. Amint az a (6/2) reakciósémán látható [2], a reakciósor kulcslépése prednizolon-21-mezilát reakciója *N*-metil-piperazinnal. Fontos feladat volt tehát megfelelően szelektív módszer kidolgozása a kulcsintermedier prednizolon-21-mezilát (PM) meghatározására, különös tekintettel PM szennyezés meghatározására mazipredonban. Követelmény a kidolgozandó módszerrel szemben, hogy annak szelektívnek kell lenni a szintézis kiinduló anyagával (prednizolon) és végtermékével (mazipredon) szemben és lehetővé kell tennie tized százalék nagyságrendű PM meghatározását mazipredonban.





(6/2)

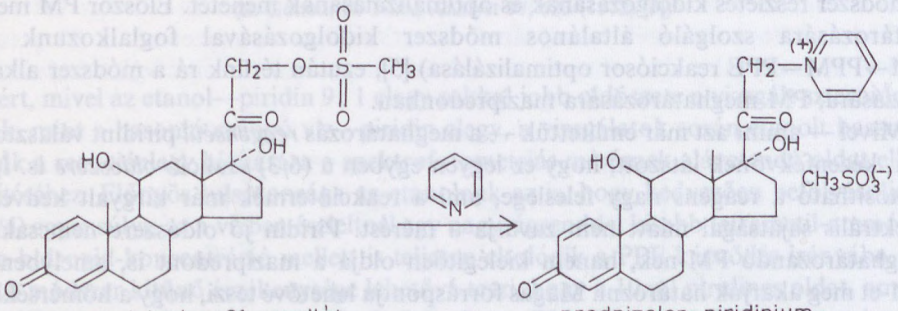
6.4.2. A reakció kiválasztásának szempontjai

Amint az a (6/2) reakciósémán látható, a prednizolon, a PM és a mazipredon azonos ($\Delta^{1,4}$-3-keton) kromofor csoporttal rendelkeznek, s így a saját fényelnyelésre alapozott spektrofotometriás mérés nem jöhet számításba PM szelektív meghatározására. Hasonlóképpen nem jöhetnek számításba a vegyületek közös funkciós csoportjainak reakcióira alapozott módszerek. Különbség csupán a 21-es helyzetű szubsztituensben van, a mérést tehát erre kell alapozni. A 10.13. fejezetben kortikoszteroidok meghatározására leírt módszerek nem alkalmasak erre a célra, mivel azok alapját az α-ketol típusú oldallánc redukáló sajátságai képezik. A prednizolon és a mazipredon erélyes redukálószerek és pozitív tetrazóliumos reakciót adnak [3], az igen reaktív, aktív-észter típusú PM pedig a tetrazóliumos reakció lúgos körülményei között prednizolonná hidrolizál, s így maga is adja a reakciót.

A célnak megfelelő reakció kiválasztását éppen az aktív-észter típusú PM nagy reakciókészségére alapoztuk. Ez nemcsak a hidrolízisre való erős hajlamban nyilvánul meg, hanem nagy reakciókészséget mutat különféle nukleofil reagensekkel szemben is. A számításba vehető, spektrofotometriásan aktív nukleofil reagensek közül a piridint választottuk ki a következő indokok alapján:

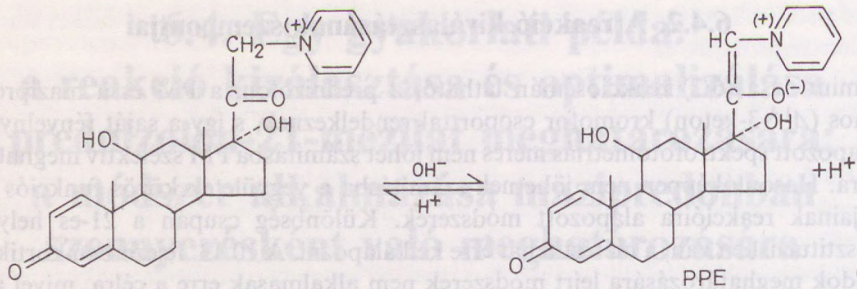
a) Olcsó, könnyen hozzáférhető.

b) A reakció (6/3 reakcióséma) terméke, 21-deoxi-21-(1-piridinium)-prednizolon-mezilát kristályos állapotban rendelkezésünkre állt, hiszen ez volt a mazipredonszintézis egyik izolált melléktermék [2], amelynek kémiai és spektroszkópiai tulajdonságait jól ismertük, s így eleget lehetett tenni a 6.3.5. fejezetben leírt követelményeknek.



prednizolon-21-mezilát (PM) — prednizolon-piridinium-mezilát (PPM) (6/3)

c) A (6/3) reakció során keletkező prednizolon-piridinium-mezilát (a következőkben PPM) lúgos közegben intramolekuláris átrendeződéssel ikerionos szerkezetű prednizolon-piridinium-enoláttá alakul (a következőkben PPE) [2, 5]. Ez a származék is rendelkezésre állt kristályos állapotban. Az átrendezési reakció (6/4 reakcióséma) pH-függő egyensúlyhoz vezet. A (6/4) reakció reverzíbilitásáról meggyőződtünk, sőt meghatároztuk az egyensúlyi állandót is, és azt a spektrumnak a pH 11—13 tartományban észlelhető pH-függése alapján vizes közegben $K = 5{,}43 \cdot 10^{-12}$-nek találtuk. Erősen lúgos közegben tehát PPM kvantitatíven átalakítható PPE-vé.



(6/4)

d) PPE ideális spektrofotometriás tulajdonságokkal rendelkezik a feladat megoldásához. A méréshez kiválasztott és a későbbiekben ismertetendő körülmények között abszorpciós maximuma 414 nm-nél van, tehát a reakciótermék már színes (sárga). Ezen a hullámhosszon sem a reagens feleslege, sem pedig a prednizolon és a mazipredon nem rendelkeznek fényelnyeléssel. Mivel az adott reakciókörülmények között az utóbbiak nem reagálnak piridinnel, a módszer szelektivitása biztosítottnak látszott. PPE moláris abszorpciós koefficiense a méréshez kiválasztott körülmények között magas ($\varepsilon = 21\,900$), s így a módszer érzékenysége tekintetében is kedvezőek voltak a kilátások.

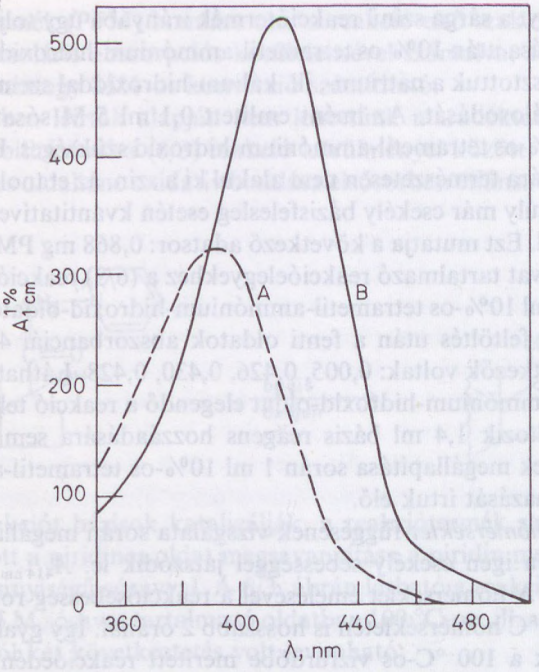
6.4.3. A módszer optimális körülményeinek meghatározása

A következőkben a 6.3. fejezet szellemében, az ott követett sorrendben ismertetjük a módszer részletes kidolgozásának és optimalizálásának menetét. Először PM meghatározására szolgáló általános módszer kidolgozásával foglalkozunk (a PM→PPM→PPE reakciósor optimalizálása) [5], ezután térünk rá a módszer alkalmazására, PM meghatározására mazipredonban.

Mivel — amint azt már említettük — a meghatározás *reagenséül* piridint választottuk, kézenfekvőnek látszott, hogy ez legyen egyben a (6/3) reakció *oldószere* is. Így biztosítható a reagens nagy feleslege, ami a reakciótermék már tárgyalt kedvező spektrális sajátságai miatt nem zavarja a mérést. Piridin jó oldószere nemcsak a meghatározandó PM-nek, hanem kielégítően oldja a mazipredont is, amelyben a PM-et meg akarjuk határozni. Magas forráspontja lehetővé teszi, hogy a hőmérséklet emelésével a reakcióidőt lerövidíthessük. A leírtaknak megfelelően valamennyi esetben 10 ml piridinben oldva végeztük el a (6/3) reakciót.

Ez utóbbi lejátszódása után a (6/4) egyensúlyt lúgosítással toljuk el a felső nyíl irányába. Ezt 10-szeresére hígított reakcióelegyben célszerű elvégezni. Az egyensúly beállását a 10 ml piridin nem zavarja, ezért nincs szükség oldószercserére, ill. a piridin eltávolítására. Hígító oldószerként vizet, ill. etanolt vettük számításba. PPE-nek a 6/1. ábrán látható spektrumai 10 tf% piridint tartalmazó vizes, ill. etanolos oldatban a későbbiekben tárgyalandó optimális tetrametil-ammónium-hidroxid-koncentráció mellett készültek.

Amint az látható, etanol alkalmazásával igen jelentős batokróm és hiperkróm eltolódás érhető el a vizes közegben felvett spektrumhoz viszonyítva. Ezért, valamint



6/1. ábra. 21-deoxi-21-piridil-prednizolon-enolát (PPE) spektrumai. Oldószer: *A)* 10 tf% piridint tartalmazó vizes 0,01 M tetrametil-ammónium-hidroxid; *B)* 10 tf% piridint tartalmazó etanolos 0,01 M tetrametil-ammónium-hidroxid.

(S. Görög, Z. Tuba, Analyst **97**, 523 (1972) [5])

azért, mivel az etanol—piridin 9 : 1 elegy sokkal jobb oldószere a vizsgált szteroidoknak, mint a hasonló arányú víz—piridin elegy, a vizsgálatok során etanolt használtunk a reakcióelegy hígítására a spektrofotometriás mérésnek alávetendő oldat elkészítéséhez. Előnyös tulajdonsága az etanolnak az is, hogy kedvezően befolyásolja a (6/4) egyensúlyt: az a vízben észleltnél egy nagyságrenddel kisebb tetrametil-ammónium-hidroxid-koncentráció mellett is teljesen eltolódik a PPE-képződés irányába.

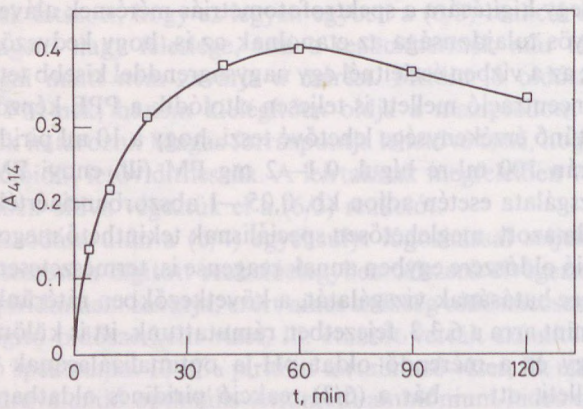
A módszer kitűnő érzékenysége lehetővé teszi, hogy a 10 ml piridines oldat, amely a későbbiek során 100 ml-re hígul, 0,1—2 mg PM (ill. ennyi PM-ot taratalmazó mazipredon) vizsgálata esetén adjon kb. 0,05—1 abszorbanciaértéket.

Mivel az alkalmazott, meglehetősen speciálisnak tekinthető megoldás, nevezetesen az, hogy a reakció oldószere egyben annak reagense is, természetesen feleslegessé teszi a *reagens feleslege* hatásának vizsgálatát, a következőkben rátérünk a *pH hatásának* vizsgálatára. Amint arra a 6.3.3. fejezetben rámutattunk, itt is külön meg kell vizsgálni a reakcióelegy és a mérendő oldat pH-ja optimalizálásának kérdését. Ami a reakcióelegyet illeti, ott — bár a (6/3) reakció piridines oldatban sav hozzáadása nélkül is lejátszódik — a keletkező PPM stabilizálása céljából 0,1 ml 5 M sósavat adunk a reakcióelegyhez. Ennek részletesebb indokait, ill. a sósav mennyiségének optimalizálását a stabilitási kérdések kapcsán a későbbiekben tárgyaljuk.

A (6/4) egyensúlyt a sárga színű reakciótermék irányába úgy toljuk el, hogy a (6/3) reakció teljessé válása után 10%-os tetrametil-ammónium-hidroxidot adunk az oldathoz. Ezt azért választottuk a nátrium-, ill. kálium-hidroxiddal szemben, hogy elkerüljük az oldat beopálosodását. Az imént említett 0,1 ml 5 M sósav semlegesítéséhez mintegy 0,4 ml 10%-os tetrametil-ammónium-hidroxid szükséges. Ennél kisebb térfogatú reagens hatására természetesen nem alakul ki a szín, az etanol—piridin elegyben azonban az egyensúly már csekély bázisfelesleg esetén kvantitatíven a PPE-képződés irányába tolódik el. Ezt mutatja a következő adatsor: 0,868 mg PM-ot, 10 ml piridint és 0,1 ml 5 M sósavat tartalmazó reakcióelegyekhez a (6/3) reakció lejátszódása után 0,3, 0,6, 1,0 és 1,4 ml 10%-os tetrametil-ammónium-hidroxid-oldatot adtunk. Etanollal 100 ml-re való feltöltés után a fenti oldatok abszorbanciái 414 nm-nél a fenti sorrendben a következők voltak: 0,005, 0,426, 0,430, 0,428. Látható tehát, hogy már 0,6 ml tetrametil-ammónium-hidroxid-oldat elegendő a reakció teljessé tételéhez és a spektrum nem változik 1,4 ml bázis reagens hozzáadására sem. Ezért a végleges reakciókörülmények megállapítása során 1 ml 10%-os tetrametil-ammónium-hidroxid reagens alkalmazását írtuk elő.

A (6/3) reakció *hőmérséklet*-függésének vizsgálata során megállapítottuk, hogy az szobahőmérsékleten igen csekély sebességgel játszódik le: $A_{414\,nm}$ 120 perces reakcióidő után 0,029. A hőmérséklet emelésével a reakciósebesség rohamosan nő, de a reakcióidő még 70 °C hőmérsékleten is hosszabb 2 óránál. Így gyakorlati meggondolások alapján csak a 100 °C-os vízfürdőbe merített reakcióedényben vagy piridin forráspontján (115 °C) végrehajtott reakció vehető számításba.

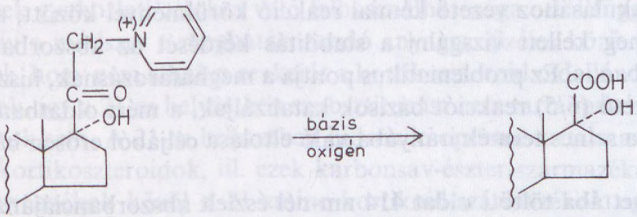
A tiszta piridines közegben 100 °C-on végrehajtott reakció abszorbancia—idő görbéjét a 6/2. ábrán ábrázoltuk. Látható, hogy az abszorbancia 60 perces reakcióidő után maximumot ér el, majd további 60 perces melegítés hatására mintegy 15%-kal csökken. A reakciótermék bomlásának következtében természetesen a 60 perces reakcióidő után mért abszorbancia sem felelhet meg a reakció teljes lejátszódásának,



6/2. ábra. Prednizolon-mezilát (PM) és piridin reakciójának abszorbancia—idő görbéje 100 °C-on. Oldószer: piridin; $c_{PM} = 0{,}934$ mg/10 ml. Mérés 414 nm-nél 10 ml reakcióelegy + 1 ml 10%-os tetrametil-ammónium-hidroxid etanollal 100 ml-re való hígítása után

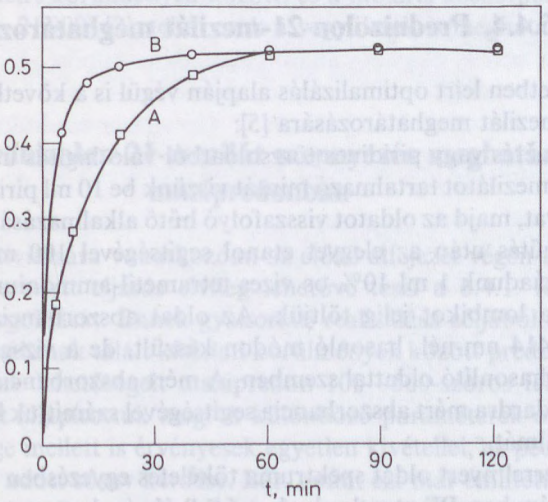
hiszen a reakciótermék (PPM) bomlása már a reakció első szakaszában elkezdődik. A PPE 21 900-as moláris abszorpciós koefficiensével számolva, a 60 perc után mért abszorbanciából mintegy 85%-os konverzió számítható.

A 6.3.5. fejezetben leírtak alapján nem lehettünk maradéktalanul elégedettek a reakciótermék stabilitásával a (6/3) reakció körülményei között. A bomlási reakció valószínűleg a 17-es oldallánc oxidatív bomlása elsősorban etiánsav-származékká (6/5 reakcióegyenlet).



(6/5)

Mivel ezt a reakciót bázisok katalizálják, a reakciótermék stabilizálása céljából célszerűnek látszott a piridines oldat megsavanyítása a piridin mennyiségéhez viszonyítva csekély mennyiségű sósavval. A 6/3. ábrán látható a reakció időgörbéje 10 ml piridinben 0,1 ml 5 M sósavat tartalmazó oldatban 100 °C-on, ill. a piridin forráspontján. A 6/3. ábrából két következtetés volt levonható:



6/3. ábra. Prednizolon-mezilát (PM) és piridin sósav jelenlétében lejátszódó reakciójának aszorbancia—idő görbéje. Oldószer: 10 ml piridin és 0,1 ml 5 M sósav elegye. $c_{PM} = 1{,}061$ mg/10 ml. Hőmérséklet: *A)* 100 °C, *B)* forráspont. Mérés: mint a 6/2. ábra esetén

a) A reakciótermék stabilizálása sikerrel járt;

b) 100 °C-on 60 perc alatt, a piridin forráspontján már 30 perc alatt teljessé válik a reakció.

A stabilizálás érdekében a reakcióelegyhez adott sósav koncentrációjának optimálása céljából PM 10 ml piridines oldatához 0,1—0,1 ml mennyiségben vizet, 2,5 M, 5 M, 7,5 M sósavat adtunk. Az előbbiekben ismertetett egyéb optimális paramétereket változatlanul hagyva vittük véghez a meghatározást, és a 414 nm-nél mért abszorbanciákból 21 900-as moláris abszorpciós koefficiens segítségével a fenti sorrendben a következő konverziókat kaptuk: 78,1%, 95,0%, 97,5%, 96,2%. Ezek alapján választottuk ki a már többször említett 0,1 ml 5 M sósavat.

Miután megoldottuk a mérés alapjául szolgáló színes termék prekurzorának stabilizálását a kialakulásához vezető kémiai reakció körülményei között, a 6.3.5. fejezet szellemében meg kellett vizsgálni a stabilitás kérdését az abszorbancia mérésére szolgáló oldatban is. Ez problematikus pontja a meghatározásnak, hiszen az elszíntelenedéshez vezető (6/5) reakciót bázisok katalizálják, a mért oldatban pedig a (6/4) egyensúlynak a színes termék irányába való eltolása céljából erősen bázikus közeget alkalmazunk.

A mérő küvettába töltött oldat 414 nm-nél észlelt abszorbanciájának időfüggését vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a lúgosítás és jelig töltés után azonnal mért abszorbanciához viszonyítva 30, 60, 90 és 120 perces állás után végrehajtott újramérések során az abszorbancia 1,7, 3,4, 6,0 és 7,4%-kal csökkent. Ezek az értékek azt jelzik, hogy amennyiben a mérést az oldat összeállításától számított 10 percen belül elvégezzük, a reakciótermék instabilitásából származó hiba elhanyagolható.

6.4.4. Prednizolon-21-mezilát meghatározása

Az előző fejezetben leírt optimalizálás alapján végül is a következő módszert írtuk le prednizolon-mezilát meghatározására [5]:

Közvetlen bemérés vagy piridines törzsoldatból való hígítás útján mintegy 0,5—1 mg prednizolon-mezilátot tartalmazó mintát viszünk be 10 ml piridinbe. Hozzáadunk 0,1 ml 5 M sósavat, majd az oldatot visszafolyó hűtő alkalmazásával 1 óráig forrponton tartjuk. Lehűtés után az elegyet etanol segítségével 100 ml-es mérőlombikba öblítjük át, hozzáadunk 1 ml 10%-os vizes tetrametil-ammónium-hidroxid-oldatot, végül etanollal a lombikot jelig töltjük. Az oldat abszorbanciáját 5 percen belül meghatározzuk 414 nm-nél, hasonló módon készült, de a vizsgálandó mintát nem tartalmazó összehasonlító oldattal szemben. A mért abszorbanciából párhuzamosan vizsgált PM standardra mért abszorbancia segítségével számítjuk ki a minta prednizolon-mezilát-tartalmát.

A leírt módszerrel nyert oldat spektruma tökéletes egyezésben van a 350—500 nm spektrumtartományban PE standardnak a 6/1*B* ábrán bemutatott spektrumával, a mérést tehát idegen abszorbanciák nem zavarják. A koncentráció—abszorbancia összefüggés lineárisnak bizonyult a 0—1,5 abszorbancia tartományban. A regressziós egyenes egyenlete:

$$A_{414\,\mathrm{nm}} = -0{,}0012 + 0{,}483 \cdot c \qquad r = 0{,}9997\,, \tag{6/6}$$

ahol c a prednizolon-mezilát koncentrációja a spektrofotometriásan mért oldatban mg/100 ml-ben kifejezve. Amint az a (6/6) egyenletből látható, a regressziós egyenes

tengelymetszete elhanyagolható és a regressziós koefficiens a gyakorlati feladatok megoldására alkalmas módszert jellemez. Ha az egyenlet meredekségéből moláris abszorpciós koefficienst számítunk, 21 150-es értékhez jutunk. Ha ezt összevetjük a PPE (lásd 6/4 reakcióséma) 21 900-as moláris abszorpciós koefficiensével, megállapíthatjuk, hogy a PM→PPM→PPE reakciósor összevont konverziója 96,6%, ami a 6.3.6. fejezetben leírtak alapján azt jelenti, hogy a reakció kvantitatíven a megadott reakciósémák (6/3 és 6/4) szerint játszódik le, tehát a módszer ilyen szempontból is megfelel a korszerű módszerekkel szemben támasztható követelményeknek.

A módszernek gyakorlati célokra való felhasználhatósága attól függ, milyen mértékben szelektív a módszer a meghatározandó anyagra. Széles körű vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy nem adják a reakciót a kortikoszteroid oldalláncot nem tartalmazó szteroidok, így a 21-es helyzetben szubsztituenst nem tartalmazó 20-keto-pregnán-származékok sem. A 21-es helyzetben hidroxilcsoportot tartalmazó természetes és szintetikus kortikoszteroidok, ill. ezek karbonsav-észter-származékai és az egyéb szintetikus származékok közül a 21-amino-kortikoid-származékok ugyancsak nem adnak pozitív reakciót. Pozitív reakciót adnak viszont a 21-es helyzetben klór- vagy brómatomot, ill. aktív-észter-csoportot tartalmazó 20-keto-pregnán-származékok, mint pl. az általunk vizsgált vegyületek közül az eddig tárgyalt prednizolon-21-meziláton kívül a többi között prednizolon-21-tozilát, Reichstein S-21-tozilát, 21-deoxi-21-bróm-prednizolon, 21-klór-progeszteron, 11β-hidroxi-21-klór-progeszteron. Ezek a vegyületek is 413 és 417 nm közötti abszorpciós maximummal rendelkező spektrumot hoznak létre a leírt körülmények között, és a moláris abszorpciós koefficiensek is hasonlók (20 240—21 900) [2], tehát ezek a vegyületek is meghatározhatók a leírt módszerrel.

6.4.5. Prednizolon-21-mezilát szennyezés meghatározása mazipredonban

A módszer szelektivitására vonatkozóan az előző alfejezet végén tett megállapítások alapján az ismertetett eljárás elvileg lehetővé teszi a 6.4.1. fejezetben vázolt analitikai feladat megoldását. Ennek gyakorlati realizálása céljából megvizsgáltuk a már korábban optimálisnak talált kísérleti körülmények között prednizolon-21-mezilát meghatározásának lehetőségeit mazipredon 100—500-szoros feleslege jelenlétében. A következőket állapítottuk meg. A különböző paraméterek optimumai mazipredon nagy feleslege mellett is érvényesek egyetlen kivétellel, ez pedig a stabilizálás céljából az oldathoz adott sósav kérdése. Bár, amint ezt már említettük, mazipredon nem adja a reakciót, az alkalmazott erősen sósavas közegben bekövetkező bomlásának termékei negatívan befolyásolják a PM→PPM átalakulást, csökkentik az abszorbanciát, s így negatív hibát okoznak. Megállapítottuk, hogy a PPM stabilizálásához elegendő az a sósav-mennyiség, amit a hidroklorid formában vizsgált mazipredonnal beviszünk a piridines reakcióelegybe, s így a módszernek ennél az alkalmazásánál nem vittünk be külön sósavat a reakcióelegybe. Ezzel a megoldással sikerült visszaszorítani a mazipredonnak a zavarokat okozó bomlását anélkül, hogy lényegesen rontottuk volna a PPM stabilitását a piridines forralás körülményei között.

Megismételve a (6/6) regressziós egyenes felvételét olyan körülmények között, hogy a PM koncentrációját állandónak tartott mazipredonkoncentráció mellett (35 mg/10 ml piridin) variáltuk és a sósav bevitelét elhagytuk, a következő regressziós egyeneshez jutottunk:

$$A_{414\,nm} = 0{,}0021 + 0{,}460 \cdot c \qquad r = 0{,}9995\,. \tag{6/7}$$

A (6/6) egyenletben megadottnál valamivel kisebb meredekség és regressziós koefficiens ellenére a módszer alkalmasnak bizonyult 0,2%-nál nagyobb mennyiségben jelenlevő prednizolon-21-mezilát meghatározására mazipredonban. Példaként bemutatjuk egy 0,51% PM szennyezést tartalmazó mazipredon vizsgálatának eredményeit. A nyert érték (középérték $\pm$ s.d.; $n = 7$) 0,50 $\pm$ 0,12% volt. A visszanyerés tehát 98,0%, a relatív standard deviáció pedig $\pm$2,4% volt, ami a módszer alkalmasságát jelzi az adott gyakorlati feladat megoldására.

6.5. A spektrofotometriás mérések és módszerek validálása

6.5.1. Bevezetés

Az utolsó évtizedben rohamosan nőttek a követelmények az analitikai mérési eredmények minőségével szemben. Ezeknek a követelményeknek egységesítése alapvető feltétele volt annak, hogy egy analitikai módszer minőségét objektív kritériumok segítségével lehessen megítélni. Ez az igény vezetett a mérések és módszerek validálási elveinek és gyakorlatának kialakulásához. Gyógyszer-analitikai vonatkozásban a módszer validálás szempontjai már gyógyszerkönyvi szinten is rögzítésre kerültek [8].

Természetesen a spektrofotometriás mérések validálását is el kell végezni, egy megfelelő színvonalú spektrofotometriás módszer leírásához pedig hozzátartozik a módszer validálási adatainak megadása is.

Ebben a fejezetben a spektrofotometriás módszerek validálásának főbb szempontjait gyűjtjük össze. A kérdés nagy fontossága ellenére részletes tárgyalásra ezen a helyen nincs szükség, hiszen ezeknek a szempontoknak zömét könyvünk különböző fejezeteiben már tárgyaltuk. Így ezen a helyen a vázlatos ismertetés mellett lényegében arra szorítkozunk, hogy felhívjuk a figyelmet azokra a fejezetekre, ahol ezekkel a kérdésekkel foglalkoztunk.

Bár a módszer validálásra természetesen nemcsak a kémiai reakciókra alapozott eljárások esetén van szükség, hanem a 4. fejezetben tárgyalt, saját fényelnyelésre alapozott módszerek esetében is, a kérdés egységes kezelése céljából a validálással foglalkozó alfejezetet a kémiai reakciókra alapozott módszerekkel foglalkozó 6. fejezet végére helyeztük.

6.5.2. Az abszorbancia meghatározásának validálása

Megfelelően validált spektrofotometriás módszer kidolgozásának és leírásának előfeltétele, hogy az abszorbancia meghatározására szolgáló spektrofotométer és tartozékai alkalmasak legyenek annak megfelelően pontos, más laboratóriumban, más készüléken is reprodukálható mérésére.

Amint azt a 2.9. és 2.10. fejezetekben részletesen kifejtettük, a készülék állapotát leginkább a résszélesség—abszorbancia összefüggés, valamint a szórt fény viszonyok megvizsgálásával lehet megítélni, majd ezek standardizálásával az abszorbancia meghatározását megbízható alapokra helyezni. Fontos részeit képezi az abszorbanciameghatározás validálásának a spektrofotométer hullámhossz skálája és abszorbancia skálája kalibrálása, ill. a kalibráció időről időre történő ellenőrzése (lásd 2.12.1. és 2.12.2. fejezetek). Ha a kvantitatív analízist szolgáló abszorbanciameghatározást standard anyag teljesen azonos körülmények között, egy időben végzett abszorbanciameghatározásával kötjük össze és a számítást ez utóbbira alapozzuk, a készülék nem megfelelő állapotából eredő hibákat csökkenthetjük ugyan, de meg nem szüntethetjük, úgyhogy az abszorbanciameghatározás validálása mindenképpen fontos feladat.

Az abszorbanciameghatározás validálásához természetesen hozzátartozik a felhasznált küvetták spektrofotometriás szempontból való ekvivalenciájának ellenőrzése (2.4.3. fejezet), valamint tisztaságuk biztosítása és ellenőrzése (2.8. fejezet).

Mivel az abszorbancia meghatározását általában igen híg oldatban végezzük, külön megjegyzést érdemel, hogy a mérés pontosságát a spektrofotométerrel összefüggő, eddig tárgyalt tényezőkön túlmenően, azokkal azonos mértékben befolyásolja a hígítás során felhasznált pipetták és mérőlombikok térfogatának pontossága: a validáláshoz hozzátartozik ezek kalibrációjának ellenőrzése is.

6.5.3. A spektrofotometriás módszerek validálása

Ebben a fejezetben az USP XXII által felsorolt módszer validálási szempontokon végighaladva foglaljuk össze a kvantitatív spektrofotometriás gyógyszer-analitikai módszerek validálásának esetleges speciális szempontjait.

a) Pontosság (precision). Ezzel a paraméterrel jellemezzük a módszerrel homogén mintából vett számos (min. 8—10) mintára nyert eredmények szórását a középérték körül, vagyis a módszer reprodukálhatóságát. Ezt általában a standard deviációval (*SD* vagy *s*) fejezzük ki:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}, \qquad (6/8)$$

ahol X_i az *i*-edik mérési eredmény, $\bar{X}$ a mérési eredmények átlaga, *n* pedig a mérések száma. Jobban kezelhető eredményhez jutunk, ha a fenti értéket az átlagérték százalékában mint relatív standard deviációt (*RSD*) adjuk meg:

$$RSD = \frac{100 \cdot SD}{\bar{X}} \%. \qquad (6/9)$$

Ki kell hangsúlyozni, hogy a módszer validálás és annak dokumentálása során az n számú mérés azt jelenti, hogy valamennyi mintával a homogén mintából való mintavételtől kezdve egészen az abszorbancia méréséig a teljes analitikai folyamatot egymástól függetlenül végrehajtjuk. Az így nyert *RSD*-értékek értelemszerűen magasabbak lesznek, mint a csupán az abszorbanciamérés reprodukálhatóságát jellemző (a mérendő oldat ismételt küvettába töltésével és abszorbanciájának megmérésével nyerhető) *RSD*-értékek.

Az abszorbancia meghatározásának pontosságával a 2.7. fejezetben foglalkoztunk. Normális körülmények között az *RSD*-érték 0,3—0,5%-ra szorítható le. Ezt a pontosságot megközelíthetik a saját fényelnyelésre alapozott és egyszerű mintaelőkészítést igénylő módszerek is. Bonyolultabb mintaelőkészítést (extrakció stb.) és/vagy előzetes kémiai reakció lefuttatását igénylő módszerek esetében ez az érték még gondos optimalizálás mellett is 1—2%-ra nőhet.

Ha a kérdést a módszerrel szemben támasztott igények oldaláról közelítjük meg, megállapíthatjuk, hogy gyógyszeralapanyag hatóanyag-tartalmi meghatározása során elvárható a maximum 0,5—1%-os *RSD*, ez gyógyszerkészítmények hatóanyagtartalmának meghatározásánál 1—2% lehet, szennyezések direkt mérése vagy biológiai minták vizsgálata során pedig a feladat jellegétől függően még ennél is több.

Végül megemlítjük, hogy — akárcsak az analitika más területein — a spektrofotometriás gyógyszeranalízisben is gyakran jellemzik a módszerek pontosságát az ún. konfidencia intervallummal:

$$\text{konfidencia intervallum} = \bar{X} \pm \frac{t \cdot SD}{\sqrt{n}}, \qquad (6/10)$$

ahol t táblázatból kiolvasható érték annak jellemzésére, hogy a mért érték egy adott (pl. 95%-os) valószínűséggel az intervallum által megadott limitek közé esik.

b) Torzítatlanság (accuracy). Ez az érték, amit gyakran visszanyerésnek (recovery) is neveznek, a módszer szisztematikus hibájára jellemző oly módon, hogy megadja a mért és a valódi érték különbségét a valódi érték százalékában kifejezve.

Ennek meghatározásához szükség van arra az „üres" mátrixra, amelyben a kérdéses anyagot meg akarjuk határozni: szennyezések, bomlástermékek mérése esetén a tiszta gyógyszeralapanyag, gyógyszerkészítmények hatóanyagtartalmának mérésekor a placébó, biológiai minták vizsgálata során „üres vér", „üres vizelet" stb. minták. Ehhez hozzáadva a várható mennyiségű meghatározandó anyagot és a meghatározást elvégezve közvetlenül eljuthatunk a százalékos visszanyerési értékhez. Nagyobb igényű vizsgálatok esetén a meghatározást nem egyetlen pont alapján végezzük el, hanem az üres mátrixhoz a várható mennyiség felett és alatt is (pl. 60, 80, 100, 120, 140%-os mennyiségben) adunk a meghatározandó anyagból. Ha a kapott koncentrációkat a bevitt anyag koncentrációjának függvényében ábrázoljuk, a módszer torzítatlanságát az így kapott egyenes paramétereivel jellemezhetjük: ideális esetben a tengelymetszet zéró, a meredekség pedig egységnyi. (Megjegyezzük, hogy kiszerelt készítmények analízisével foglalkozó közleményekben számos szerző megelégszik azzal, hogy a módszer torzítatlanságának jellemzése céljából a nyert eredményt a készítmény deklarált hatóanyagtartalmával hasonlítja össze.)

c) Kimutatási határ. Ezt a paramétert a spektrofotometriás gyógyszeranalízisben általában limit tesztek esetében használják (szennyezések kimutatása). Ezen általában a kimutatandó anyagnak azt a koncentrációját értjük, ahol az abszorbancia meghatározása során észlelt jel—zaj viszony legalább 2 vagy 3. Kísérleti meghatározása során gyakran az „üres" mátrixra mért abszorbancia standard deviációját határozzák meg: ennek az értéknek 2—3-szorosából számítható ki a kimutatási határ. Mivel azonban a mérés során az itt előforduló rendkívül alacsony abszorbanciatartományban már fokozottan jelentkeznek a szelektivitási problémák, ennek a paraméternek a spektrofotometriás gyógyszeranalízis szempontjából alárendelt a jelentősége.

Annál fontosabb a kimutatási határ kérdése látható tartományban vizuális észlelésen, ill. összehasonlításon alapuló limit tesztek esetében. A kimutatási határt itt a mátrixot, valamint a kimutatandó minta ismert koncentrációit tartalmazó hígítási sorozat vizsgálatával lehet meghatározni.

d) A meghatározható legkisebb mennyiség (koncentráció). A *c)* pont alatti megfontolások erre a paraméterre is érvényesek azzal a különbséggel, hogy a jel—zaj viszony, ill. a standard deviáció szorzószámának itt a fenti 2—3 helyett 10-et szokták tekinteni. Ez a mennyiség a módszer érzékenységével függ össze: ezt a linearitással és alkalmazhatósági tartománnyal foglalkozó *f)* pontban tárgyaljuk.

e) Szelektivitás (specificitás). A módszer szelektivitása azt fejezi ki, milyen mértékben befolyásolja a módszerrel nyert eredményeket idegen anyagok jelenléte (a gyógyszerelegy többi komponense, szennyezések, bomlástermékek, kiszerelési segédanyagok, biológiai minták endogén komponensei, definiálatlan „hátteret" okozó anyagok stb.).

A spektrofotometriás mérések szelektivitásával kapcsolatos kérdések a módszer gyógyszer-analitikai alkalmazásai során a legproblematikusabb területet jelentik. Az ezzel kapcsolatos meggondolások könyvünk 4.1.2., 9.2.1. és 9.2.2. fejezeteiben találhatók meg. A szelektivitási problémák megoldására a következő főbb lehetőségeket tárgyaljuk: algebrai háttérkorrekciós módszerek (4.3.), több komponensű elegyek analízise algebrai (4.4), derivatív (4.5.) és egyéb (4.6.) módszerekkel, a spektrofotometriás meghatározást megelőző kromatográfiás elválasztással (5. fejezet), kémiai reakciók alkalmazásával (6. és 7. fejezet), különös tekintettel a differencia-spektrofotometriás módszerre (8. fejezet). A spektrofotometriás módszerek validálási dokumentációjához tartozik azoknak a spektrumoknak bemutatása, amelyek azonossága azt igazolja, hogy a mérésre kiválasztott hullámhosszon a meghatározás szelektíven elvégezhető. Ugyancsak fontos megadni azoknak az anyagoknak felsorolását, amelyek az adott feladat megoldása során mint a mérést zavaró anyagok számításba jöhetnek azzal a meghatározandó anyagra vonatkoztatott maximális relatív koncentrációval együtt, ami még nem befolyásolja számottevően a mérés alapjául szolgáló abszorbanciát.

Olyan feladatok megoldása esetén, ahol a mátrixról túlságosan kevés információnk van ahhoz, hogy a módszer szelektivitását a leírt módszerekkel megítélhessük, a módszer validálása során a spektrofotometriás módszerrel nyert visszanyerési eredményeket a korszerű matematikai statisztika módszereinek segítségével össze kell vetni egy szelektívebb (általában kromatográfiás) módszerrel nyert eredményekkel.

f) A linearitás és az alkalmazhatósági tartomány. Amint azt a 4.1.1 fejezetben bemutattuk, a Lambert—Beer-törvény alapján végzett koncentrációmeghatározások során a kalibrációs egyenest a regressziós paraméterekkel (tengelymetszet, meredekség, regressziós koefficiens) jellemezhetjük. Ezek, valamint a linearitást jellemző *F*-próba bemutatása a spektrofotometriás módszer fontos validálási adatai közé tartoznak.

Az alkalmazhatósági tartomány alsó határát a már tárgyalt meghatározható legkisebb koncentráció határozza meg, a felső határt pedig az a legnagyobb koncentráció, ameddig a koncentráció—abszorbancia összefüggés linearitása érvényesül. Ez utóbbinak különösebb jelentősége nincsen, hiszen egy egyszerű hígítási lépés beiktatásával könnyen lehozhatjuk a mérendő oldat koncentrációját a lineáris abszorbancia-összefüggést biztosító tartományba.

A regressziós paraméterek közül különösen a meredekség megadása fontos validálási adat, hiszen ez határozza meg a módszer érzékenységét. Ezt elsősorban a 2.3. fejezetben leírt két adat (fajlagos abszorpciós koefficiens, ill. moláris abszorpciós koefficiens) segítségével adjuk meg, de használják az ún. Sandell-féle érzékenységi indexet. Ennek dimenziója $\mu g/cm^2$, számértéke pedig annak az oldatnak koncentrációja μg/ml-ben, amelynek abszorbanciája 1 cm-es rétegvastagság mellett 0,001.

g) „Ruggedness". Ez a magyarra nehezen fordítható validálási paraméter azt fejezi ki, hogyan hat a módszer reprodukálhatóságára, ha a módszer egyértelműen rögzített előírásait betartva változtatunk meg egy-egy vizsgálati körülményt. Ilyen körülmények lehetnek pl. a felhasznált készülék, a vizsgáló laboratórium, beleértve a vizsgáló analitikus személyét, a vizsgálat során felhasznált reagensek eredete vagy mindezeket állandónak véve a vizsgálat napja (egyik napról a másikra történő reprodukálhatóság vizsgálata, amikor pl. a laboratórium hőmérséklete stb. változhat). Ezek közül a tényezők közül különösen a módszerek laboratóriumok közötti átvitelének hatásait vizsgálták részletesen [6].

6.5.4. A kémiai reakciókra alapozott spektrofotometriás módszerek validálásának külön szempontjai

A 6.5.3. fejezetben leírt validálási szempontok minden spektrofotometriás módszerre vonatkoznak függetlenül attól, hogy azt a meghatározandó anyag saját fényelnyelésére vagy kémiai reakció után kialakuló spektrumra alapozzuk. Az utóbbiak validálásának azonban tartalmazni kell a kémiai reakció körülményeinek validálását is. Ennek szempontjait a 6.3. fejezet tartalmazza, a gyakorlati példát bemutató 6.4. fejezet 6.4.3. alfejezetében pedig a gyakorlatban mutattuk be egy kémiai reakcióra alapozott módszer validálását. Az a lényeg, hogy minden mennyiségileg jellemezhető paraméter esetében (reakcióidő, hőmérséklet, reagenskoncentráció, pH stb.) demonstrálni kell a paraméter kismértékű megváltoztatásának megfelelően optimalizált módszer esetében minimális hatását az eredményre.

Végezetül két, spektrofotometriás gyógyszer-analitikai módszerek validálásával foglalkozó közleményre hívjuk fel a figyelmet [1, 7].

Irodalom

1. Gemperline P. J., Salt A., J. Chemometrics **3,** 343 (1989).
2. Görög S. (ed.) Steroid Analysis in the Pharmaceutical Industry. Ellis Horwood, Chichester 1989, 196—197. old.
3. Görög, S., Szepesi, G., Analyst **97,** 519 (1972).
4. Görög, S., Szepesi G., Anal. Chem. **44,** 1079 (1972).
5. Görög, S., Tuba, Z., Analyst **97,** 523 (1972).
6. Kivalo, P., Standardization Within Analytical Chemistry. Akadémiai Kiadó, Budapest 1989.
7. Setnikar, I., Senin P., Arigoni R., Boll. Chim. Farm. **123,** 263 (1984).
8. The United States Pharmacopoeia XXII, USP Convention Inc., Rockville, 1990, 1710—1712. old.
9. Tuba, Z., Szporny, L., Tóth, J., Magyar Szabadalom 150, 350; U.S. Patent 1, 123, 598.

7. Származékképzési reakciók kémiai és spektroszkópiai jellemzése [77, 82, 91, 124, 125, 128, 152]

7.1. Bevezetés

Ebben a fejezetben a spektrofotometriás gyógyszeranalízisben leggyakrabban alkalmazott kémiai reakciókat tárgyaljuk a reakció típusa szerinti csoportosításban. Bemutatjuk, mik a feltételei a molekula egyes funkciós csoportjain végbemenő reakció kvantitatív lejátszódásának, és milyen spektrum várható a reakció során keletkező terméktől. Ezekre az ismeretekre feltétlenül szükség van ahhoz, hogy a 6. fejezetben leírt elvek alapján kiválaszthassuk az adott feladat megoldására szelektivitás és érzékenység szempontjából egyaránt megfelelő reakciót.

A tárgyalás során természetesen csupán a legfontosabb reakciótípusok bemutatására van lehetőség. Itt is — csakúgy mint a reakciók alkalmazását részletesen bemutató 10. fejezetben — arra törekedtünk, hogy azok a reakciók kerüljenek előtérbe, amelyek a mai napig is használatban vannak és amelyek kémiája — összhangban a 6.2. fejezetben leírtakkal — ismert.

7.2. Reverzíbilis sav-bázis reakciók

Mivel a gyógyszervegyületek többsége rendelkezik savas, ill. bázikus funkciós csoporttal, a körükben végrehajtható legáltalánosabb és legegyszerűbb reakció savak deprotonálása, ill. bázisok protonálása. Ezeket a reverzíbilis folyamatokat, ill. az ezekkel járó spektrumváltozásokat a 3.17. fejezetben részletesen tárgyaltuk. Az ott leírt elvek alapján megállapítható, hogy egy adott meghatározandó vegyület esetében a pH csökkentése vagy növelése vezet-e a szelektívebb, ill. érzékenyebb meghatározást lehetővé tevő batokróm, ill. hiperkróm eltolódáshoz. Ezért ezzel a kérdéssel itt részletesen nem foglalkozunk, csupán azt hangsúlyozzuk ismételten, hogy a kvantitatív meghatározáshoz olyan pH-t kell választani (vagy a disszociációs állandó ismeretében kiszámítani, vagy — amennyiben azt nem ismerjük — empirikusan meghatározni), ami biztosítja azt, hogy a meghatározandó anyag egységesen protonált vagy deprotonált állapotban van jelen.

Megemlítjük még, hogy a sav-bázis egyensúlyra alapozott módszereknek különösen nagy jelentősége van a differencia-spektrofotometriában; ezért ezekkel a módszerekkel a 8.2. fejezetben külön foglalkozunk.

7.3. Acilezési reakciók

A (7/1) általános reakcióegyenlet több spektrofotometriás módszer alapját képezi:

$$R-X(H)+R'-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-Y \longrightarrow R-X-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-R'+HY, \qquad (7/1)$$

ahol X = −OH, −SH, −NH- vagy −N-alkil- stb., Y = Hlg, −O−CO−R′ stb.

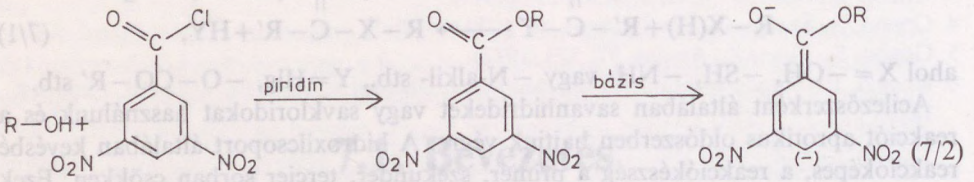
Acilezőszerként általában savanhidrideket vagy savkloridokat használunk és a reakciót aprotikus oldószerben hajtjuk végre. A hidroxilcsoport általában kevésbé reakcióképes, a reakciókészség a primer, szekunder, tercier sorban csökken. Ezek kvantitatív acilezése általában katalizátort igényel. Amennyiben a mérést a látható spektrumtartományban folytatjuk le, általában piridint használunk, amennyiben azonban az ultraibolya tartományban kívánunk mérni, a spektrofotometriásan inaktív trietil-amint használjuk.

Aminok reakciókészsége általában nagyobb, bár a szterikus gátlás itt is igen nagy különbségeket idéz elő, különösen a szekunder aminok körében. Ha az acilezést savkloriddal végezzük, itt is célszerű a reakció teljessé tétele céljából a reakciót savmegkötő tercier amin jelenlétében lefuttatni.

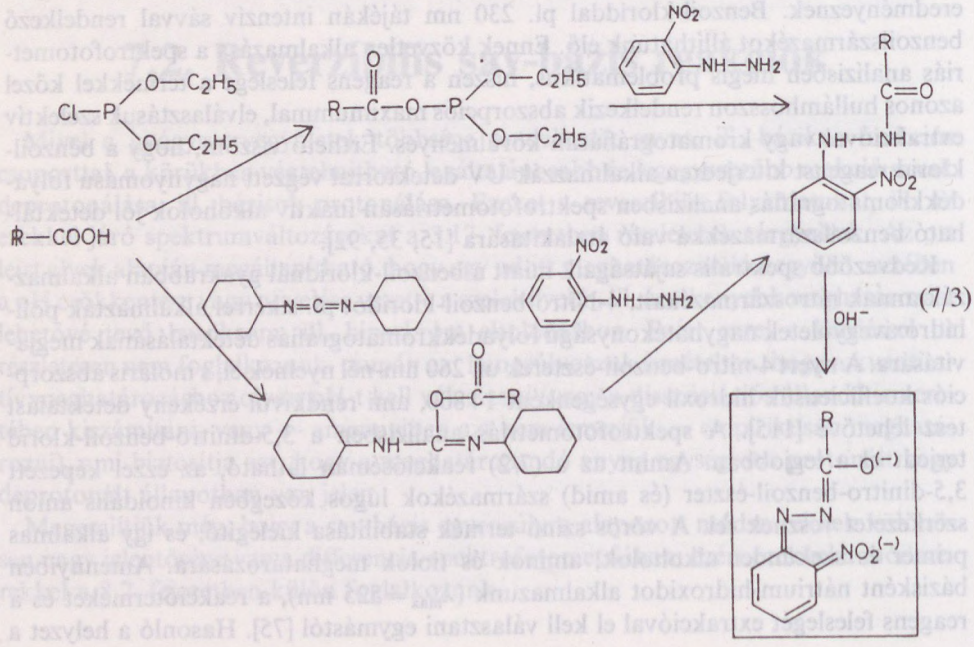
Spektrofotometriásan inaktív acilezőszerek (pl. ecetsavanhidrid, ill.-klorid) általában nem hoznak létre számottevő spektrumváltozást. Kivétel ez alól aromás aminok acilezése, ahol — amint azt a 87. oldalon anilin és acetanilid példáján bemutattuk — az acilezés jelentős batokróm és hiperkróm eltolódást idéz elő. Ilyen reagenseket általában nem használnak spektrofotometriás célokra. Spektrofotometriásan aktív acilezőszerek természetesen megfelelő spektrofotometriás aktivitású származékokat eredményeznek. Benzoil-kloriddal pl. 230 nm tájékán intenzív sávval rendelkező benzoilszármazékot állíthatunk elő. Ennek közvetlen alkalmazása a spektrofotometriás analízisben mégis problematikus, hiszen a reagens feleslege a termékkel közel azonos hullámhosszon rendelkezik abszorpciós maximummal, elválasztásuk szelektív extrakcióval vagy kromatográfiásan körülményes. Érthető viszont, hogy a benzoil-klorid reagenst kiterjedten alkalmazzák UV-detektorral végzett nagynyomású folyadékkromatográfiás analízisben spektrofotometriásan inaktív alkoholok jól detektálható benzoilszármazékká való átalakítására [15, 35, 92].

Kedvezőbb spektrális sajátságaik miatt a benzoil-kloridnál gyakrabban alkalmazzák annak nitroszármazékait. 4-Nitro-benzoil-kloridot pl. sikerrel alkalmazták polihidroxivegyületek nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás detektálásának megjavítására. A nyert 4-nitro-benzoil-észterek ui. 260 nm-nél nyelnek el, s moláris abszorpciós koefficiensük hidroxil egységenként 14 800, ami rendkívül érzékeny detektálást tesz lehetővé [115]. A spektrofotometriás analízisben a 3,5-dinitro-benzoil-klorid terjedt el a legjobban. Amint az a (7/2) reakciósémán látható, az ezzel képezett 3,5-dinitro-benzoil-észter (és amid) származékok lúgos közegben kinoidális anion szerkezetet vesznek fel. A vörös színű termék stabilitása kielégítő, és így alkalmas primer és szekunder alkoholok, aminok és tiolok meghatározására. Amennyiben bázisként nátrium-hidroxidot alkalmazunk ($\lambda_{max} = 525$ nm), a reakcióterméket és a reagens feleslegét extrakcióval el kell választani egymástól [75]. Hasonló a helyzet a

módszernek abban a változatában, ahol a bázis propilén-diamin [75], ha azonban lúgosításra ammóniát [170] vagy piperazint [122] használunk, az extrakció elkerülhető ($\lambda_{max} = 555$, ill. 510 nm), ilyen körülmények között ui. a reagens feleslege nem alakul át színes termékké.



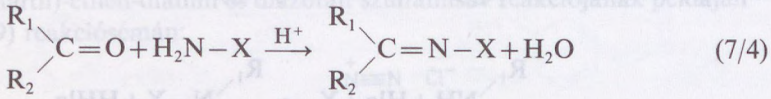
A (7/1) reakció nemcsak acilezhető hidroxil-, amino-, tiol- stb. csoportok meghatározását teszi lehetővé, hanem az acilezőszerét, ill. azzá átalakítható vegyületekét is. Sav-kloridok, ill. -anhidridek pl. közvetlenül meghatározhatók oly módon, hogy 2-nitro-fenil-hidrazint acilezünk velük, majd a nyert hidrazidot lúgos közegben szelektíven átrendezzük a kinoidális anionná [113]. A módszer szabad karbonsavak meghatározására is alkalmas, ha előzetesen aktív acilezőszerré alakítjuk őket pl. diciklohexil-karbodiimiddel [114] vagy dietil-klorofoszfittal végzett vegyes anhidrid képzés segítségével [49, 51]. Ilyen módon 550 nm tájékán közepes intenzitású ($\varepsilon \sim 5$ —7000), igen stabilis termékhez lehet jutni (7/3 egyenlet). Amennyiben a 2-nitro-fenil-hidrazin helyett az anilint választjuk reakciópartnerként és a mérést savas közegben végezzük, a maximum 243 nm körül jelenik meg, a sáv intenzitása azonban 2-3-szor nagyobb lesz [50]; vö. acetanilid spektrumadataival a 83. oldalon.



7.4. Kondenzáció

A kondenzációs reakciók legkülönbözőbb típusai játsszák a legfontosabb szerepet gyógyszervegyületek kémiai reakciókra alapozott spektrofotometriás analízisében (tulajdonképpen ide tartoznak az előző alfejezetben külön tárgyalt acilezési reakciók is).

Ebben a fejezetben elsőként a (7/4) általános reakcióegyenlettel jellemezhető reakciókat tárgyaljuk, amelyek közös jellemzője az, hogy víz kilépése közben C=N kötés alakul ki.



(7/4)

Ha ezt a reakciótípust aldehidek vagy ketonok meghatározására akarjuk felhasználni, akkor a H_2N-R-X általános reagens következő típusait használhatjuk:

a) Aromás aminok (Schiff-bázis képzés). Felhasznált reagensek pl. 4-dimetilamino-anilin [69, 123] vagy 4-amino-antipirin [147]. A sav katalizálta reakcióban a reagenstől és a karbonilcsoport környezetétől függően 350—450 nm közti maximummal, közepes intenzitással ($\varepsilon \sim 10\,000$) jelenik meg a Schiff-bázisok abszorpciós maximuma. Előnye ezeknek a reagenseknek, hogy a maximum hullámhosszán nem rendelkeznek számottevő fényelnyeléssel.

b) Hidrazinszármazékok. Szabad hidrazinnal való kondenzáció nem növeli számottevően aldehidek és ketonok spektrofotometriás aktivitását, aromás gyűrűvel szubsztituált hidirazinszármazékok azonban a leggyakrabban használt reagensek közé tartoznak. Magát a fenil-hidrazint főként glukokortikoidok meghatározására használják [131], amint ez a 10.13. fejezetben részletesebben megtalálható, a 4-nitro- [116, 122] főként pedig a 2,4-dinitro-fenil-hidrazint széles körben használják. Ez utóbbi reagenssel a különböző oxovegyületek az oxocsoport környezetétől függően (konjugáció kettős kötésekkel stb.) 350—400 nm tájékán adnak abszorpciós maximumot, amelyek moláris abszorpciós koefficiense a 20—40 000 tartományban van. Az ezekre az igen kedvező spektrális sajátságokra alapozott módszerek közös nehézsége, hogy a fenti spektrumtartományban a reagens feleslege is erős elnyeléssel rendelkezik. Ez a probléma a keletkező hidrazon szelektív extrakciójával [95], kromatográfiás elválasztással [62] vagy jégecetnek mint oldószernek használatával oldható meg; ez utóbbi közegben ui. a reagens feleslege színtelen [121]. Még általánosabban használják ki azt a jelenséget, hogy erősen lúgos oldatban a 2,4-dinitro-fenil-hidrazonok vörös színű kinoidális anion szerkezetet vesznek fel; az 50—100 nm-es batokróm eltolódás jelentősen javítja a meghatározás szelektivitását [76].

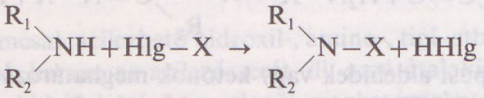
c) Savhidrazidok. A karbonsavhidrazidok közül az izonikotinsav-hidrazid a telítetlen ketoszteroidok legfontosabb reagense [169] (reakcióegyenletet és részleteket lásd a 427. oldalon). Említést érdemel még a tioszemikarbazid, ami ugyancsak megfelelő érzékeny és szelektív reagense elsősorban telítetlen ketonoknak.

Ha az eddig tárgyalt lehetőségek fordítottjaként a (7/4) egyenletet aminok (természetesen kizárólag primer aminok) vagy hidrazinszármazékok meghatározására kívánjuk felhasználni, aromás oxovegyületeket célszerű felhasználni Schiff-bázis, ill.

hidrazonképző reagensként. A leggyakrabban használt ilyen reagensek: szalicilaldehid [109], 4-dimetil-amino-benzaldehid [180], 4-dimetil-amino-cinnamaldehid [122].

Ugyancsak az aminocsoport és oxoreagensek kondenzációján alapulnak olyan fontos módszerek, mint az aminosavak meghatározása a ninhidrines vagy az *o*-ftálaldehides módszerrel. Ezekkel a 10.12. fejezetben foglalkozunk.

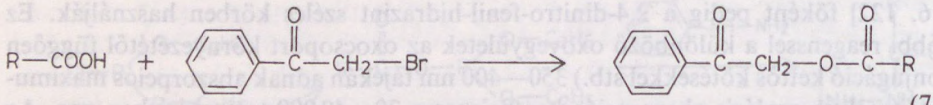
Az eddig tárgyalt, C=N kettős kötés kialakulásán alapuló módszerek mellett C—N egyes kötés kialakulására alapozott módszerek is használatosak aminok analitikájában. A reagensnek (általában halogénszármazék) megfelelően reaktívnak és természetesen spektrofotometriásan aktívnak kell lennie ahhoz, hogy a (7/5) reakcióra alapozott módszer megfelelően hatékony legyen.



(7/5)

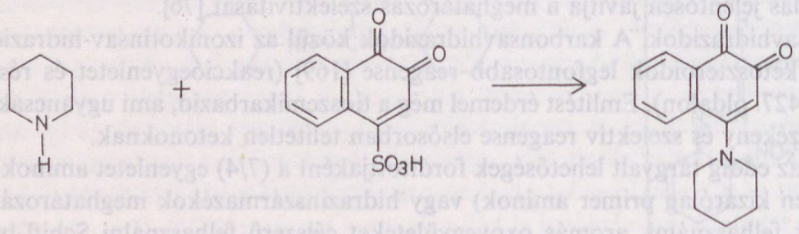
Tipikus Hlg—X reagensek pl. 2,4-dinitro-fluor-benzol [83, 140], 9-klór-akridin [157], ami helyett megfelelően reaktív reakciópartner esetén 9-metoxi-akridin is használható (ilyenkor sósav helyett metanolkilépés játszódik le [156]).

A megfelelően mozgékony halogént tartalmazó spektrofotometriásan aktív reagensek aminokon kívül más funkciós csoportok derivatizálására is alkalmasak. Így pl. fenacil-bromiddal karbonsavak a spektrofotometriásan aktív fenacil-észterré alakíthatók (7/6 reakció). Bár a reagens 4-nitro-származékának felhasználásával a meghatározás spektrofotometriásan is elvégezhető [10], ezt a reakciót inkább az UV-detektorral végzett nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás analízisben alkalmazzák, ahol ez zsírsavak, epesavak stb. standard derivatizációs módszere [1].

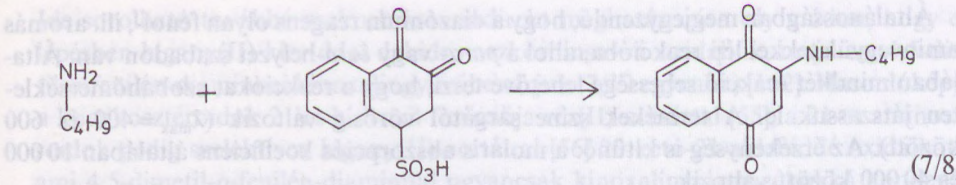


(7/6)

A C—N kötés kialakítását aktív halogénvegyületeken kívül más reagensekkel is el lehet végezni. Ezek közül széles körben használható primer és szekunder aminok meghatározására az 1,2-naftokinon-4-szulfonsav [14]. Amint az a (7/7) és (7/8) egyenleteken látható, a reakció mechanizmusa a különböző típusú aminok esetében különböző [161], a 460—480 nm körül 4000 körüli moláris abszorpciós koefficienssel megjelenő sávok azonban módot nyújtanak a legkülönbözőbb aminok meghatározására.

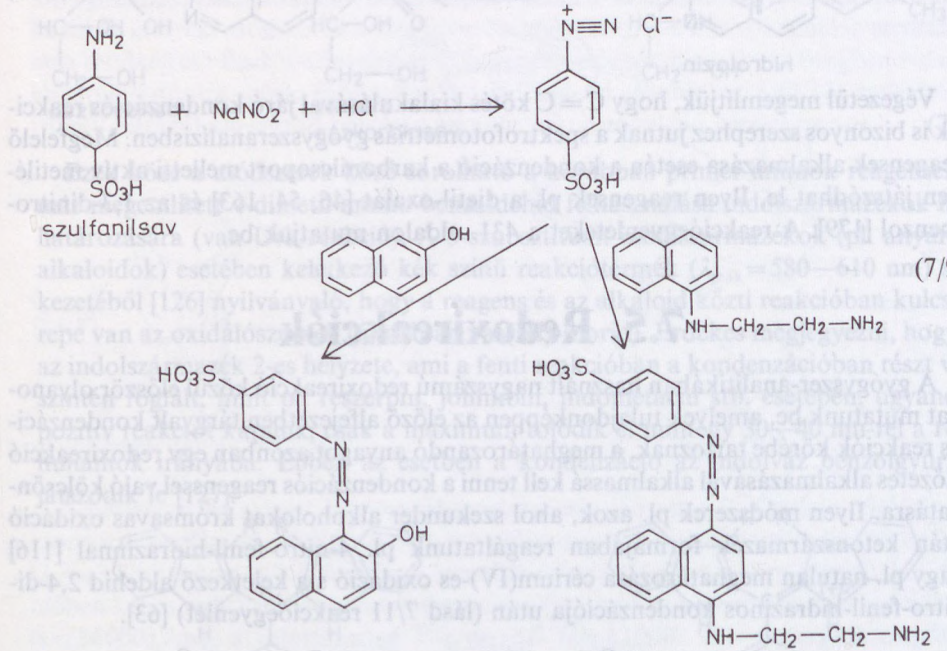


(7/7)



(7/8)

A kondenzációs reakciók között tárgyalandó a kolorimetriás gyógyszeranalízis egyik klasszikus és máig is széles körben alkalmazott módszere, diazotált aromás aminok és fenolok, ill. aromás aminok közötti kapcsolási reakció [17,124*a*]. Ezt *β*-naftol, ill. *N*-(1-naftil)-etilén-diamin és diazotált szulfanilsav reakciójának példáján mutatjuk be a (7/9) reakciósémán:



szulfanilsav

(7/9)

A reakciót a következő esetekben használhatjuk kvantitatív analitikai célokra:

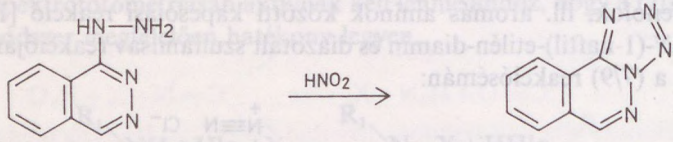
a) Primer aromás aminok meghatározása. Ez esetben nátrium-nitritből *in situ* felszabadított salétromossavval végezzük el a diazóniumsó képzését. Ezt kapcsoljuk egy alkalmas fenollal vagy (általában szekunder vagy tercier) aromás aminnal.

b) Szekunder vagy tercier aromás aminok, ill. fenolok meghatározása. Ez esetben a reagens vagy egy *in situ* diazotált primer aromás amin, vagy valamely kristályos állapotban beszerezhető, stabilis diazóniumsó pl. 4-nitro-fenil-diazónium-fluor-borát.

c) Olyan vegyületek indirekt meghatározása, amelyek valamilyen reakcióban salétromossavat hoznak létre (pl. nitrovegyületek oxidatív hasítása). Ezekben az esetekben a primer aromás amin feleslegével képezzük a második lépésben pl. fenollal kapcsolt diazóniumsót.

Általánosságban megjegyzendő, hogy a diazónium reagens olyan fenol-, ill. aromás aminvegyületekkel lép reakcióba, ahol a *para-* vagy *orto*-helyzet szabadon van. Általában mindkét reakció sebessége lehetővé teszi, hogy a reakciókat szobahőmérsékleten játszassuk le. A termékek színe sárgától vörösig változik ($\lambda_{max} = 400$ és 600 között). Az érzékenység is kitűnő: a moláris abszorpciós koefficiens általában 10 000 és 40 000 között változik.

Mint kuriózumot mutatjuk be a reakció intramolekuláris változatát hidralazin-hidroklorid meghatározására [110], lásd a (7/10) reakciót.

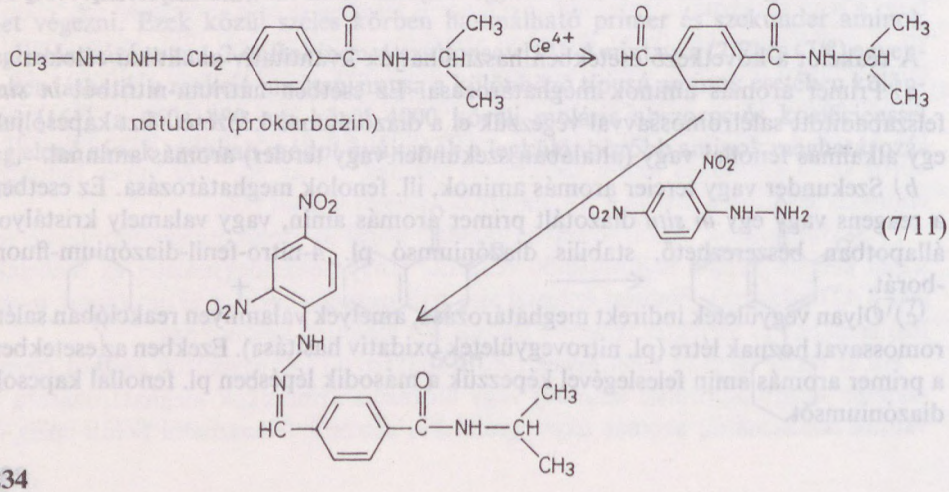


hidralazin (7/10)

Végezetül megemlítjük, hogy C = C kötés kialakulásával járó kondenzációs reakciók is bizonyos szerephez jutnak a spektrofotometriás gyógyszeranalízisben. Megfelelő reagensek alkalmazása esetén a kondenzáció a karbonilcsoport melletti aktív metilénen játszódhat le. Ilyen reagensek pl. a dietil-oxalát [46, 54, 163] és az 1,3-dinitro-benzol [179]. A reakcióegyenleteket a 431. oldalon mutatjuk be.

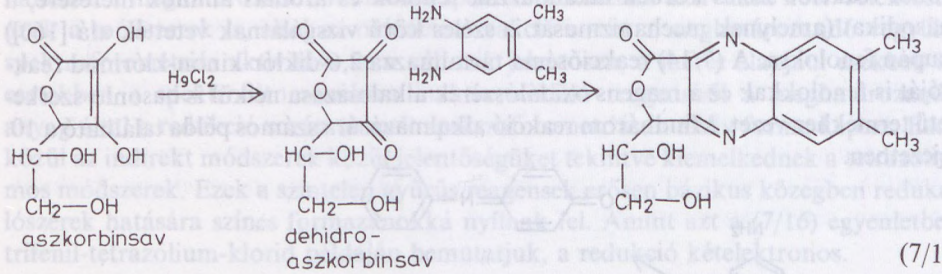
7.5. Redoxireakciók

A gyógyszer-analitikában használt nagyszámú redoxireakció közül először olyanokat mutatunk be, amelyek tulajdonképpen az előző alfejezetben tárgyalt kondenzációs reakciók körébe tartoznak, a meghatározandó anyagot azonban egy redoxireakció előzetes alkalmazásával alkalmassá kell tenni a kondenzációs reagenssel való kölcsönhatásra. Ilyen módszerek pl. azok, ahol szekunder alkoholokat krómsavas oxidáció után ketonszármazék formájában reagáltatunk pl. 4-nitro-fenil-hidrazinnal [116] vagy pl. natulan meghatározása cérium(IV)-es oxidáció s a keletkező aldehid 2,4-dinitro-fenil-hidrazinos kondenzációja után (lásd 7/11 reakcióegyenlet) [63].



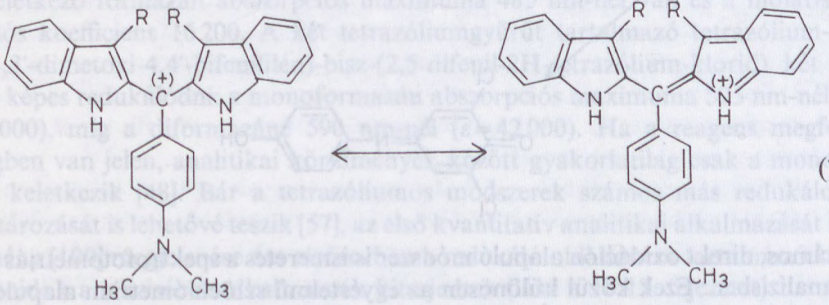
natulan (prokarbazin) (7/11)

Ide sorolható továbbá aszkorbinsav indirekt meghatározása oly módon, hogy első lépésben higany(II)-kloriddal dehidro-aszkorbinsavvá oxidáljuk, majd ezt 4,5-dimetil-*o*-fenilén-diaminnal kinoxalingyűrűbe zárjuk (7/12 egyenlet) [162]. Hasonlóképpen a kortikoszteroidok 21-es hidroxil funkciója réz(II)-acetáttal [55], a 21-es aminoszteroidok pedig szelektíven higany(II)-acetáttal [56] 20-keto-21-aldehiddé oxidálhatók, ami 4,5-dimetil-*o*-fenilén-diaminnal ugyancsak kinoxalinszármazékokká kondenzálható (a reakcióegyenletet lásd a 435. oldalon).



(7/12)

Ezek közé a módszerek közé sorolható a korábban primer aminok reagenseként már megemlített 4-dimetil-amino-benzaldehid felhasználása indolszármazékok meghatározására (van Urk-reakció). A 3-szubsztituált indolszármazékok (pl. anyarozsalkaloidok) esetében keletkező kék színű reakciótermék ($\lambda_{max} = 580$—610 nm) szerkezetéből [126] nyilvánvaló, hogy a reagens és az alkaloid közti reakcióban kulcsszerepe van az oxidálószernek (általában vas(III)-klorid). Érdekes megjegyezni, hogy ha az indolszármazék 2-es helyzete, ami a fenti reakcióban a kondenzációban részt vesz, szintén foglalt, mint pl. reszerpin, johimbin, indometacin stb. esetében, ugyancsak pozitív reakciót kapunk, csak a maximum tolódik el mintegy 30—40 nm-rel a rövid hullámok irányába. Ebben az esetben a kondenzáció az indolváz benzolgyűrűjén játszódik le [127].



(7/13)

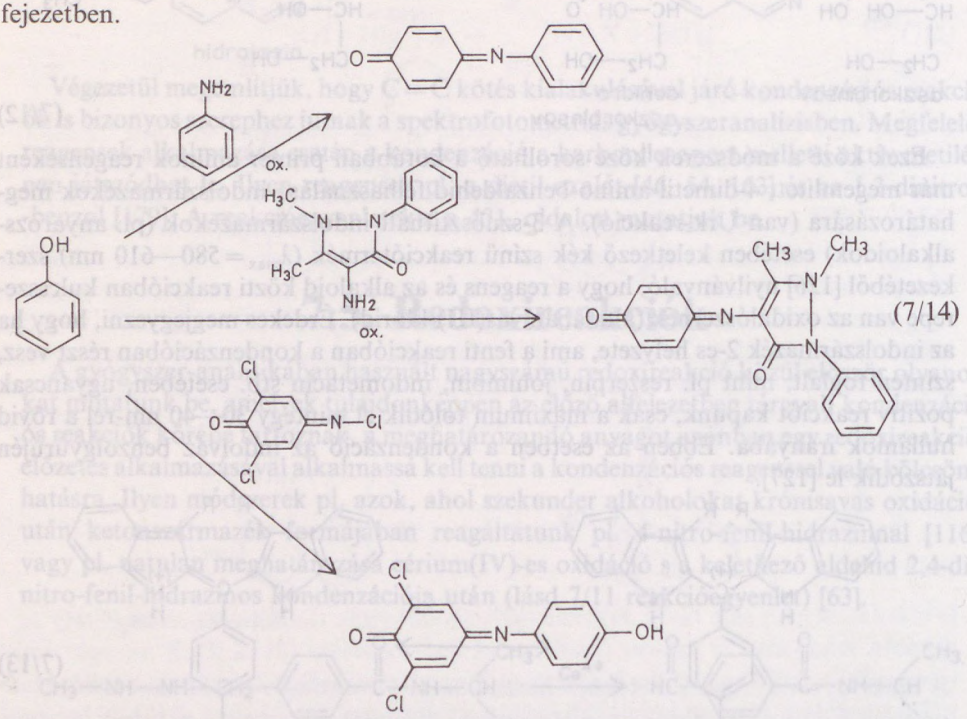
3-szubsztituált indolszármazékok van Urk-reakciótermékének határszerkezetei

Teljesen hasonló jellegű termékhez vezet a formaldehid oxidatív kondenzációja kromotrópsavval (1,8-dihidroxi-naftalin-3,6-diszulfonsav). Az oxidálószer szerepét itt az oldószerként használt tömény kénsav tölti be; a formaldehidből származó metinhíd itt a 4-es helyzetben köti össze a két kromotrópsav egységét, amelyek közül az egyik itt is kinoidális szerkezetet vesz fel ($\lambda_{max} = 570$; $\varepsilon = 18\,200$) [18].

Ennek a módszernek a jelentősége túlmutat a formaldehidnek magának meghatározásán: minden olyan vegyület indirekt meghatározását is lehetővé teszi, amely

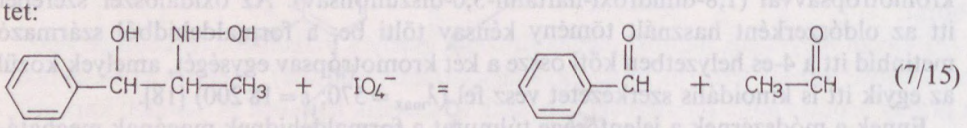
oxidatív hasítással formaldehidet termel, sőt azokét is, amelyek savas hasítással metanolt hoznak létre; ez utóbbi ui. kálium-dikromáttal formaldehiddé oxidálható.

Az oxidatív kondenzációra alapozott fotometriás módszerek közül az egyik legelterjedtebb az indofenol reakció analitikai alkalmazása. Amint az a (7/14) reakcióegyenletben látható, 4-es helyzetben szubsztituálatlan fenolok oxidálószerek jelenlétében kék színű indofenollá kondenzálódnak primer aromás aminokkal vagy hasonló szerkezetű, vörös színű, kinon-imin típusú terméket adnak 4-amino-antipirinnel. Az előbbi reakciót széles körben alkalmazzák fenolok és aromás aminok mérésére, a másodikat (amelynek mechanizmusát is széles körű vizsgálatnak vetették alá [160]) csupán fenolokra. A (7/14) reakcióséma tartalmazza 2,6-diklór-kinon-klórimid reakcióját is fenolokkal: ez a reagens oxidálószerek alkalmazása nélkül is hasonló szerkezetű termékhez vezet. Mindhárom reakció alkalmazására számos példa található a 10. fejezetben.



(7/14)

Számos, direkt oxidáción alapuló módszer is ismeretes a spektrofotometriás gyógyszeranalízisben. Ezek közül különösen az egyértelmű sztöchiometrián alapuló módszerek érdemelnek figyelmet. Így pl. efedrin és számos más fenil-alkanol-amin meghatározást a keletkező benzaldehid meghatározására lehet visszavezetni 237 nm-nél megjelenő intenzív abszorpciós maximuma alapján [24]; lásd a (7/15) reakcióegyenletet:



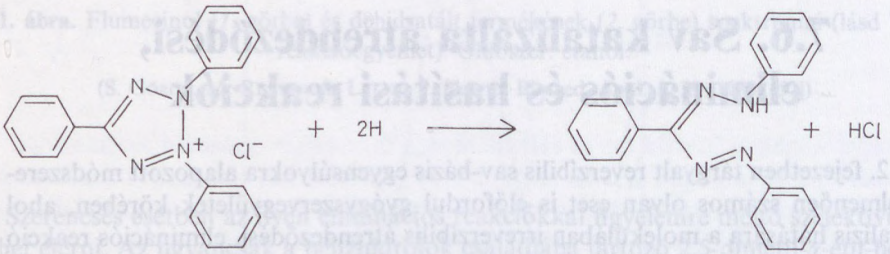
(7/15)

efedrin benzaldehid

Ide sorolható a spektrofotometriásan inaktív szteroid, 2-, ill. 3-ének oxidációja krómsavval spektrofotometriásan aktív α, β-telítetlen ketonszármazékokká [58].

Az erélyes oxidálószerekkel való kölcsönhatáson alapuló igen nagyszámú módszer, mint pl. fenitoin és karbamazepin meghatározására kálium-permanganátos [74] vagy fenotiazinszármazékok mérése *N*-bróm-szukcinimides [165] oxidációja után stb., nem mindig alapul egyértelmű sztöchiometrián.

Valamennyi eddig tárgyalt reakció közös jellemzője volt, hogy az oxidáló reagens hatására a meghatározandó molekula spektrofotometriás aktivitása nőtt. Jelentősek azok a módszerek is, ahol az oxidációs reakció során a meghatározandó vegyület spektrofotometriás aktivitása nem változik jelentősen; a mérés alapjául ezekben az esetekben a spektrofotometriásan inaktív oxidáló reagensből a meghatározandó anyag által a redukció során termelt spektrofotometriásan aktív forma képezi. Ezek közül az indirekt módszerek közül jelentőségüket tekintve kiemelkednek a tetrazóliumos módszerek. Ezek a színtelen gyűrűs reagensek erősen bázikus közegben redukálószerek hatására színes formazánokká nyílnak fel. Amint azt a (7/16) egyenletben trifenil-tetrazólium-klorid példáján bemutatjuk, a redukció kételektronos.



trifenil-tetrazolium-klorid (7/16)

A keletkező formazán abszorpciós maximuma 485 nm-nél van és a moláris abszorpciós koefficiens 16 200. A két tetrazóliumgyűrűt tartalmazó tetrazólium-kék, (3,3′-(3,3′-dimetoxi-4,4′-bifenililén)-bisz-(2,5-difenil-2H-tetrazólium-klorid) két lépcsőben képes redukálódni: a monoformazán abszorpciós maximuma 525 nm-nél van ($\varepsilon = 24\,000$), míg a diformazáné 590 nm-nél ($\varepsilon = 42\,000$). Ha a reagens megfelelő feleslegben van jelen, analitikai körülmények között gyakorlatilag csak a monoformazán keletkezik [48]. Bár a tetrazóliumos módszerek számos más redukálószer meghatározását is lehetővé teszik [57], az első kvantitatív analitikai alkalmazását leíró közlemény [100] megjelenése óta elsősorban a redukáló oldalláncot tartalmazó kortikoszteroidok analízisében alkalmazzák kiterjedten (lásd a 10.13. fejezetet).

A színes termékké redukálható reagensek közül megemlítjük még a foszfor-molibdénsavat, ill. paramolibdátot [72], a Folin—Ciocalteu-reagenst [36] (foszfor-molibdén-volfrámsav), amelyet elsősorban fenolok meghatározására használnak a keletkező kék színű komplex mérése alapján [59, 148], valamint a redukálószerek hatására dinitronsav-anionná alakuló *o*-dinitro-benzolt [34, 98], ami a kortikoszteroidok reagense. Ide sorolható még a kálium-ferricianid is, ami fenol típusú redukáló anyagok (pl. butorfenol [171]) hatására ferrocianiddá redukálódik, ami vas(III) reagenssel Berlini kék alakban 770 nm-nél mérhető, s így a fenolok indirekt meghatározásának

alapját képezi. Ha oxidálószerként vas(III)sókat használunk, akkor a mérést a keletkező vas(III)ionok szelektív fotometriás reagenseivel (α, α'-dipiridil, *o*-fenantrolin) hajthatjuk végre [73].

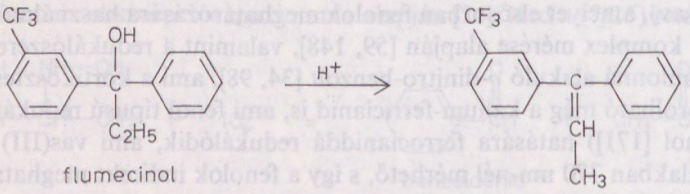
Ebben a redoxireakciók alkalmazásával foglalkozó alfejezetben mindeddig oxidálószer típusú reagensekkel foglalkoztunk. A redukáló reagensek jelentősége lényegesen kisebb, hiszen az esetek többségében a redukció nem növeli, hanem csökkenti a spektrofotometriás aktivitást. Megemlítjük, hogy éppen erre a hatásra épül a nátrium-bór-hidrides differencia-spektrofotometriás módszer [45], amivel a 8.4. fejezetben foglalkozunk. Itt említhető meg az az indirekt módszer, amelyben az analitikai mérést jodidionokból az oxidálószer jellegű meghatározandó anyag hatására kiválasztott jódra vezetjük vissza. Így lehet pl. a metionin egységen szulfoxid szennyezést tartalmazó ACTH meghatározását elvégezni [138]. Amidok és imidek elemi bróm hatására N-Br származékokká alakulnak, amelyek ugyancsak jódot tesznek szabaddá, tehát mérhetők. Ezt az elvet felhasználták nikotinsav-amid, alloxán, szacharin, barbitál, teobromin meghatározására [80].

7.6. Sav katalizálta átrendeződési, eliminációs és hasítási reakciók

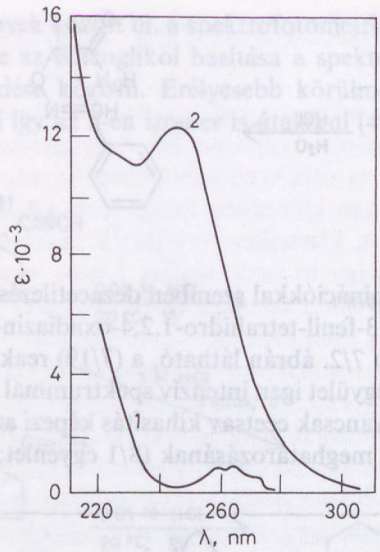
A 7.2. fejezetben tárgyalt reverzíbilis sav-bázis egyensúlyokra alapozott módszereken túlmenően számos olyan eset is előfordul gyógyszervegyületek körében, ahol savkatalízis hatására a molekulában irreverzíbilis átrendeződési, eliminációs reakció vagy akár a molekula kettéhasadása játszódik le, ami a spektrofotometriás aktivitás növekedését vonja maga után. Közös előnyük ezeknek a módszereknek, hogy a reagens erős sav spektrofotometriásan inaktív. Éppen ennél a tulajdonságnál fogva az ilyen reakcióra alapozott módszerek kitűnően alkalmasak a differencia-spektrofotometriás technikához, ezért több ilyen módszert a 8.3. fejezetben tárgyalunk.

A 8.3. fejezetben mutatjuk be a spektrofotometriásan inaktív $\Delta^{5(10)}$-3-keto-szteroidok meghatározását az 5(10) helyzetű kettős kötésnek sav-, ill. bázis katalizálta átrendezése után Δ^{4}-3-keton alakjában.

Az eliminációs reakcióknak a 8.3. fejezetben tárgyalt példáin túlmenően itt az α-etil-benzhidrolok területéről két további példát mutatunk be. Amint az a 7/1. ábrán látható, a spektrofotometriásan csak gyengén aktív, izolált aromás gyűrűket és tercier alkoholos hidroxilt tartalmazó flumecinol sósavas kezelés hatására (7/17 egyenlet) vizet veszít, s a keletkező konjugált, sztirol típusú származék 246 nm-es maximumában jól mérhető [52].



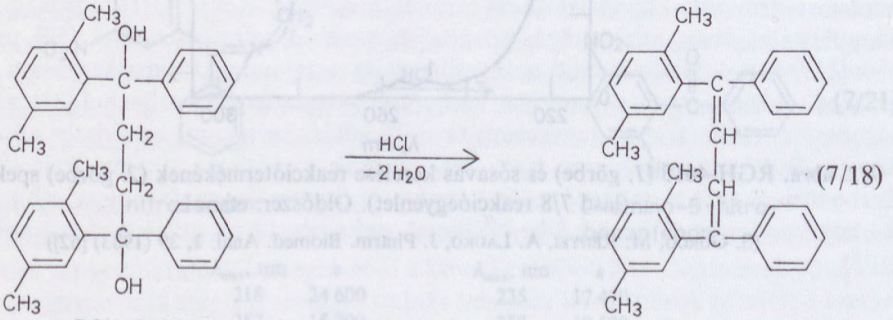
flumecinol (7/17)



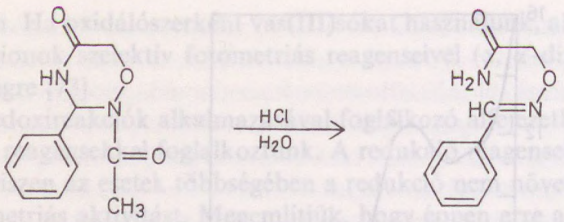
7/1. ábra. Flumecinol (*1.* görbe) és dehidratált termékének (*2.* görbe) spektrumai (lásd 7/17 reakcióegyenlet). Oldószer: etanol.

(S. Görög, M. Rényei, A. Lauko, J. Pharm. Biomed. Anal. **1**, 39 (1983) [52])

Szerencsés esetben az ilyen eliminációs reakciókkal figyelemre méltó szelektivitást lehet elérni. Az ugyancsak a benzhidrolok családjába tartozó 2,5-dimetil-α-etil-benzhidrol (RGH-3395) analóg reakcióban (7/18) alakítható át 247 nm-en mérhető termékké. Fő szennyezése, a dimer jellegű 1,4-di-(2,5-dimetil-fenil)-1,4-difenil-bután-1,4-diol azonos reakcióban két molekula vizet veszít. A keletkező tetrafenil-butadién-származék 332 nm-nél rendelkezik intenzív abszorpciós sávval (ε = 24 500), s így a sósavas kezelés után a szennyezés szelektív meghatározására nyílik lehetőség [52].

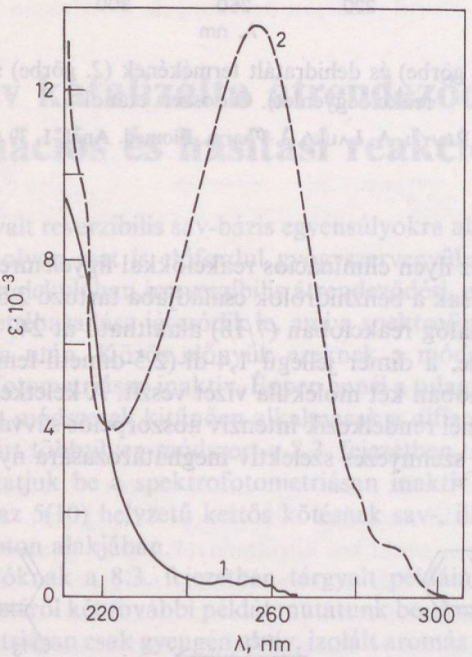


(7/18)



RGH-4615 (7/19)

Az eddig tárgyalt vízeliminációkkal szemben dezacetilezés majd azt követő gyűrűfelnyílás az alapja 2-acetil-3-fenil-tetrahidro-1,2,4-oxadiazin-5-on (RGH-4615) meghatározásának. Amint az a 7/2. ábrán látható, a (7/19) reakció során a spektrofotometriásan gyengén aktív vegyület igen intenzív spektrummal rendelkező benzaldehid-oximmá alakul át [52]. Ugyancsak ecetsav kihasítás képezi az alapját etinodiol-diacetát 8.3. fejezetben tárgyalt meghatározásának (8/1 egyenlet; 271. oldal).

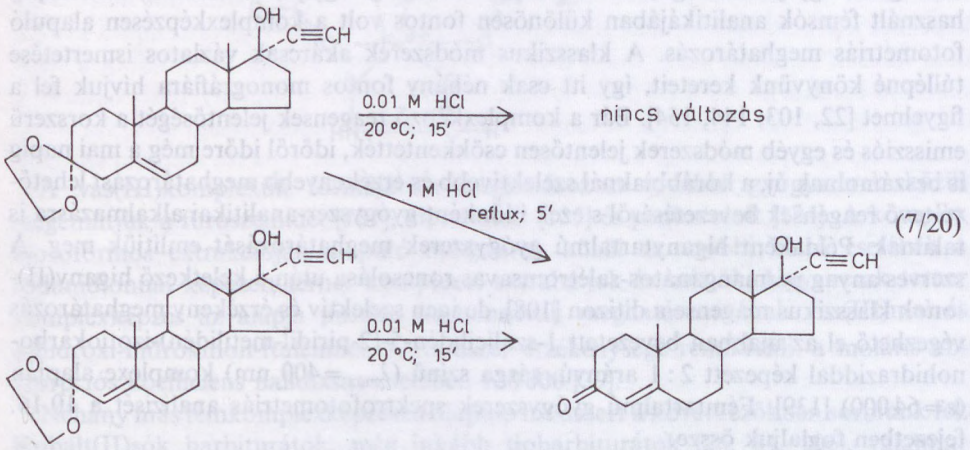


7/2. ábra. RGH-4615 (*1.* görbe) és sósavas kezelése reakciótermékének (*2.* görbe) spektrumai (lásd 7/8 reakcióegyenlet). Oldószer: etanol.

(S. Görög, M. Rényei, A. Laukó, J. Pharm. Biomed. Anal. **1**, 39 (1983) [52])

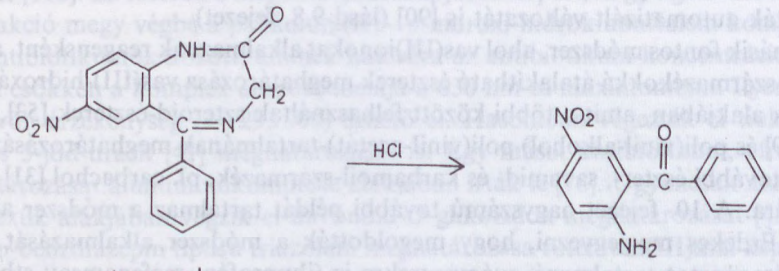
A savas hasítás körülményeinek megfelelő megválasztásával bizonyos esetekben elérhető szelektív hatásokra példa a következő reakciósor. A (7/20) reakcióegyenlet szerint 3-etilén-dioxi-4-én és 3-etilén-dioxi-5-én szteroidok keverékben a 4-én izomer szelektív meghatározását lehet elvégezni, ha igen enyhe savas kezelésnek vetjük alá az

elegyet. Ilyen körülmények között ui. a spektrofotometriásan inaktív izomerek közül csak ebből megy végbe az etilénglikol hasítása a spektrofotometriásan aktív Δ^4-3-keto-származék képződése közben. Erélyesebb körülmények között a két izomer összege mérhető, mivel így az 5-én izomer is átalakul [49].



(7/20)

Savkatalízis hatására végbemenő gyűrűfelnyílás és azt követő aminosavlehasadás játszódik le benzdiazepinek esetében, és ez a (7/21) reakció képezi az alapját azoknak a módszereknek, amelyeket arra alapoztak, hogy a hasítási reakció során keletkező amino-benzofenon-származékok direkt spektrofotometriás meghatározásának lehetőségei jobbak, mint a megfelelő benzdiazepin-származékoké [8, 30, 151]. A reakciót nitrazepám példáján mutatjuk be.



(7/21)

nitrazepám

2-amino-5-nitro-benzofenon

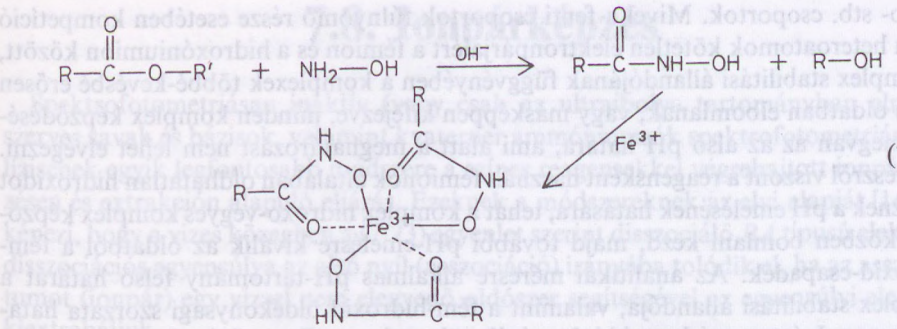
λ_{max}, nm	ε	λ_{max}, nm	ε
218	24 600	235	17 470
257	15 700	358	18 590
308	10 300		

7.7. Fémkomplexek képződése

Színes fémkomplexek képződése a gyógyszer-analitika kezdeteitől napjainkig számos spektrofotometriás módszer alapját képezi. A gyógyszerkémia korai időszakában igen nagy jelentőségű, és csökkenő mértékben ugyan, de mind a mai napig használt fémsók analitikájában különösen fontos volt a komplexképzésen alapuló fotometriás meghatározás. A klasszikus módszerek akárcsak vázlatos ismertetése túllépné könyvünk kereteit, így itt csak néhány fontos monográfiára hívjuk fel a figyelmet [22, 103, 144, 154]. Bár a komplexképző reagensek jelentőségét a korszerű emissziós és egyéb módszerek jelentősen csökkentették, időről időre még a mai napig is beszámolnak új, a korábbiaknál szelektívebb és érzékenyebb meghatározást lehetővé tevő reagensek bevezetéséről s ezek időnként gyógyszer-analitikai alkalmazásra is találnak. Példaként higanytartalmú gyógyszerek meghatározását említjük meg. A szerves anyag permanganátos-salétromsavas roncsolása után a keletkező higany(II)-ionok klasszikus reagense a ditizon [108], de igen szelektív és érzékeny meghatározás végezhető el az újabban bevezetett 1-szalicilidén-5-(2-piridil-metilidén)-izotiokarbonohidraziddal képezett 2 : 1 arányú, sárga színű ($\lambda_{max} = 400$ nm) komplexe alapján ($\varepsilon = 64\,000$) [139]. Fémtartalmú gyógyszerek spektrofotometriás analízisét a 10.16. fejezetben foglaljuk össze.

A mai gyógyszer-analitika számára lényegesen fontosabbak azok a módszerek, ahol a fémsók a reagensek és a komplexképzés során kialakuló színes termék mérését a ligand típusú gyógyszerek mérésére használjuk fel. A leggyakrabban alkalmazott fémion a vas(III)ion, ami szalicilsav klasszikus reagense [117] (lásd 10.3. fejezet), és mivel a komplexképzés során kialakuló ibolyaszín megjelenésének feltétele a szabad karboxil- és fenolos hidroxilcsoportok egyidejű jelenléte, a módszert széles körben alkalmazzák acetil-szalicilsavban szennyezésként vagy bomlástermékként jelenlevő szabad szalicilsav szelektív meghatározására [19, 158, 167]. A módszer alkalmas szalicilsavnak biológiai mintákban való meghatározására [168], és ennek a módszernek leírták automatizált változatát is [90] (lásd 9.8. fejezet).

Egy másik fontos módszer, ahol vas(III)ionokat alkalmaznak reagensként, a hidroxámsav-származékokká átalakítható észterek meghatározása vas(III)-hidroxámsavas komplex alakjában, amit a többi között felhasználtak szteroid-észterek [53], piracetám [119] és poli(vinil-alkohol) poli(vinil-acetát)-tartalmának meghatározására [6] és számos további észter-, savamid- és karbamoil-származék, pl. carbachol [31] meghatározására. A 10. fejezet nagyszámú további példát tartalmaz a módszer alkalmazására. Érdekes megjegyezni, hogy megoldották a módszer alkalmazását szabad karboxilcsoportot tartalmazó gyógyszerekre is (ibuprofén, mefenamsav stb.). Itt a karboxilcsoportot diciklohexil-karbodiimid segítségével kapcsolják hidroxil-aminnal [105].



(7/22)

A vas(III)komplexük formájában meghatározott további gyógyszerek közül megemlítjük a furoszemidet [181], alprenololt [135] és penbutololt [134]. A komplex kloroformos extrakcióján alapuló módszerek közül az utóbbi kettő esetében a rodanidionnal képezett terner komplexet extraháljuk és mérjük. Ugyancsak terner komplexképzés az alapja piridon karbonsavak meghatározásának vas(III)mal és *o*-hidroxi-hidrokinon-ftaleinnel. A módszer érzékenysége rendkívüli: a moláris abszorpciós koefficiens nalidixsav esetében 130 000 [39].

Néhány más fémkomplexképzésen alapuló módszert a következőkben sorolunk fel. Kobalt(II)sók barbiturátok, még inkább tiobarbiturátok [26, 64, 106], valamint thiacetazon [149] reagensei. Réz(II)sók a reagensei a többi között citromsav [89], prokainamid [178], rutin [133], valamint — nioximos vegyes komplex formájában — aszkorbinsav [104] meghatározásának. Ugyancsak vegyes komplex [mangán(II)-*o*-hidroxi-hidrokinonftalein—sztreptomicin] képződése az alapja a sztreptomicin meghatározásának [40].

Palládium(II)ionnal végbemenő komplexképzés az alapja polithiazid [2], pralidoxim [79], furoszemid [3] és etionamid [153] meghatározásának. Ugyancsak palládium(II)komplexekkel kapcsolatos a cefalexin és ampicillin meghatározására szolgáló módszer [112]. Ez esetben a meghatározás alapját az képezi, hogy ligandum kicserélődési reakció megy végbe a palládium(II)—*o*-hidroxi-hidrokinonftalein komplex és a fenti antibiotikumok között, aminek hatására az antibiotikum-koncentrációval arányosan csökken a komplex abszorbanciája a 630 nm-es maximumban. Ilyen módon rendkívüli érzékenység ($\varepsilon = 293\,000$) érhető el. Hasonlóan végezték el tiokarbamid [111] és 5-jód-uracil [41] meghatározását is. Egy másik antibiotikum, efrotomicin meghatározását alumíniumkomplexe alakjában írták le [78]. Ugyancsak alumíniumkomplexük alakjában végzik el flavonoid-*O*-glikozidok meghatározását [43], míg a triazolo-benzdiazepin típusú triazolam meghatározása rutenium(III)mal képzett 1 : 1 arányú komplexe formájában végezhető el 570 nm-nél [42].

A felsorolt, valamint az irodalomban leírt számos más, komplexképzésen alapuló módszer tapasztalatainak összegzéséből a következő főbb következtetések vonhatók le. A meghatározás alapjául szolgáló stabilis komplex létrejöttének feltétele a szerves gyógyszermolekula oldaláról az, hogy tartalmazzon legalább két olyan elektronpár donor csoportot, amelyek szterikus elhelyezkedése lehetővé teszi a fémionnal kelát típusú komplex létrejöttét. Az elektronpár donor csoportok leggyakrabban a következők: karboxil-, hidroxil- (főként enolos és fenolos), tiol-, keton-, tioketon-, amino-,

imino- stb. csoportok. Mivel a fenti csoportok túlnyomó része esetében kompetíció van a heteroatomok kötetlen elektronpárjaiért a fémion és a hidroxóniumion között, a komplex stabilitási állandójának függvényében a komplexek többé-kevésbé erősen savas oldatban elbomlanak, vagy másképpen kifejezve, minden komplex képződésének megvan az az alsó pH határa, ami alatt a meghatározást nem lehet elvégezni. Másrészről viszont a reagensként használt fémionok általában oldhatatlan hidroxidot képeznek a pH emelésének hatására, tehát a komplex hidroxo-vegyes komplex képződése közben bomlani kezd, majd további pH-emelésre kiválik az oldatból a fém-hidroxid-csapadék. Az analitikai mérésre alkalmas pH-tartomány felső határát a komplex stabilitási állandója, valamint a fém-hidroxid oldékonysági szorzata határozza meg. Igényes módszer kidolgozásához hozzátartozik a mérés alapjául szolgáló komplex stabilitási állandójának, valamint a protonálódási állandóknak meghatározása, de legalábbis annak a pH-tartománynak empirikus úton való meghatározása, amelyen belül a meghatározás alapjául szolgáló spektrum nem változik a pH függvényében. Ugyancsak fontos feladat a komplex összetételének (fém : ligand arány) meghatározása, valamint ennek függvényében a fémreagens feleslegének optimalizálása és szigorú betartása, mivel esetenként lehetőség van változó összetételű, egymástól spektrális sajátságaikban különböző komplexek képződésére. A komplex egyensúlyokkal kapcsolatos kérdések alaposabb megismerésére magyar szerzők kitűnő monográfiáit ajánljuk [12, 21, 71]. Az analitikai mérés alapjául szolgáló komplex képződése az esetek túlnyomó részében pillanatszerű vagy legalábbis szobahőmérsékleten igen gyors folyamat, de találkozunk lassú komplexképzési reakciókkal is. A korábbiakban említett alumíniumkomplex-képzésen alapuló efrotomicinmeghatározás esetében pl. [78] az igen gondosan meghatározott optimális reakcióidő 15 perc volt 37 °C hőmérsékleten.

Végül megemlítünk néhány olyan módszert, ahol a reagens fémsó, ill. komplex, a módszer mégsem tekinthető komplexképzésen alapuló eljárásnak. Ez vonatkozik pl. az antimon(III)-kloridos színreakción alapuló módszerekre, amelyeknek különösen a D-vitaminok analitikájában van nagy jelentőségük [11, 47]. Itt ui. a szín kialakulásában a molekulaszerkezet megváltozásának van döntő jelentősége. Nátrium-hexanitrito-kobaltát a *p*-szubsztituált fenolok, pl. prenalterol [177] spektrofotometriás meghatározásának reagense; a lúgos közegben 473 nm-nél elvégezhető spektrofotometriás mérés alapja ez esetben *o*-nitrozo-fenol-származék képződése.

Több klasszikus alkaloid reagens ugyancsak fémkomplex, így pl. a szerves bázisok meghatározására széles körben használatos Reinecke-só (ammónium-tetrarodanato-diamino-kobaltát [65] vagy maga a kobalt(II)-tetrarodanato komplex [94]). Ez esetekben nem szoros értelemben vett komplexképződés, hanem ionpárképzés megy végbe a komplex anion és a kvaterner ammóniumkation, ill. savas közegben protonált alkaloid bázis között. Ilyen kölcsönhatáson alapuló módszerekkel a következő alfejezetben foglalkozunk.

7.8. Ionpárképzés

Spektrofotometriásan inaktív (vagy csak az ultraibolya tartományban elnyelő) szerves savak és bázisok, valamint kvaterner ammóniumsók spektrofotometriás analízisének egyik legfontosabb módszere a színes reagensekkel végrehajtott ionpárképzésen és extrakción alapuló eljárás. Ezeknek a módszereknek az elvi alapját [146] az képezi, hogy a vizes közegben a (7/23) egyenlet szerint disszociáló *BA* típusú elektrolit disszociációs egyensúlya az alsó nyíl (asszociáció) irányába tolódik el, ha az asszociátumot (ionpár) egy vízzel nem elegyedő oldószer segítségével az egyensúlyi elegyből kiextraháljuk.

$$BA \rightleftharpoons B^+ + A^- , \qquad (7/23)$$

ahol B^+ kvaterner ammóniumkation vagy protonált primer, szekunder vagy tercier amin kation, A^- pedig a legkülönbözőbb szervetlen vagy szerves savanion. Az extrakció egyensúlyi viszonyait az extrakciós konstanssal (K_{ex}) jellemezhetjük:

$$K_{ex} = \frac{BA_{szerv}}{B^+_{H_2O} \cdot A^-_{H_2O}} . \qquad (7/24)$$

A (7/24) egyenlet számlálójában a szerves fázisba az extrakció során átment ionpár koncentrációja található, a nevezőben pedig a kation és az anion koncentrációja az extrakció után a vizes fázisban.

Az extrakció hatásfoka a megoszlási hányadossal jellemezhető. Ha célunk megfelelő A^- ellenion segítségével a protonált bázis vagy kvaterner ammóniumion extrakciója, a megoszlási hányados képlete a következőképpen alakul:

$$P_B = \frac{BA_{szerv}}{B^+_{H_2O}} = K_{ex} \cdot A^-_{H_2O} . \qquad (7/25)$$

Ha pedig célunk egy szerves savanion extrakciója, akkor

$$P_A = \frac{BA_{szerv}}{A^-_{H_2O}} = K_{ex} \cdot B^+_{H_2O} . \qquad (7/26)$$

Amint az a (7/25) egyenletből látható, kvaterner ammóniumvegyületek vagy protonált bázisok extrakciójának hatásfoka egyenesen arányos az ellenion koncentrációjával és az extrakciós konstanssal. Az extrakciós konstanst befolyásoló tényezők közül elsőként az ellenion szerkezetét kell megemlíteni. A 7/1. táblázat adataiból [146a] látható, hogy a negatív töltést hordozó csoportok közül a szulfonsav-csoport erősebb ionpárképző, mint a karboxil, növeli az extrakciós konstanst az apoláris molekularész nagysága, csökkenti viszont az esetleg jelenlevő, nem ionizáló, poláris csoport. (A benzoesav—3-hidroxi-benzoesav—szalicilsav adatok összevetéséből viszont az látszik, hogy az *orto*-helyzetű hidroxilcsoport intramolekuláris hidrogénhíd-képződés folytán erősen növeli az extrakciós konstanst.) Kitűnő ionpárképzők a megfelelően ionizáló fenolok is.

Ami az amincsoporthoz kötődő apoláris molekularész nagyságát illeti, ez hasonló irányban és mértékben befolyásolja az extrakciós konstanst, mint azt az ellenion

7/1. táblázat. Tetrabutil-ammónium ionpárok extrakciós konstansai a kloroform-víz rendszerben [146a]

Ionpárképző anion	log K_{ex}
Cl^-	—0,11
Br^-	1,29
I^-	3,01
ClO_4^-	3,48
acetát	—2,1
fenil-acetát	0,27
benzoát	0,39
3-hidroxi-benzoát	—1,54
szalicilát	2,42
pikrát	5,91
p-toluol-szulfonát	2,33
naftalin-2-szulfonát	3,45
antracén-2-szulfonát	5,11
metilnarancs	5,47
brómtimolkék	8,0

esetében ismertettük. Az extrakciós konstans általában nő a primer-szekunder-tercier-kvaterner sorban, pl. a *n*-propil-amin, di-*n*-propil-amin, tetra-*n*-propil-ammónium sorban a pikrátok extrakciós konstansainak logaritmusai (oldószer: diklór-metán) sorban —0,57, 2,33 és 4,46 [146b].

Az extrakciós konstanst és ezen keresztül a megoszlási hányadost befolyásoló második fontos tényező a vízzel nem elegyedő oldószer megfelelő megválasztása. Leggyakrabban benzolt, kloroformot és diklór-metánt alkalmaznak. A hidrogénhídkötésre alkalmas kloroform és diklór-metán extrakciós állandói nagyobbak, s ennek különösen poláris csoportot is tartalmazó bázisok extrakciója esetén van jelentősége, erősen poláris bázisok extrakciójához magasabb dielektromos állandójú oldószerre (pl. pentanol) van szükség.

Aminok és ammóniumvegyületek ionpár-extrakcióját befolyásoló harmadik igen fontos tényező a vizes oldatban fennálló protolitikus egyensúlyi állapot, amit az extrahálandó bázis, az ellenion szolgáltató sav p*K*-értékei, valamint az oldat pH-ja határoz meg. Viszonylag a legegyszerűbb a helyzet a kvaterner ammóniumsók esetében. Ezek ui. a pH-tól függetlenül gyakorlatilag teljesen disszociált állapotban vannak jelen a teljes pH-skála mentén, s így az extrahálhatóság pH-függése csupán az ellenion oldaláról jelentkezik. Szervetlen ellenionok (bromid, jodid, perklorát) és az analitikailag is jelentős szerves ionpárképző reagensek közül a szulfonsavak esetében gyakorlatilag bármelyik pH-n dolgozhatunk, a leggyakrabban alkalmazott gyenge vagy középerős sav típusú ionpárképzők esetében általában semleges vagy gyengén lúgos közegben dolgozunk, ahol ezek teljes disszociációja biztosítható. Sokkal bonyolultabb a helyzet primer, szekunder és tercier aminok esetében. Itt ui. az ionpárképzésnek az a feltétele, hogy a bázis protonált állapotban legyen jelen, tehát célszerű a protonált bázis pK_a-értékénél legalább 1 egységgel alacsonyabb pH-n dolgozni. A pH tetszés szerinti csökkentésének természetesen határt szab az a követelmény, hogy

az extrahálandó oldatban levő ionpárképző reagensnek disszociált állapotban kell jelen lenni, hogy biztosítsa a protonált amin extrakcióját, és ne következhessék be a disszociálatlan reagens esetleges extrakciója is. Az elmondottakból következik, hogy ilyen esetekben az extrakció pH-ját gondosan optimalizálni kell, ill. az átlagosnál gyengébb bázisok extrakciója esetén célszerű erősebben savas karakterű ionpárképző reagenst választani.

A (7/26) egyenlet alapján teljesen hasonló meggondolások érvényesek arra — a gyógyszer-analitikai gyakorlatban ritkább — esetre, amikor bázikus reagenssel savkarakterű gyógyszerek anionját kívánjuk ionpár alakjában extrahálni.

Az eddigiek során az ionpárképző reagenssel szemben azt az igényt fogalmaztuk meg, hogy az extrakció pH-ján jól oldódjék vízben és rosszul a választott szerves oldószerben, továbbá biztosítsa a meghatározandó anyag kvantitatív extrakcióját a szerves fázisba. Mivel célunk ez esetben az extrahált komponens spektrofotometriás meghatározása,* alapvetően fontos követelmény a reagenssel szemben az, hogy a meghatározandó komponenssel képzett ionpárnak intenzív színe legyen a szerves fázisban ($\varepsilon \sim 10\,000$—$30\,000$), ugyanakkor a reagens vak érték (a szerves fázisba a meghatározandó anyag távollétében átoldódó ionpárképző reagens abszorbanciája a mérés hullámhosszán) elhanyagolhatóan kis érték legyen az ionpár abszorbanciájához viszonyítva. Az abszorpciós maximumok hullámhossza és intenzitása természetesen a vizsgálandó anyag, az alkalmazott reagens és az extraháló oldószer függvénye.

Ami az ionpár-extrakciós módszer gyógyszer-analitikai alkalmazásait illeti, a módszer a 40-es évek eleje óta egyike (különösen alkaloidok és rokonvegyületek, aminok és ammóniumvegyületek analitikájában) a legelterjedtebb fotometriás módszereknek. A módszer korai irodalmának kitűnő összefoglalása található Higuchi és Brochmann-Hanssen monográfiájában [66]. (A kezdeti közleményekben az extraktum közvetlen spektrofotometriás mérése mellett olyan megoldások is szerepeltek, hogy az extraktumban levő ionpárt vizes lúgoldattal megbontották, és a vizes lúgos fázisba visszarázott indikátorfestéket mérték [93]).

Kitűnő érzékenységük, az oldat pH-jával, az extraháló oldószer és az ionpárképző reagens megválasztásával jól befolyásolható szelektivitásuk, viszonylagos egyszerűségük és egyértelmű kémiai alapjaik következtében az ionpár-extrakción alapuló módszereket a legutóbbi időkig széles körben alkalmazzák a gyógyszer-analitikában a fent felsorolt vegyületek meghatározására. Az utóbbi években megjelent közlemények azt mutatják, hogy a módszer maga alig változik (általában az extraktum közvetlen spektrofotometriás mérését végzik el), és túlnyomó részben néhány jól bevált ionpárképző reagenst alkalmaznak új feladatok megoldására. Ezek közül kiemeljük a brómtimolkéket ($pK_a = 7{,}07$), a brómfenolkéket ($pK_a = 3{,}87$), a brómkrezolzöldet ($pK_a = 4{,}76$), a brómkrezolbíbort ($pK_a = 6{,}12$), a metilnarancsot ($pK_a = 3{,}40$) és a pikrinsavat ($pK_a = 0{,}38$), de a 10/1. és 10/3. táblázatokban (323. és 356. oldal) számos más, részben a közelmúltban bevezetett ionpárképző festék alkalmazását is bemutatjuk.

* Az ionpárképződés az alapja a folyadékkromatográfiás technikák egyik legmodernebb és legnagyobb teljesítőképességű ágazatának; itt természetesen nem támasztunk követelményt a reagens spektrofotometriás aktivitásával szemben.

Tipikus alkalmazások pl. bisz-kvaterner ammónium-szteroidok, mint pankurónium-bromid [23, 166] és pipecuronium-bromid [47] meghatározása brómfenolkék, ill. brómtimolkék ionpárképzőkkel. Ez utóbbi reagenst sikerrel alkalmazták a többi között kodein, efedrin, prokain, pirilamin és tiamin [28], oxprenolol [133], kolin stb. [9], metoklopramid [118], butetamat [60], valamint tilidin [182] meghatározásánál.

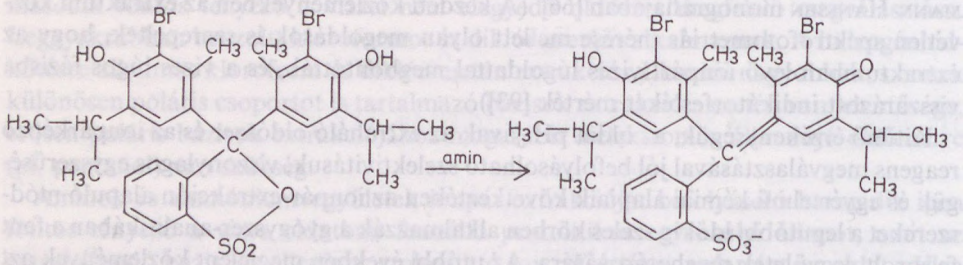
A különleges technikák alkalmazásai közül megemlítjük benzalkónium-klorid és klórhexidin meghatározását ugyancsak brómtimolkék reagens alkalmazásával. Ez esetben az extrakció elhagyható volt: a szabad festékion 7,5-es pH-n 610 nm-nél levő abszorpciós maximumában az ionpárképződés következtében mérhető abszorbancia-csökkenés arányos a kvaterner ammóniumvegyületek koncentrációjával [97].

Szintén brómtimolkék a reagense annak az érdekes módszernek [155], ahol egyidejűleg sikerült kiküszöbölni primer, szekunder és tercier aminok meghatározásából az extrakciót és a mérési hullámhossz, valamint az abszorpciós koefficiens függését a meghatározandó amintól. A reagens itt butil-szkopolamin-bromid és brómtimolkék ekvimoláris elegyének diklór-metános oldata. A meghatározandó amin diklór-metános oldatát a reagens nagy feleslegéhez hozzáadva a következő reakció játszódik le:

$$(\text{butil-szkopolamin}^+\text{-bromid}^- + \text{brómtimolkék}) + \text{amin} \rightleftharpoons$$

$$\rightleftharpoons \underset{\text{ionpár}}{\text{butil-szkopolamin}^+\text{brómtimolkék}^-} + \text{amin-hidrobromid.}$$

A szulfoftalein típusú brómtimolkék diklór-metánban a kvaterner ammóniumsó jellegű butil-szkopolamin-bromid jelenlétében is színtelen, az aminnal ekvivalens mennyiség azonban átalakul a nyitott-kinoidális anionos szerkezetté.



brómtimolkék (7/27)

Mivel ez utóbbi a nagy feleslegben jelenlevő butil-szkopolaminium kationnal képez ionpárt, a maximum hullámhossza és a moláris abszorpciós koefficiens független az amin minőségétől ($\lambda_{max} = 412$ nm; $\varepsilon = 18\,620$).

Brómfenolkék—kinin [141], ill. brómkrezolzöld—kinin [142] ionpár a reagense különböző kvaterner ammóniumvegyület spektrofotometriás meghatározásának. Ennek a módszernek részleteit a 17.1. fejezetben ismertetjük. A klasszikus reagensek újabb alkalmazásai közül megemlítjük pikrinsav felhasználását dibenzociklohepta-dien [29], ill. metilnarancs felhasználását klórhexidin [129], valamint számos alkaloid [65] meghatározására, továbbá brómkrezolzöld alkalmazását dicyclomin készítmények mérésére [136].

Sav karakterű anyagok meghatározásának bázisos ionpárképzőkkel lényegesen kisebb a jelentősége a gyógyszer-analitikában, mint aminok eddig tárgyalt meghatározásának. Megemlítjük fenilbutazon és szacharin meghatározását bázisos fukszin reagenssel [173]. Az előbbi esetben a kloroformos extrakciót 7,8-as, az utóbbiban pedig 6,0-os pH-n hajtják végre. További reagensek pl. a metilénkék [150] és a metilénibolya [145] stb.

Végül megemlítjük, hogy a savas csoportokat tartalmazó heparin és különböző festékek közti ionpárképződés alapját képezi a meghatározására szolgáló spektrofotometriás módszereknek, amelyeket az antikoaguláns aktivitással bizonyos fokú korrelációt mutató eredményeik alapján felhasználták heparin biológiai mintákban való meghatározására. A számos kipróbált festék közül azúr A [81], Níluskék A [159] és azokarmin G [61] érdemel említést.

7.9. Töltésátviteli komplexek képződése

Bizonyos, elsősorban heteroatomokat tartalmazó telítetlen molekulák utraibolya abszorpciós sávjainak értelmezésénél fel kell tételezni, hogy a fényelnyelés mechanizmusában ez esetekben szerephez jut a molekula elektronrendszerének a foton hatására bekövetkező olyan intramolekuláris átrendeződése, ami a molekulán belüli elektromos töltés eltolódásával, ill. dipólusok kialakulásával jár (töltésátviteli sávok) [38, 137]. Különös és analitikai szempontból fontos esetei az ilyen típusú fényelnyelésnek az ún. töltésátviteli komplexek abszorpciós spektrumai. Ezeknek az elektrondonor—elektronakceptor kölcsönhatáson alapuló komplexeknek a fényelnyelése során a töltésátvitel a komplexben asszociálódott két komponens között játszódik le a fényelnyelés során, aminek következtében a meghatározandó komponens spektrumához képest jelentősen, bizonyos esetekben igen jelentősen hosszabb hullámú tartományban új sáv jelenik meg. A donorok közül az aminokat, szulfidokat, étereket, oxoszármazékokat, aromás vegyületeket, az akceptorok közül pedig a molekuláris halogéneket és elektronszívó csoportokat tartalmazó aromás származékokat emeljük ki. A töltésátviteli komplexekkel kapcsolatos elméleti kérdések összefoglalása megtalálható Rao [137], valamint Foster [38] monográfiájában; itt néhány analitikai alkalmazás bemutatására szorítkozunk.

Mint legegyszerűbb példával, halogenidionok spektrumával kezdjük a felsorolást. Klorid-, bromid- és jodidionok vizes közegben 184, 198, ill. 226 nm-nél rendelkeznek abszorpciós maximummal. A sávok keletkezésénél a halogenidanion—alkálifém-kation ionpáron belül a negatív töltésnek a fényenergia hatására a halogenidről az alkálifémre való átvitele tételezhető fel. Ha oldószerként a kis polaritású és ezért az ionpár képződésének kedvező szén-tetrakloridot alkalmazzák, akkor az abszorpciós maximumok 246, 260, ill. 290 nm-ig tolódnak el. Hasonló eltolódásokat kapunk, ha vizes közegben akceptorként jódmolekulát használunk. A J_2Cl^- komplex maximuma 245 nm-nél van ($\varepsilon = 23\,000$), a J_2Br^- komplexé pedig 265 nm-nél ($\varepsilon = 32\,700$). Bár a komplexek stabilitási állandói igen alacsony értékek $\left(K = \frac{[J_2Hlg^-]}{[J_2][Hlg^-]}\right.$ a klo-

ridkomplex esetében 2,1, a bromidkomplexnél pedig 11,0), állandó ($3 \cdot 10^{-4}$ M) jódkoncentráció mellett klorid esetében $4 \cdot 10^{-3}$—$6 \cdot 10^{-2}$ M koncentrációtartományban 245 nm-nél, bromid esetében pedig a $8 \cdot 10^{-4}$—$1{,}2 \cdot 10^{-2}$ M tartományban 265 nm-nél az abszorbancia lineáris függvénye a halogenidkoncentrációnak. Mivel a jód csekély elnyelését az adott koncentrációkban az adott hullámhosszakon reagens összehasonlító oldat alkalmazásával kompenzálni lehet, a kalibrációs egyenesek az origóba futnak be. Ezt a módszert gyógyszer-analitikai célokra is felhasználták [67]. A módszer érdekessége, hogy a komplex csekély stabilitása miatt a spektrofotometriás mérés tárgyát képező komplex képződésben a feleslegben jelenlevő meghatározandó halogenideknek csak néhány tized százaléka vesz részt.

A módszernek kvaterner ammóniumsó típusú gyógyszerekre való alkalmazása során úgy jártak el, hogy kvaterner ammónium-halogenid ionpárt kloroformmal extrahálták a tabletta vagy vizes oldatos készítményből, majd akceptorként ez esetben is (kloroformban oldott) jódot alkalmaztak (ezúttal nagy feleslegben). A meghatározást kvaterner ammónium-kloridok esetében 263 és 368, bromidok esetében 280, jodidok esetében pedig 295 és 365 nm-nél végezhetjük el. A moláris abszorpciós koefficiensek tízezres nagyságrendűek, részben ezért, részben a jód feleslege, részben pedig a komplexnek kloroformos közegben észlelhető nagyobb stabilitása miatt a módszer a legkülönbözőbb kvaterner ammóniumvegyületek megfelelő érzékenységgel való meghatározását teszi lehetővé [1].

Kvaterner ammóniumvegyületeknek a hozzájuk kapcsolódó halogenidionon keresztüli fent ismertetett indirekt meghatározásával szemben tercier aminok megfelelő oldószerben legkülönbözőbb donorokkal képeznek spektrofotometriás meghatározásukat lehetővé tevő töltésátviteli komplexet. Így pl. prokain meghatározását acetonitriles közegben jóddal ($\lambda_{max} = 360$ nm), 2,4,5,7-tetranitro-fluorenonnal ($\lambda_{max} = 535$ nm) és 7,7,8,8-tetraciano-kinodimetánnal ($\lambda_{max} = 745$ nm)* is leírták [88]. Klonidin meghatározását a bázis kloroformos extrakciója után ugyancsak jóddal képezett komplexe segítségével lehet elvégezni ($\lambda_{max} = 295$) [86]. Ezeket és más akceptorokat a spektrofotometriás analízisen túlmenően vékonyréteg-kromatográfiás előhívószerként is alkalmazták pl. imidazolinszármazékok szelektív kimutatására [87].

Aminok és rokon vegyületek töltésátviteli komplex képzésen alapuló spektrofotometriás meghatározási módszerei körében a leggyakrabban alkalmazott akceptorreagens a klóranil, amit sikerrel alkalmaztak aminok [4, 84], aminosavak [5], piperazin [174], tranexámsav [175], cikloszerin [176] stb. meghatározására. A reakciókat vizes közegben 9-es pH-n hajtják végre, a komplexek abszorpciós maximuma 350 nm körül van. Szerves oldószereknek, mint pl. etanol [70] vagy acetonitril [68] a reakcióelegyhez való elegyítése a hosszabb hullámok felé tolja a maximumot és növeli a színintenzitást, amit a többi között klórpromazin [70], gliklazid és tolazamid meghatározásánál használtak ki [68].

* Ennek a reagensnek kölcsönhatása jodidionnal, ami rendkívül intenzív sávot ($\varepsilon = 90\,000$) hoz létre 830 nm körül, alapját képezi kvaterner ammónium-jodidok, ill. jodiddá alakítható más kvaterner ammóniumsók indirekt mérésének [164].

Jód, ill. klóranil akceptorokkal a fenil-hidrazonok aromás gyűrű melletti NH-csoportjának szabad elektronpárja is képez komplexet. Ezt felhasználták kortikoszteroidok indirekt meghatározására fenil-hidrazon-képzés után [7].

A gyógyszer-analitikában felhasznált további akceptor-reagensek: a klóranilsav, amelyet acetonitriles közegben alkalmaztak kinidin, prenilamin, tolazolin, hidralazin, pindolol stb. meghatározására az 522 nm-nél megjelenő, meglehetősen csekély intenzitású sáv alapján [101], valamint a 2,6-diklór-kinon-4-klórimid, amely etanolos közegben 490 és 540 nm között adott ugyancsak csekély intenzitású maximumokat különböző indolszármazékokkal [102].

Az itt bemutatottakon túlmenően a 10. fejezetben számos további példa található töltésátviteli komplexek gyógyszer-analitikai alkalmazására.

7.10. Kinetikus módszerek [120]*

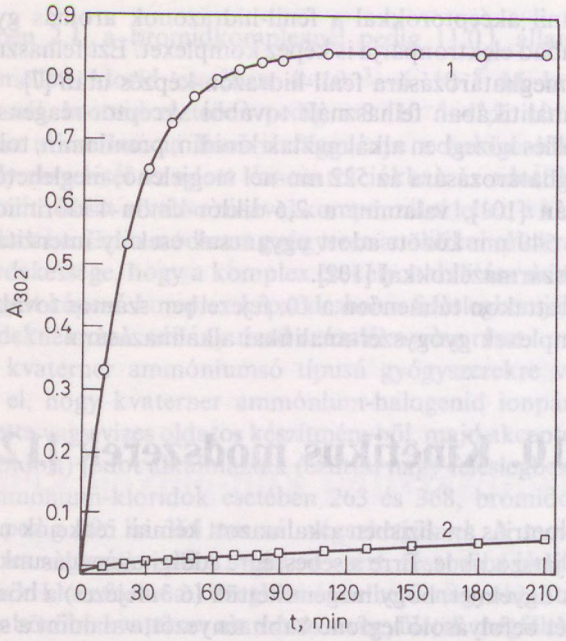
A spektrofotometriás analízisben alkalmazott kémiai reakciók nagy többsége mérhető sebességgel játszódik le. Erre a sebességre eddigi tárgyalásunk során csak annyiban fordítottunk figyelmet, hogy megemlítettük (6.3. fejezet) a hőmérsékletet, mint a reakció sebességét befolyásoló legfontosabb tényezőt, valamint a sebesség befolyásolásának további lehetőségeit az oldószer, pH és reagenskoncentráció megfelelő megválasztásával.

Szisztematikus kinetikai vizsgálatok, vagyis a mérés alapjául szolgáló reakció konverziója időfüggésének vizsgálata alapját képezheti olyan módszerek kidolgozásának, amelyek szelektívebbek vagy gyorsabbak a hagyományos módszereknél. A szelektív mérés megvalósítását célzó differenciálkinetikai módszerek közül Δ^4-3-keto-szteroid szennyezés meghatározását ismertetjük $\Delta^{1,4}$-3-keto-szteroidokban [37]. Mindkét származék 3-keto-csoportja tioszemikarbazont képez tioszemikarbaziddal ($\lambda_{max} = 302$, ill. 320 nm). Amint az a 7/3. ábrán 6α-metil-prednizolon és 6α-metil-hidrokortizon példáján látható, az utóbbi sokkal nagyobb sebességgel reagál tioszemikarbaziddal: ez a reakció 120 perc alatt már kvantitatívvá válik, míg ugyanennyi idő alatt a 6α-metil-prednizolon reakciójának konverziója csak néhány százalék. Szigorúan meghatározott reakciókörülmények között a 302 nm-nél 120 perces reakcióidő után mért abszorbancia lineáris függvénye a 6α-metil-prednizolonban levő 6α-metil-hidrokortizon szennyezésnek, és így megfelelő standard elegyek egyidejű vizsgálata mellett akár 0,5% szennyezés is megfelelő pontossággal mérhető.

Hasonló elvek alapján végezhető el az etinodiol-diacetát 3α-acetoxi-csoportot tartalmazó epimer szennyezésének meghatározása azon az alapon, hogy a 8.3. fejezetben bemutatott, sav katalizálta, 236 nm-nél mérhető 3,5-diénhez vezető eliminációs reakció (8/1 egyenlet) az α-epimer esetében mintegy ötször gyorsabb, mint a főkomponens β-epimernél [27].

Az ismertetett és számos hasonló módszer ma már elavultnak tekinthető, hiszen érzékenységük erősen korlátozott és meglehetősen időigényesek. Az ilyen típusú

* A kinetikus módszer elvi alapjainak lerakása és módszertanának kidolgozása Szebellédy László érdeme.

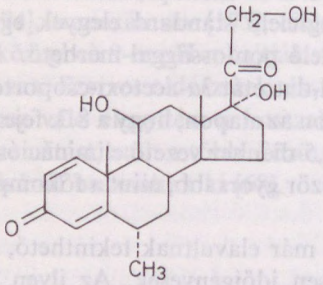


7/3. ábra. Tioszemikarbazon képzési reakciók abszorbancia—idő görbéi.

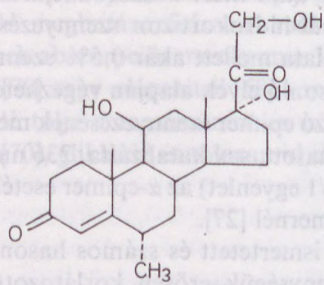
1. 6α-metil-hidrokortizon; *2.* 6α-metil-prednizolon. Reagens: 0,1 M tioszemikarbazid 0,1 M sósavban. Reakcióelegy: 5 ml etanolban oldott 5 mg szteroid + 1 ml reagens; hőmérséklet: 25 °C. (A. A. Forist, Anal. Chem. **31,** 913 (1959) [37])

feladatok megoldását kromatográfiás módszerekkel gyorsabban, pontosabban és nagyobb érzékenységgel lehet elvégezni.

A kinetikus módszerek egy másik csoportját képezik azok az eljárások, ahol azt a tényt használják ki, hogy minden kinetikus görbe kezdeti szakaszán a keletkező anyag koncentrációja (vagyis esetünkben a megfelelő hullámhosszon mért abszorbancia) lineáris függvénye az időnek. Ha a reagensek koncentrációját megfelelően magasra



6α-metil-prednizolon



6α-metil-hidrokortizon

választjuk, akkor elérhető, hogy ezen a lineáris szakaszon a reakció pszeudó-elsőrendű a meghatározandó anyagra nézve, s így a kinetikus görbe lineáris szakaszának meredeksége lineáris függvénye lesz a meghatározandó anyag koncentrációjának. Ennek a módszernek nagy előnye a hagyományos spektrofotometriás mérési módszerhez képest az, hogy nem szükséges kivárni a reakció teljessé válásához szükséges, esetenként órás nagyságrendű időt, hanem a már említett lineáris szakaszon általában 1-2 percen belül elvégezhetjük a kiértékelést. Hátránya viszont a módszernek az, hogy éppen a nagy reakciósebesség miatt olyan (stopped-flow feltéttel ellátott regisztráló) spektrofotométerre van szükség, ami lehetővé teszi a reagensek néhány másodperc alatti intenzív keveredését és eljuttatását a mérőcellába, valamint az idő-abszorbancia görbe felvételét. Ezek miatt a speciális igények miatt ez a módszer nem terjedt el széles körben.

Első példaként kortikoszteroidok (betametazon és valerátja, triamcinolon acetonid, fluocinolon acetonid) meghatározását ismertetjük kenőcs készítményekben. A 7.5., ill. 10.13. fejezetekben ismertetett tetrazólium kék reakció alkalmazásával, a kinetikai görbe 30—70 másodperces lineáris szakaszából számítógépes úton nyert meredekségek alapján a kortikoszteroidok koncentrációja 0,3—1,9%-os relatív standard deviációval számítható ki [85].

A második példa szulfonamidok meghatározása a 7.4. fejezetben ismertetett azokapcsolásos színreakció kinetikai változatával [183]. A szulfonamidok salétromossavas diazotálása után a kapcsoló reagens *N*-(1-naftil)-etilén-diamin volt. Ez esetben a meghatározás alapját annak az időnek a mérése képezte, ami alatt az 545 nm-en mért abszorbancia egy előre meghatározott értékről egy másik előre meghatározott értékre emelkedik (természetesen mindkét érték a reakciógörbe lineáris szakaszán van). Az időkülönbség reciproka lineáris függvénye a szulfonamid-koncentrációnak; az egyenesek iránytangense a szulfonamidtól függő érték. A mérés mintegy 10 másodpercet vesz igénybe, és így a reagensek automatikus adagolása esetén 30 perc alatt pontonként nagyszámú párhuzamos mérés elvégzése mellett is a teljes kalibrációs görbe felvehető.

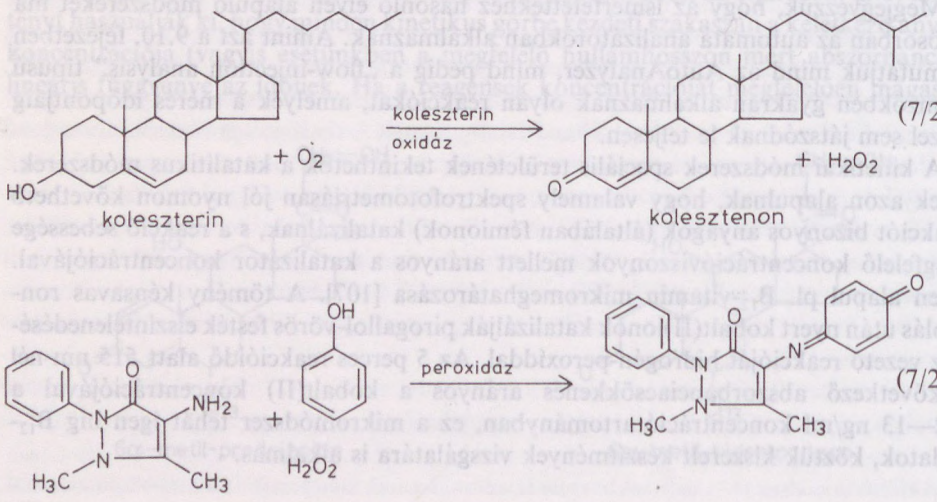
Megjegyezzük, hogy az ismertetettekhez hasonló elven alapuló módszereket ma elsősorban az automata analizátorokban alkalmaznak. Amint azt a 9.10. fejezetben bemutatjuk mind az AutoAnalyzer, mind pedig a „flow-injection analysis" típusú elemzőkben gyakran alkalmaznak olyan reakciókat, amelyek a mérés időpontjáig közel sem játszódnak le teljesen.

A kinetikai módszerek speciális területének tekinthetők a katalitikus módszerek. Ezek azon alapulnak, hogy valamely spektrofotometriásan jól nyomon követhető reakciót bizonyos anyagok (általában fémionok) katalizálnak, s a reakció sebessége megfelelő koncentrációviszonyok mellett arányos a katalizátor koncentrációjával. Ezen alapul pl. B_{12}-vitamin mikromeghatározása [107]. A tömény kénsavas roncsolás után nyert kobalt(II)ionok katalizálják pirogallol-vörös festék elszíntelenedéséhez vezető reakcióját hidrogén-peroxiddal. Az 5 perces reakcióidő alatt 515 nm-nél bekövetkező abszorbanciacsökkenés arányos a kobalt(II) koncentrációjával a 0,2—13 ng/ml koncentrációtartományban, ez a mikromódszer tehát igen híg B_{12}-oldatok, köztük kiszerelt készítmények vizsgálatára is alkalmas.

7.11. Enzimes reakciók

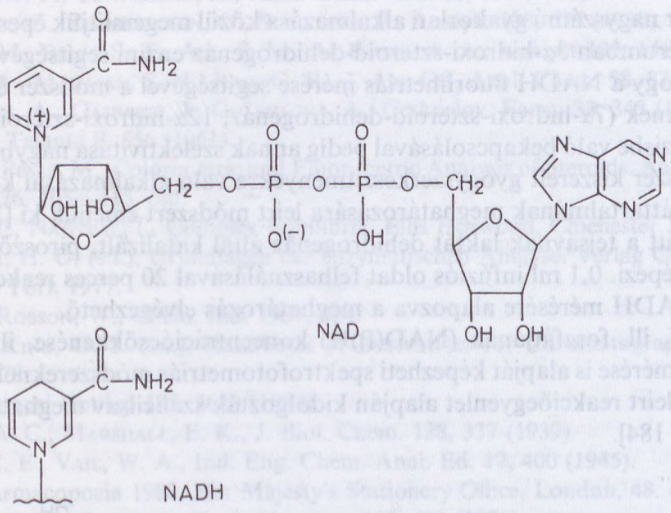
Az enzim katalizálta reakciók tanulmányozása egyike a biokémia legfontosabb feladatainak. Mivel a legtöbb ilyen reakció valamilyen formában a szubsztrát vagy a koenzim fényelnyelésének megváltozásával jár, a spektrofotometria egyike az enzimológia legfontosabb mérőmódszereinek [13]. Az enzimaktivitás spektrofotometriás módszerrel való meghatározása, ill. az enzimreakciók spektrofotometriás módszerrel való tanulmányozása kívül esik könyvünk tárgykörén. Az enzimológiai—biokémiai tanulmányok során szerzett tapasztalatok, az ott kialakult metodikák azonban lehetővé teszik számos gyógyszer meghatározását is. Ezek a módszerek nem tartoznak a spektrofotometriás gyógyszeranalízis széles körben elterjedt módszerei közé. Az enzimreakciók rendkívüli specificitását kihasználva elsősorban olyan biológiai minták vizsgálatára alkalmazzák, ahol a hagyományos módszerek a háttérproblémák miatt nem biztosítanak kielégítő szelektivitást. A következőkben a terület hatalmas biokémiai jellegű irodalmából csak néhány jellegzetes módszer rövid ismertetésére szorítkozunk.

Néhány esetben az enzimatikus reakció segítségével spektrofotometriásan inaktív meghatározandó anyagot spektrofotometriásan aktívvá teszünk. Ilyen reakció pl. koleszterin oxidációja atmoszferikus oxigénnel koleszterin oxidáz enzim segítségével a spektrofotometriásan aktív koleszténonná. Bár ez utóbbi mérése is alapját képezheti koleszterin meghatározásának, a 240 nm-nél való mérést mégis inkább csak az enzim aktivitásának mérésére használják [20], magának a koleszterinnek mérését pl. szérumban sokkal inkább a (7/28) reakció melléktermékeként keletkező hidrogén-peroxid meghatározására alapozzák. Ennek egyik, széles körben használt megoldása 4-amino-antipirin és fenol közötti, egy másik enzim (peroxidáz) által katalizált oxidatív kondenzáción alapul. A keletkező kinon-imin típusú festék mérése 510 nm-nél a két szelektív enzimreakciónak köszönhetően koleszterin igen szelektív, közvetett meghatározását teszi lehetővé [25].

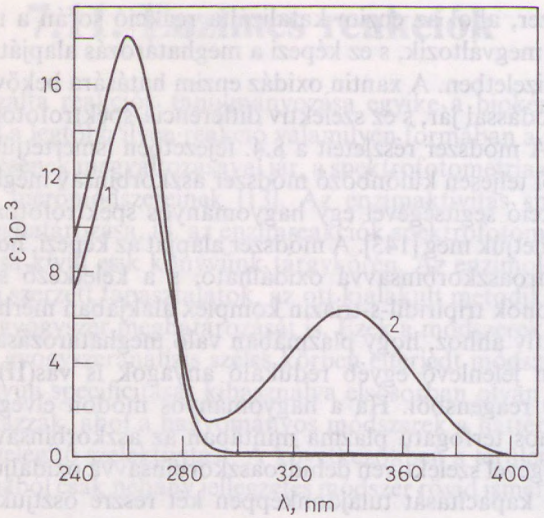


Egy másik módszer, ahol az enzim katalizálta reakció során a meghatározandó anyag fényelnyelése megváltozik, s ez képezi a meghatározás alapját, 6-merkaptopurin meghatározása vizeletben. A xantin oxidáz enzim hatására bekövetkező oxidáció erős batokróm eltolódással jár, s ez szelektív differencia-spektrofotometriás módszer alapját képezi [44]. A módszer részleteit a 8.4. fejezetben ismertetjük.

Az eddig leírtaktól teljesen különböző módszer aszkorbinsav meghatározása, ahol az enzimatikus reakció segítségével egy hagyományos spektrofotometriás módszer szelektivitását növelhetjük meg [143]. A módszer alapját az képezi, hogy aszkorbinsav vas(III)sókkal dehidroaszkorbinsavvá oxidálható, s a keletkező sztöchiometrikus mennyiségű vas(II)ionok tripiridil-s-triazin komplex alakjában mérhetők. Ez a módszer nem elég szelektív ahhoz, hogy plazmában való meghatározása reális értékeket adjon: a plazmában jelenlevő egyéb redukáló anyagok is vas(II)ionokat tesznek szabaddá a vas(III) reagensből. Ha a hagyományos módon elvégzett reakciókkal párhuzamosan azonos térfogatú plazma mintában az aszkorbinsavat aszkorbinsav oxidáz enzim segítségével szelektíven dehidroaszkorbinsavvá oxidáljuk, akkor a plazma minta redukáló kapacitását tulajdonképpen két részre osztjuk. Eltüntetjük az aszkorbinsavtól származó részt és megtartjuk a nemspecifikus redukáló kapacitást. Ha az enzimatikus oxidációt követően elvégezzük a vas(III)as oxidációt és a komplexképzést, és az így nyert oldatot használjuk összehasonlító oldatnak az enzim nélkül végrehajtott reakciók után nyert oldat mérésénél, az így mért abszorbancia a „valódi" aszkorbinsav-tartalomra lesz jellemző.



A spektrofotometriás analízis céljára felhasználható enzimes reakciók fontos csoportját képezik a dehidrogenáz enzimekkel katalizált folyamatok. A mérésre ez esetben az a körülmény szolgáltat lehetőséget, hogy (amint az a 7/4. ábrán látható) a koenzim, NAD^+ (nikotinamid-adenin-dinukleotid) nem rendelkezik fényabszorpcióval a 300 nm feletti spektrumtartományban, míg redukált formája, a NADH 340 nm-nél jól mérhető abszorpciós sávval rendelkezik ($\varepsilon = 6300$). Az enzimatikusan

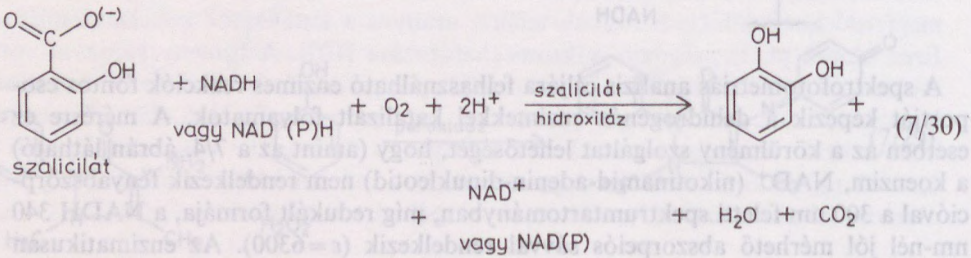


7/4. ábra. NAD (nikotinamid-adenid-dinukleotid) (*1.* görbe) és redukált formájának (NADH) (*2.* görbe) spektrumai. Oldószer: vizes puffer; pH: 7,6

dehidrogénezhető anyagok mérése tehát visszavezethető az ekvivalens mennyiségben keletkező NADH mérésére.

A módszer nagyszámú gyakorlati alkalmazása közül megemlítjük epesavak meghatározását szérumban 3α-hidroxi-szteroid-dehidrogenáz enzim segítségével [32]. Megjegyezzük, hogy a NADH fluorimetriás mérése segítségével a módszer érzékenysége, más enzimeknek (7α-hidroxi-szteroid-dehidrogenáz, 12α-hidroxi-szteroid-dehidrogenáz) az analízisbe való bekapcsolásával pedig annak szelektivitása nagyban növelhető [99]. A módszer kiszerelt gyógyszerkészítményekre való alkalmazásai közül infúziós oldatok laktáttartalmának meghatározására leírt módszert emeljük ki [130]. A módszer alapját itt a tejsavnak laktát dehidrogenáz által katalizált, piroszőlősavvá való oxidációja képezi. 0,1 ml infúziós oldat felhasználásával 20 perces reakcióidő után a keletkező NADH mérésére alapozva a meghatározás elvégezhető.

A NADH, ill. foszfátjának (NAD(P)H) koncentrációcsökkenése, ill. ennek 340 nm-nél való mérése is alapját képezheti spektrofotometriás módszereknek. Pl. a (7/30) egyenletben leírt reakcióegyenlet alapján kidolgozták szalicilsav meghatározását szérumban [96, 184].



Befejezésül megemlítjük, hogy számos enzimkatalizált reakció spektrofotometriás mérése nyert új analitikai alkalmazást az enzim-immun-analitikai módszerek elterjedésével. Ezek akárcsak vázlatos tárgyalása is túllépné azonban könyvünk kereteit.

Ugyancsak a NAD(P)H spektrofotometriás mérésén alapul metotrexát szérumban történő meghatározása [17, 33]. Az enzim inhibíción alapuló módszer kulcsát a (7/31) reakció adja:

$$\text{Dihidrofólsav} + 2\,\text{NAD(P)H} \xrightarrow{\text{DHFR}} \text{tetrahidrofólsav} + 2\,\text{NAD(P)} \qquad (7/31)$$

Látható, hogy a dihidrofólsav redukcióját a dihidrofólsav-reduktáz enzim katalizálja. Metotrexát ez utóbbihoz való kötődésével inhibiálja a reakciót; így tehát a meghatározott reakcióidő (5 perc) után 340 nm-nél mért abszorbancia egyenesen arányos az inhibitor metotrexát koncentrációjával.

Irodalom

1. Abdelkader, M. A., Taha, A. M., Abdelfattah, S., Pharmazie **35,** 30 (1980).
2. Agatonovic-Kustrin, S., Zivanovic, L. J., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 1559 (1989).
3. Agatonovic-Kustrin, S., Zivanovic, L. J., Radulovic, D., Pecanac, D., J. Pharm. Biomed. Anal. **8,** 983 (1990).
4. Al-Ghabsha, T. S., Rahim, S. A., Townshend, A., Anal. Chim. Acta **85,** 189 (1976).
5. Al-Sulimany, F., Townshend, A., Anal. Chim. Acta **66,** 195 (1973).
6. Andermann, G., Zimmermann, G., Schilling, E., Analyst **105,** 575 (1980).
7. Ayad, M. M., Belal S., El Adl, S. M., Al Kheir, A. A., Analyst **109,** 1417 (1984).
8. Baggi, T. R., Mahajan, S. N., Rao, G. R., J. Ass. Off. Anal. Chem. **58,** 875 (1975).
9. Barcuchová, A., Gasparic, J., Oulehlová, A., Ceskoslov. Farm. **33,** 343 (1984).
10. Bartos, J., Talanta **8,** 556 (1961).
11. Bartos, J., Pesez, M., Colorimetric and Fluorimetric Analysis of Steroids. Academic Press, London 1976, 105—115. old.
12. Beck, M. T., Nagypál, I., Complex Equilibria. Ellis Horwood, Chichester 1990.
13. Bergmeyer, H. U. (ed.), Grundlagen der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim, New York 1977.
14. Blau, K., Robson, W., Chem. Ind. **1957,** 424.
15. Blau, K., King, G. S. (ed.), Handbook of Derivatives for Chromatography. Heyden, London 1978.
16. Borsi J., Orvosi Hetilap **125,** 2629 (1984).
17. Bratton, A. C., Marshall, E. K., J. Biol. Chem. **128,** 337 (1939).
18. Bricker, C. E., Vail, W. A., Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. **17,** 400 (1945).
19. British Pharmacopoeia 1988, Her Majesty's Stationery Office, London, 48. old.
20. Brooks, C. J. W., Smith, A. G., J. Chromat. **112,** 499 (1975).
21. Burger, K., Coordination Chemistry: Experimental Methods. Butterworths, London 1973.
22. Burger, K., Organic Reagents in Metal Analysis. Akadémiai Kiadó, Budapest — Pergamon Press, Oxford 1973.
23. Buzello, W., Anaestethist **23,** 443 (1974).
24. Chafetz, L., J. Pharm. Sci. **60,** 291 (1971).
25. Cobb, S. A., Sanders, J. L., Clin. Chem. **24,** 1116 (1978).

26. Connors, K. A., „Derivatives of Carbamic Acid", in Higuchi, T., Brochmann-Hanssen, E., Pharmaceutical Analysis. Interscience Publ., New York, London 1961, 236. old.
27. Csizér, É., Görög, S., Anal. Chim. Acta **86,** 217 (1976).
28. Das Gupta, V., Shek, O. H., Am. J. Hosp. Pharm. **33,** 1086 (1976).
29. Dembinski, B., Farm. Polska **39,** 1 (1983).
30. de Silva J. A. F., Strojny, N., J. Pharm. Sci. **60,** 1303 (1971).
31. Doulakas, J., Pharm. Acta Helv. **50,** 447 (1975).
32. Engart, R., Turner, M. D., Anal. Biochem. **51,** 399 (1973).
33. Falk, L. C., Clin. Chem. **22,** 785 (1976).
34. Fearon, W. R., Boggust, W. A., Analyst **79,** 101 (1954).
35. Fitzpatrick, F. A., Siggia, S., Anal. Chem. **45,** 2310 (1973).
36. Folin, O., Ciocalteu, V., J. Biol. Chem. **73,** 627 (1927).
37. Forist, A. A., Anal. Chem. **31,** 913 (1959).
38. Foster, R., Organic Charge-Transfer Complexes. Academic Press, London, New York 1969.
39. Fujita, Y., Mori, I., Fujita, K., Tanaka, T., Chem. Pharm. Bull. **35,** 865 (1987).
40. Fujita, Y., Mori, I., Kitano, S., Chem. Pharm. Bull. **31,** 1289 (1983).
41. Fujita, Y., Mori, I., Kitano, S., Bull. Chem. Soc. Japan **56,** 2167 (1983).
42. Gallo, N., Bianco, V. D., Bianco, P., Luisi, G., Farmaco; Ed. Pr. **38,** 205 (1983).
43. Glasl, H., Z. Anal. Chem. **321,** 325 (1985).
44. Görög, K., Görög, S., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 109 (1988).
45. Görög, S., J. Pharm. Sci. **57,** 1737 (1968).
46. Görög, S., Anal. Chem. **42,** 560 (1970).
47. Görög, S., Quantitative Analysis of Steroids. Akadémiai Kiadó, Budapest — Elsevier, Amsterdam 1983, 430. old.
48. Görög, S., Horváth, P., Analyst **103,** 346 (1978).
49. Görög, S., Laukó, A., Rényei, M., Hegedűs, B., J. Pharm. Biomed. Anal. **1,** 497 (1983).
50. Görög, S., Rényei, M., Acta Chim. Hung. **115,** 65 (1983).
51. Görög, S., Rényei, M., Advances in Steroid Analysis '84, (Görög, S. ed.), Akadémiai Kiadó, Budapest — Elsevier, Amsterdam 1985, 555. old.
52. Görög, S., Rényei, M., Laukó, A., J. Pharm. Biomed. Anal. **1,** 39 (1983).
53. Görög, S., Szász, Gy., Analysis of Steroid Hormone Drugs. Akadémiai Kiadó, Budapest — Elsevier, Amsterdam 1978, 348—349. old.
54. Görög, S., Szepesi, G., Acta Pharm. Hung. **41,** 25 (1971).
55. Görög, S., Szepesi, G., Anal. Chem. **44,** 1079 (1972).
56. Görög, S., Szepesi, G., Analyst **97,** 519 (1972).
57. Graham, R. E., Williams, P. A., Kenner, C. T., J. Pharm. Sci. **59,** 1152 (1970).
58. Grignard, R., Kerboul, A., Analusis **10,** 423 (1982).
59. Gupta, R. N., Pickersgill, R., Stefanec, M., Clin. Biochem. **16,** 220 (1983).
60. Gübitz, G., Wintersteiger, R., Sci. Pharm. **44,** 28 (1976).
61. Güven, K. C., Ertan, G., Eczacilik Bülteni **24,** 66 (1982).
62. Hakl, J., J. Chromatogr. **143,** 317 (1977).
63. Hassib, S. T., Analyst **105,** 669 (1980).
64. Heise, E., Himbel, K. H., Arzneimittelforsch. **5,** 149 (1955).
65. Higuchi, T., Bodin, J. I., „Alkaloids", in Higuchi, T., Brochmann-Hanssen, E., Pharmaceutical Analysis. Interscience Publ., New York, London 1961. 410—412. old.
66. Higuchi, T., Brochmann-Hanssen, E., Pharmaceutical Analysis. Intersci. Publ., New York, London 1961. 413—418. old.
67. Hussain, A., Bawarshi, R., J. Pharm. Sci. **68,** 513 (1979).

68. Hussein, S. A., Mohamed, A. M. I., Abdel Alim A. A. M., Analyst **114,** 1129 (1989).
69. Hüttenrauch, R., Arch. Pharm. **295,** 721 (1962).
70. Ibrahim, E. A., Issa, A. S., Salam, M. A. A., Mahrous, M. S., Talanta **30,** 531 (1983).
71. Inczédy J., Analytical Applications of Complex Equilibria. Ellis Horwood, Chichester 1976.
72. Issopoulos, P. B., Pharm. Acta Helv. **64,** 280 (1989).
73. Issopoulos, P. B., Acta Pharm. Hung. **61,** 205 (1991).
74. Jaffery, N. F., Ahmad, S. N., Jailkhani, B. L., J. Pharmacol. Methods **9,** 33 (1983).
75. Johnson, D. P., Critchfield, F. E., Anal. Chem. **32,** 865 (1960).
76. Jordan, D. E., Veatch, F. C., Anal. Chem. **36,** 120 (1964).
77. Kakac, B., Vejdelek, Z. J., Handbuch der Photometrischen Analyse Organischer Verbindungen. Verlag Chemie, Weinheim 1974.
78. Kaplan, L., Fink, D. W., Fink, H. C., Anal. Chem. **56,** 360 (1984).
79. Karljikovic-Rajic, K., Stankovic, B., Granov, A., J. Pharm. Biomed. Anal. **8,** 735 (1990).
80. Khattab, F. I., Anal. Letters **16**(B14), 1121 (1983).
81. Klein, M. D., Drongowski, R. A., Linhardt, R. J., Langer, R. S., Anal. Biochem. **124,** 59 (1982).
82. Knapp, D. R., Handbook of Analytical Derivatization Reactions. John Wiley, New York 1979.
83. Kolbezan, M. J., Eckert, J. W., Bretschneider, B. F., Anal. Chem. **34,** 583 (1962).
84. Korany, M. A., Wahbi, A. M., Analyst **104,** 146 (1979).
85. Koupparis, M. A., Walczak, K. M., Malmstadt, H. V., J. Pharm. Sci. **68,** 1479 (1979).
86. Kottke, D., Beyrich, Th., Werner, H., Pharmazie **43,** 99 (1988).
87. Kovar, K.-A., Abdel-Hamid, M., Arch. Pharm. **317,** 246 (1984).
88. Kovar, K.-A., Mayer, W., Auterhoff, H., Arch. Pharm. **314,** 447 (1981).
89. Krzek, J., Acta Pol. Pharm. **38,** 589 (1981).
90. Kwong, T., Adams, N., Young, N., Clin. Biochem. **17,** 170 (1984).
91. Lange, B., Vejdelek, Z. J., Photometrische Analyse. Verlag Chemie, Weinheim 1980.
92. Lawrence, J. F., Frei, R. W., Chemical Derivatization in Liquid Chromatography. Elsevier, Amsterdam—Oxford—New York 1976.
93. Lehman, R. A., Aitken, T., J. Lab. Clin. Med. **28,** 787 (1943).
94. Lemli, J., Knockaert, I., Pharm. Weekblad **5,** 142 (1983).
95. Lohman, F. H., Anal. Chem. **30,** 972 (1958).
96. Longenecker, R. W., Trafton, J. E., Edwards, R. B., Clin. Chem. **30,** 1369 (1984).
97. Lowry, J. B., J. Pharm. Sci. **68,** 110 (1979).
98. Lukáts, B., Takácsi Nagy, G., Acta Pharm. Hung. **35,** 116 (1965).
99. MacDonald, I. A., Williams, C. N., Musial, B. C., J. Lipid Res. **21,** 381 (1980).
100. Mader W. J., Buck, A. H., Anal. Chem. **24,** 666 (1952).
101. Mahrous, M. S., Issa, A. S., Abdel Salam, M. A., Soliman, N., Anal. Letters **19,** 901 (1986).
102. Manzar, A. Q. N., Pharmazie **36,** 685 (1981).
103. Marczenko, Z., Separation and Spectrophotometric Determination of Elements. Ellis Horwood, Chichester 1986.
104. Martinez Calatayud, J., Bosch Reig, F., Marin Saez, R., Pharmazie **39,** 425 (1984).
105. Matsuda, R., Takeda, Y., Ishibashi, M., Uchiyama, M., Suzuki, M., Takitani, S., Bunseki Kagaku **35,** 151 (1986).
106. Mattson, L. N., Holt, W. L., J. Am. Pharm. Assoc. **38,** 55 (1949).

107. Medina-Escriche, J., Hernández-Llorens, M. L., Llobat-Estelles, M., Sevillano-Cabeza, A., Analyst **112,** 309 (1987).
108. Medwick, T., „Organomercurials", in Higuchi, T. and Brochmann-Hanssen, E., Pharmaceutical Analysis. Interscience Publ., New York, London 1961 730—732. old.
109. Milun, A. J., Anal. Chem. **29,** 1502 (1957).
110. Mopper, B., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **70,** 42 (1987).
111. Mori, I., Fujita, Y., Kitano, S., Sakaguchi, K., Bunseki Kagaku **31** E305 (1982).
112. Mori, I., Fujita, Y., Sakaguchi, K., Chem. Pharm. Bull. **30,** 2599 (1982).
113. Munson, J. W., J. Pharm. Sci. **63,** 252 (1974).
114. Munson, J. W., Bilous, R., J. Pharm. Sci. **66,** 1403 (1977).
115. Nachtmann, F., Z. Anal. Chem. **282,** 209 (1976).
116. Nishina, T., Sakai, Y., Kimura, M., Chem. Pharm. Bull. **13,** 414 (1965).
117. Pankratz, R. E., Bandelin, F. J., J. Amer. Pharm. Assoc.; Sci. Ed. **41,** 267 (1952).
118. Patel, R. B., Gandhi, T. P., Patel, V. C., Patel, S. K., Gilbert, R. N., Indian Drugs **20,** 490 (1983).
119. Pawelczyk, E., Smilowski, B., Acta Polon. Pharm. **41,** 351 (1984).
120. Pérez-Bendito, N., Silva, M., Kinetic Methods in Analytical Chemistry. Ellis Horwood, Chichester 1987.
121. Pesez, M., J. Pharm. Pharmac. **11,** 475 (1959).
122. Pesez, M., Bartos, J., Talanta **5,** 216 (1960).
123. Pesez, M., Bartos, J., Talanta **10,** 69 (1963).
124. Pesez, M., Bartos J., Colorimetric and Fluorimetric Analysis of Organic Compounds and Drugs. Marcel Dekker, New York 1974. a. 521—531. old.
125. Pesez, M., Poirier, P., Bartos, J., Pratique de l'analyse organique colorimetrique. Masson, Paris 1966.
126. Pindur, U., Pharm. Acta Helv. **57,** 112 (1982).
127. Pindur, U., Schiffl, E., Pharm. Acta Helv. **58,** 322 (1983).
128. Pindur, U., Witzel, H., Deutsche Apoth. Ztg. **128,** 2127 (1988).
129. Pinzauti, S., La Porta, E., Casini, M., Betti C., Pharm. Acta Helv. **57,** 334 (1982).
130. Pokorny E., Menszel, J., Acta Pharm. Hung. **58,** 241 (1988).
131. Porter, C. C., Silber, R. H., J. Biol. Chem. **185,** 201 (1950).
132. Radovic, Z., Malesev, D., Pharmazie **39,** 870 (1984).
133. Radulovic, D., Jovanovic, M., Milosevic, R., Acta Pharm. Jugosl. **34,** 169 (1984).
134. Radulovic, D., Pecanac, D., Zivanovic, L., Agatonovic Kustrin., S., J. Pharm. Biomed. Anal. **8,** 739 (1990).
135. Radulovic, D., Pecanac, D., Zivanovic, L., Agatonovic Kustrin, S., J., Pharm. Biomed. Anal. **9,** 203 (1991).
136. Raggi, M. A., Cavrini, V., Di Pietra, A. M., J. Pharm. Biomed. Anal. **3,** 287 (1985).
137. Rao, C. N. R., Ultraviolet and Visible Spectroscopy. Butterworths, London 1975, 27—28, 162—182. old.
138. Rényei, M., Görög S., Gyógyszerészet **23,** 346 (1979).
139. Rosales, D., Gómez Ariza, J. L., Anal. Chem. **57,** 1711 (1985).
140. Ryan, J. A., J. Pharm. Sci. **73,** 1301 (1984).
141. Sakai, T., Analyst **108,** 608 (1983).
142. Sakai, T., Anal. Chim. Acta **147,** 331 (1983).
143. Samyn, W., Clin. Chim. Acta **133,** 111 (1983).
144. Sandell, E. B., Colorimetric Determination of Traces of Metals. Interscience, New York 1959.
145. Sastry, C. S. P., Tipirneni, A. S. R. P., Suryanarayana, M. V., Analyst **114,** 513 (1989).

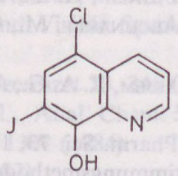
146. Schill, G., Ehrsson, H., Vessman, J., Westerlund, D., Separation Methods for Drugs and Related Organic Compounds. Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm 1984, 1—39. old. a. 10. old.; b. 15. old.
147. Schulz, E. P., Diaz, M. A., López, G., Guerrero, L. M., Barrara, H., Pereda, A. L., Aguilera, A., Anal. Chem. **36,** 1624 (1964).
148. Sethia, M. M., Ind. J. Pharm. Sci. **45,** 30 (1983).
149. Shah, A. K., Agrawal, Y. K., Banerjee, S. K., Anal. Lett., B. **14,** 363 (1981).
150. Shih, I. K., Teare, F. W., Can. J. Pharm. Sci. **1,** 35 (1967).
151. Shingbal, D. M., Agni, R. M., Indian Drugs. **20,** 162 (1983).
152. Siggia, S., Instrumental Methods of Organic Functional Group Analysis. Wiley-Interscience, New York 1972.
153. Sikorska-Tomicka, H., Z. Anal. Chem. **312,** 353 (1982).
154. Snell, F. D., Photometric and Fluorimetric Methods of Analysis; Metals, Nonmetals. Wiley, New York 1978—1981.
155. Stamm, H., Hubbert, T., Arch. Pharm. **316,** 435 (1983).
156. Stewart, J. T., Parks, E. H., Int. J. Pharm. **17,** 161 (1983).
157. Stewart, J. T., Shaw, T. D., Ray, A. B., Anal. Chem. **41,** 360 (1969).
158. Strode, C. W., Schott, H. O., Coleman, O. J., Anal. Chem. **29,** 1184 (1957).
159. Stuzka, V., Havlová, J., Dvorák, J., Vávra, V., Ceskoslov. Farm. **33,** 412 (1984).
160. Svobodová, D., Gasparic, J., Fraenkl, M., Nováková, L., Coll. Czech. Chem. Commun. **41,** 2176 (1976).
161. Szepesi G., Disszertáció, 1976.
162. Szepesi., G., Z. Anal. Chem. **265,** 334 (1973).
163. Szepesi, G., Görög, S., Acta Pharm. Hung. **41,** 30 (1971).
164. Taha, A. M., Abdelkader, M. A., Abdelfattah, S., Pharmazie **35,** 93 (1980).
165. Taha, A. M., El-Rabbat, N. A., El-Kommos, M. E., Refat, I. H., Analyst **108,** 1500 (1983).
166. Tanaka, K., Hioki, M., Shindo, H., Chem. Pharm. Bull. **22,** 2599 (1974).
167. The United States Pharmacopoeia XXII, USP Convention Inc., Rockville, 1990; 111. old.
168. Trinder, P., Biochem. J. **57,** 301 (1954).
169. Umberger, E. J., Anal. Chem. **27,** 768 (1955).
170. Umbreit, G. R., Houtman, R. L., J. Pharm. Sci. **56,** 349 (1967).
171. Vachek, J., Ceskoslov. Farm. **34,** 149 (1985).
172. Vejdelek, Z. J., Kakac, B., Farbreaktionen in der spektrophotometrischen Analyse organischer Verbindungen. Gustav Fischer, Jena 1980.
173. Wahbi, A. M., Abdine, H., Korany, M. A., Abdel-Hay, M. H., Analyst **103,** 876 (1978).
174. Wahbi, A. M., Abounassif, M., Gad-Kariem, E., Analyst **109,** 1513 (1984).
175. Wahbi, A. M., Lotfi, E. A., Aboul-Enein, H. Y., Talanta **31,** 77 (1984).
176. Wahbi, A. M., Mohamed, M. E., Abounassif, M., Gad-Kariem, E., Anal. Letters **18B,** 261 (1985).
177. Wahbi, A. M., Mohamed, M. E., Kariem, R. A. G., Aboul-Enein, H. Y., Analyst **108,** 886 (1983).
178. Whitaker, J. E., Hoyt, A. M., J. Pharm. Sci. **73,** 1184 (1984).
179. Zimmermann, W., Chemische Bestimmungsmethoden von Steroidhormonen in Körperflüssigkeiten. Springer. Berlin 1955. 53—57, 63—75. old.
180. Zinner, G., Arch. Pharm. **288,** 129 (1955).
181. Zivanovic, L., Agatonovic, Kustrin, S., Radulovic, D. S., Pharmazie **45,** 935 (1990).
182. Zivanov Stakic, Z., Solomun, L., Zivanovic, L., Acta Pharm. Hung. **60,** 179 (1990).
183. Xenakis, A. G., Karayannis, M. I., Anal. Chim. Acta **159,** 343 (1984).
184. You, K., Bittikofer, J. A., Clin. Chem. **30,** 1549 (1984).

8. Differencia-spektrofotometria*

8.1. Általános kérdések

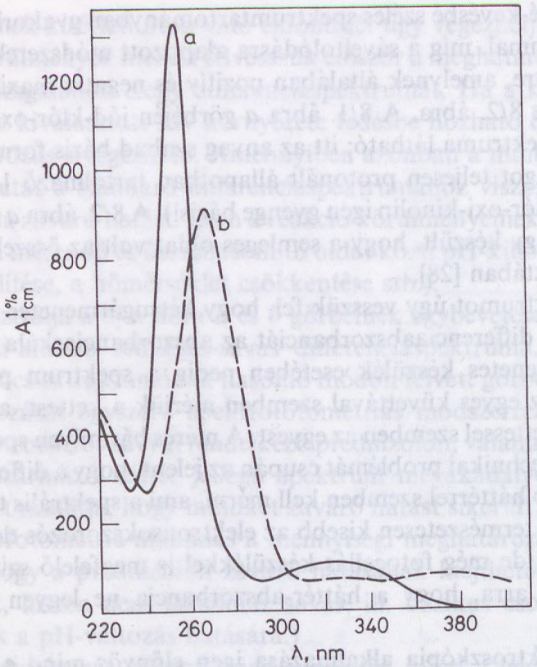
Amint erre már a 175. oldalon utaltunk, a 4.7. fejezetben tárgyalt speciális spektrofotometriás méréstechnikák közül nagy gyógyszer-analitikai jelentősége miatt kiemeltük a differencia-spektrofotometriát [23], s azt — a kémiai reakciókra alapozott módszereknek az előző fejezetben történt tárgyalására alapozva — ebben a fejezetben ismertetjük.

Ennek a méréstechnikának egyedüli célja a mérés szelektivitásának növelése, a meghatározás alapjául szolgáló abszorbanciához hozzáadódó idegen, zavaró fényelnyelések csökkentése, ill. eliminálása. Amint arra már a 2.6. és 6.3. fejezetekben utaltunk, a spektrofotometriás mérés során a készülékből, küvettából, oldószerből, reagensből stb. származó zavaró fényelnyelések hatását úgy lehet megszüntetni, ill. a minimumra csökkenteni, hogy az összehasonlító oldatot a mérendővel teljesen azonos módon készítjük el és helyezzük a készülékbe, természetesen azzal a különbséggel, hogy az összehasonlító oldat nem tartalmazza a meghatározandó anyagot. A differencia-spektrofotometria még ezen a megszorításon is túllép: a meghatározandó anyagot mind a mérendő, mind pedig az összehasonlító oldat azonos koncentrációban tartalmazza (azonos törzsoldatból, azonos hígítással készítjük őket). A mérés alapjául szolgáló differenciaabszorbancia (ΔA) úgy jön létre, hogy a két oldat közül az egyikkel (általában, de nem feltétlenül a mérendő oldattal) végrehajtunk egy kémiai reakciót, aminek hatására a mérendő anyag spektrumában vagy új sáv keletkezik, vagy egy meglevő eltűnik, vagy legáltalánosabban eltolódik egy más hullámhosszra. Ha az így előkészített mérendő oldat spektrumát felvesszük az összehasonlító oldattal szemben, a differenciaspektrumhoz jutunk, ami a felsorolt három eset közül az első kettőben



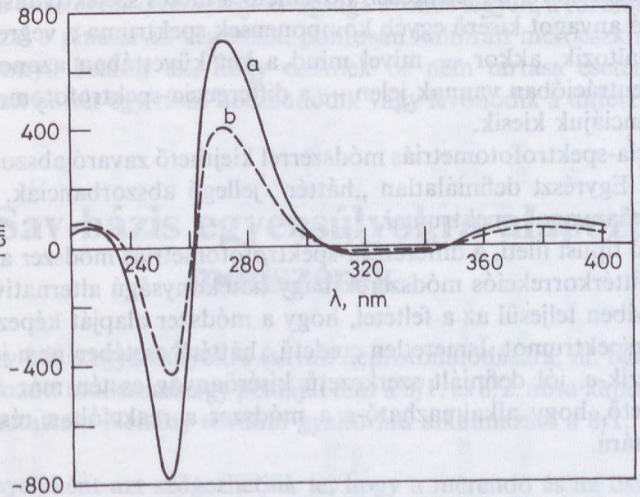
jód-klór-oxi-kinolin

* A módszert gyakran nevezik ΔA spektrofotometriának és a régebbi irodalomban — helytelenül — differenciál-spektrofotometriának is.



8/1. ábra. Jód-klór-oxi-kinolin spektrumai. Oldószer: 10% vizet tartalmazó etanol.

a görbe: spektrum semleges közegben; *b* görbe: spektrum 1 M sósavas közegben. (S. Görög, Farm. Tidende **80,** 321 (1970) [28])



8/2. ábra. Jód-klór-oxi-kinolin differencia-spektrumai. Oldószer: 10% vizet tartalmazó etanol.

a görbe: jód-klór-oxi-kinolin; *b* görbe: Prednisolon-J kenőcs. Összehasonlító oldat: semleges; mért oldat: 1 M sósav. (S. Görög, Farm. Tidende **80,** 321 (1970) [28])

természetesen többé-kevésbé széles spektrumtartományban gyakorlatilag megegyezik az eredeti spektrummal, míg a sáveltolódásra alapozott módszerek esetében teljesen új spektrum jön létre, amelynek általában pozitív és negatív maximuma is van. Ezt illusztrálja a 8/1. és 8/2. ábra. A 8/1. ábra *a* görbéjén jód-klór-oxi-kinolin semleges közegben felvett spektruma látható; itt az anyag szabad bázis formájában van jelen. A *b* görbe az anyagot teljesen protonált állapotban tartalmazó 1 M sósavas oldat spektruma (a jód-klór-oxi-kinolin igen gyenge bázis!). A 8/2. ábra *a* görbéje a differenciaspektrum, ami úgy készült, hogy a semleges oldat volt az összehasonlító, a savas pedig a mérő küvettában [28].

A differenciaspektrumot úgy vesszük fel, hogy kétsugármenetes regisztráló készülék esetében a zéró differenciaabszorbanciát az abszorbanciaskála 0,3—0,5 értékére állítjuk, egysugármenetes készülék esetében pedig a spektrum pozitív részét úgy vesszük fel, hogy az egyes küvettával szemben mérjük a kettest, a negatív szakaszt pedig úgy, hogy a kettessel szemben az egyest. A mérés bármilyen spektrofotométerrel elvégezhető; méréstechnikai problémát csupán az jelent, hogy a differenciaabszorbanciát kisebb-nagyobb háttérrel szemben kell mérni, ami a spektrális tisztaság rovására mehet. A probléma természetesen kisebb az elektronsokszorozós detektorral rendelkező készülékeknél, de még fotocellás készülékkel is megfelelő színvonalon mérhetünk, ha ügyelünk arra, hogy a háttér-abszorbancia ne legyen túlságosan nagy ($A < 0{,}5$).

A differencia-spektroszkópia alkalmazása igen előnyös mind a kvalitatív, mind pedig kvantitatív analízisben. A 8/1. ábra görbéinek összevetése a 8/2. ábrával meggyőzően mutatja, hogy a differenciaspektrum a maga pozitív és negatív maximumaival, valamint a köztük levő $\Delta A = 0$ ponttal* sokkal jellegzetesebb, mint az alapspektrumok, s így több alapot jelent az előbbieknél az azonosításhoz.

A differencia-spektrofotometria igazi nagy jelentősége azonban a kvantitatív analízisben van, segítségével ui. jelentősen növelhető a mérés szelektivitása. Amennyiben ui. a mérendő anyagot kísérő egyéb komponensek spektruma a végrehajtott reakció során nem változik, akkor — mivel mind a két küvettában azonos formában és azonos koncentrációban vannak jelen — a differencia-spektrofotometriás mérés során abszorbanciájuk kiesik.

A differencia-spektrofotometriás módszerrel kiejthető zavaró abszorbanciák kétfélék lehetnek. Egyrészt definiálatlan „háttér" jellegű abszorbanciák, másrészről jól definiált kísérőanyagok spektrumai.

Ami az első típust illeti, a differencia-spektrofotometriás módszer a 4.3. fejezetben ismertetett háttérkorrekciós módszerek nagy hatékonyságú alternatívájának tekinthető, amennyiben teljesül az a feltétel, hogy a módszer alapját képező reakció nem érinti a háttérspektrumot. Ismeretlen eredetű „háttér" esetében nem jósolható, hogy ez bekövetkezik-e, jól definiált szerkezetű kísérőanyag esetén már általában előre valószínűsíthető, hogy alkalmazható-e a módszer a reakcióban részt vevő anyag meghatározására.

* Ez a pont megfelel az alapspektrum-sorozat izozbesztikus pontjának.

Ennek a kérdésnek kísérleti úton való eldöntését úgy végezhetjük el, hogy a kiválasztott reakciókörülmények mellett felvesszük először a meghatározandó tiszta komponens, majd a vizsgálandó elegy differenciaspektrumát. Ha a két spektrum (vagy legalább a mérésre kiválasztott sáv környezete fedésbe hozható egymással, akkor a szelektív meghatározás elvégezhető. Amennyiben azonban a minta differenciaspektruma torzulást mutat a standard differenciaspektrumához viszonyítva, akkor nem sikerült eliminálni a zavaró hatást. Ezen a reakció körülményeinek finomításával még lehet változtatni (a mérendő és összehasonlító oldat közti pH-különbség csökkentése, a reakcióidő rövidítése, a hőmérséklet csökkentése stb.).

A leírtakat illusztrálja a 8/2. ábra *a* és *b* görbéinek egybevetése. A már említett *a* görbe jód-klór-oxi-kinolin semleges-savas differenciaspektruma, a *b* görbe pedig Prednisolon-J kenőcs extraktumának hasonló módon felvett görbéje. A jód-klór-oxi-kinolin meghatározását egyszerű spektrofotometriás módszerrel ez esetben a 242 nm-nél intenzív abszorpciós sávval rendelkező prednizolon, valamint a kenőcskészítés segédanyagaiból származó háttér jellegű spektrum megakadályozza. A két görbe kitűnő egyezése azt mutatja, hogy mindkét zavaró hatást sikerült eliminálni, és így a differencia-spektrofotometria alkalmas a mennyiségi meghatározás elvégzésére [28]. (Megjegyzendő, hogy a prednizolon zavaró hatásának kiejthetősége természetesen megjósolható volt, hiszen nem tartalmaz savas, ill. bázikus csoportot, spektruma tehát nem változik a pH-változás hatására.)

Mennyiségi meghatározás céljaira mind a pozitív, mind a negatív maximumban mért differenciaabszorbancia, sőt a kettő abszolút értékének összege (a hullámgörbe teljes amplitúdója) is alkalmas. A meghatározás hibaforrásai hasonlóak a közönséges spektrofotometria hibaforrásaihoz, egy lényeges szempontra azonban fel kell hívni a figyelmet. Különösen azokban az esetekben, amikor viszonylag nagy háttér mellett mérjük a differenciaabszorbanciát, még a szokásosnál is nagyobb gonddal kell ügyelni arra, hogy a mérő és referens cella rétegvastagsága azonos legyen, a törzsoldatból való hígítást ugyanazzal a pipettával végezzük, pontosan kalibrált mérőeszközöket használjunk stb. Könnyű belátni ui., hogy ezeknek be nem tartása esetén a reakció segítségével kiejtett háttér egy része hozzáadódik vagy levonódik a differenciaabszorbanciából.

8.2. Sav-bázis egyensúlyokra alapozott módszerek

Reverzíbilis sav-bázis egyensúlyokra (savak deprotonálódására, ill. bázisok protonálódására) alapozott módszerek egy példáját már a 8/1. és 8/2. ábra kapcsán az előző alfejezetben bemutattuk. Néhány további gyakorlati alkalmazást a 8/1. táblázatban mutatunk be.

Általános irányelvként azt szögezhetjük le, hogy a mérendő és az összehasonlító oldat pH-ját úgy kell beállítani, hogy az egyik a teljesen protonált, a másik a teljesen deprotonált állapotot valósítsa meg. Különösen olyan esetekben, amikor a háttérspektrum kiejtése kényes feladat, fontos, hogy a két oldat közti pH-különbséget

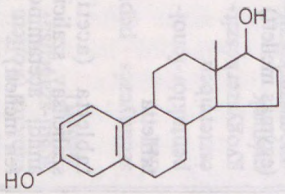
8/1. táblázat. Néhány sav-bázis egyensúlyra alapozott differencia-spektrofotometriás módszer

Vegyület	Savasság	lúgosság	Hullámhossz, nm		$A^{1\%}_{1\,cm}$	Minta	Szerző	Évszám
	összehasonlító oldat	mérendő oldat	min.	max.				
Savak								
Vanillinsav	pH 6,5	pH 2	241;	266, 300	—160; 325, 210	szennyezés homovanillinsavban	Görög [32]	1971
Szalicilsav	pH 6,83	pH 13		246		szérum	Zwillenberg [55]	1982
Acetil-szalicilsav	pH 9	pH 13,5		300		szalicilsav mellett	Shane [50]	1967
Szalicilamid	pH 6	pH 10		330	375*	tabletta (koffein és acetil-szalicilsav mellett)	Shane [49]	1968
Acetaminofen	pH 6	pH 10		263,5	400*			
Pentaklór-fenol	pH 2	pH 7,5		256	335	szennyezés peptidek	Görög [32]	1971
				323	206	pentaklór-fenol-észtereiben		
Eugenol	pH 3	pH 12		296	237	gyógyszerkészítmények	Demetrius [20]	1960
Morfin	pH 3	pH 12		298	82	gyógyszerkészítmények	Casinelli [4]	1962
Morfin	pH 1	pH 13		298	—	gyógyszerkészítmények	Wahbi [53]	1970
Morfin	pH 6	pH 13		299	67*	mákkivonat	Rondina [47]	1973
Ösztron, ösztradiol, etinilösztradiol	pH 9,2	0,1 M NaOH		300	—	szennyezés 3-metil-éterekben	Görög [37a]	1978
Ösztradiolészterek	pH 9,2	0,1 M NaOH		300	—	olajos injekciók (androgének, gesztagének mellett)	Görög [33]	1976
Ösztradiol-17-valerát	0,02 M HCl	0,6 M NaOH		300	—	olajos injekciók	USP XIX [52a]	1975
Diloxanid furoát	0,02 M NaOH	semleges		267	430*	tabletta (tinidazol mellett)	Sethi [48]	1988
Benztiazid	savas	bázikus	271;	313	— 90*; 280*	—	Doyle [21]	1974

Hidroklorotiazid	savas	bázikus	305*;	339*	— 90*;	125*	—	Doyle [21]	1947
Triamteren	savas	bázikus	256*;	277*	—420*;	720*	tabletta	Doyle [21]	1974
			345*;	385*	—890*;	860*			
20-oximino-5,16-pregnadién-3β-ol-acetát	semleges	2 M NaOH		262		280	szteroid szintézis intermedierjei	Görög [37b]	1978
2-metil-5-nitro-imidazol	semleges	0,01 M NaOH	290;	369	—320;	916	szennyezés metronidazolban	Görög [29]	1970
Amfoter anyagok									
Teofillin	pH 7	pH 9		285		108	kapszula (teobromin, koffein, efedrin stb. mellett)	Young [56]	1976
Teofillin	pH 7	0,1 M NaOH		285		126	vér	Gupta [41]	1973
Klórdiazepoxid	pH 3	pH 8		269		370	kapszula, tabletta (egymás mellett)	Davidson [12]	1984
Demoxepan	pH 8	pH 13		263		490			
Szulfatiazol	bázikus	semleges	251*;	290*	— 80*;	290*		Doyle [21]	1974
	savas	semleges		290*		280*			
	savas	bázikus		263*		420*			
Nitrazepam	0,1 M NaOH	0,1 M HCl	372;	282		632	tabletta	Davidson [19]	1989
Bázisok									
Koffein	0,35 M HCl	pH 1,8		283		95*	tabletta (acetilszalicilsav, szalicilamid, acetaminofen mellett)	Shane [49]	1968
Ampicillin	pH 9	pH 5		268		3,2	injekció (más penicillinek mellett)	Davidson [8]	1974
Hidroxokobalamin	pH 2	pH 8		362		62	nyerstermék (B_{12} vitamin stb. mellett)	Horváth [43]	1978
Metronidazol-benzoát	semleges	1 M HCl		324		274	szirup	Görög [35]	1976
Benzokain	0,2 M HCl	semleges		285		999	fülcsepp (kloramfenikol mellett)	Kannan [44]	1987
Minoxidil	0,1 M KOH	0,1 M HCl		283		500	gyógyszerkészítmények	Bonazzi [2]	1990
Tinidazol	0,1 M HCl	semleges		320		280*	tabletta (diloxanid furoát mellett)	Sethi [48]	1988

* Spektrumokról, kalibrációs egyenesekről leolvasott érték.

minimálisra válasszuk: az ne legyen nagyobb, mint a teljes protonáláshoz, ill. a deprotonáláshoz (minimum 99%) szükséges maximális, ill. minimális pH különbsége. Így pl. ösztradiol-észtereknek olajos injekcióban ketoszteroidok mellett való meghatározása során jelentősen lehetett javítani a meghatározás szelektivitását azzal, hogy az összehasonlító és mérendő oldat savasságát, ill. bázicitását az USP XIX [52a] által javasolt 0,02 M sósav, ill. 0,6 M nátrium-hidroxid helyett pH 9,2, ill. 0,1 M nátrium-hidroxid-koncentrációra állítjuk be [33]. A meghatározás alapját képező fenolos hidroxilcsoport ui. csak pH 9,2 felett kezd el ionizálódni, s ez 0,1 M nátrium-hidroxid-koncentrációnál már befejeződik.

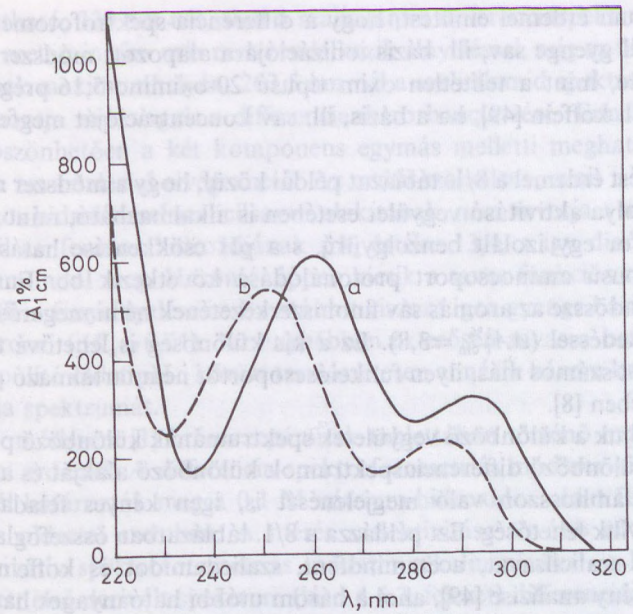


ösztradiol

Találhatunk a 8/1. táblázat példái között olyat is, ahol a fenti elv nem teljesen érvényesül: a pH-intervallum túlságosan rövid ahhoz, hogy a két oldatban teljesen különböző ionizációs állapotot hozzon létre. Ilyen eset pl. teofillin meghatározása gyógyszerkészítményekben [48], ahol a mérendő oldat 9-es pH-ja nem biztosítja az igen gyenge sav teofillin teljes ionizációját. Ezt a módszer kidolgozói tudatosan tették, hogy így csökkentsék a teofillin bomlását, ami a teljes disszociáció pH-ján már túlságosan gyors. Az ilyen kompromisszumos pH-értékek mellett végzett mérés esetében egyrészről az érzékenység csökken, másrészről pedig az eredmény igen érzékeny lesz a pH csekély változásaira is. Hasonló az eset barbiturátok meghatározásánál [54], ahol az összehasonlító oldat pH-ját 10,5-nek választották (egyszeresen ionizált forma — lásd 3/21. ábra, 103. oldal), míg a mérendő oldat pH-ja 13,5 volt, ami nem biztosítja a teljes második disszociációt, magasabb pH-n viszont a barbiturátok is erősen bomlanak.

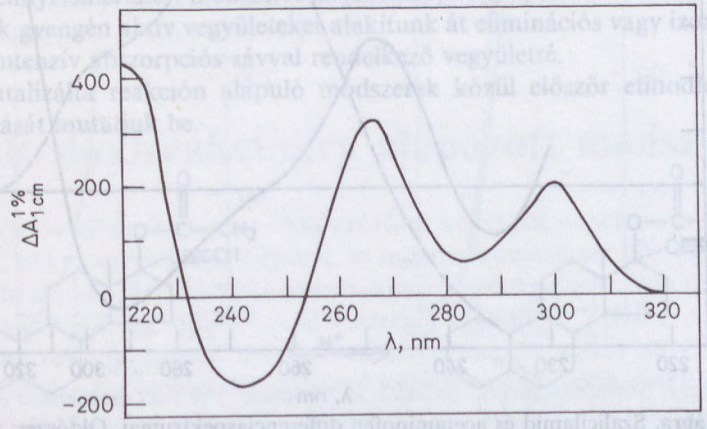
Szabad pentaklór-fenol szennyezés meghatározása peptidek pentaklór-fenollal képezett aktív észtereiben [32] azért érdemel figyelmet, mivel itt úgy sikerült a mérendő oldat pH-ját optimalizálni, hogy egyrészről biztosítsa a viszonylag erős sav pentaklór-fenol teljes disszociációját (pH 6,5), de ugyanakkor ne okozza az igen bomlékony pentaklór-fenol-észterek hidrolízisét, így ez utóbbiak spektruma a differencia-spektrofotometriás méréssel kiejthető volt.

A 8/3. ábra vanillinsav pH 2 és 6,5 értékek mellett felvett spektrumait ábrázolja. Amint azt aromás karbonsavakra vonatkozóan már a 3.16. fejezetben bemutattuk, a karboxilcsoport ionizációja hipszokróm eltolódást idéz elő. Az erre alapozott differenciaspektrum (8/4. ábra) két pozitív és egy negatív maximuma mind alkalmas kvantitatív meghatározásra, pl. 1-2% vanillinsav szennyezés meghatározására homovanillinsavban. Ez utóbbinak is van ugyan karboxilcsoportja, ami 6,5-es pH-n túlnyomó részben disszociál, mivel azonban ez nincs konjugációban az aromás gyűrűvel, ez



8/3. ábra. Vanillinsav spektrumai. Oldószer: 2% etanolt tartalmazó víz.
a görbe: 0,01 M sósav; *b* görbe: pH 6,5

a disszociáció nem befolyásolja a differenciaspektrumot. Ha azonban az összehasonlító oldat pH-ját nem 6,5-nek, hanem annál magasabbnak választanánk, akkor bekövetkeznék mind a vanillinsav, mind pedig a homovanillinsav fenolos hidroxilcsoportjának disszociációja is, ami lehetetlenné tenné a vanillinsav-szennyezés szelektív meghatározását [32].

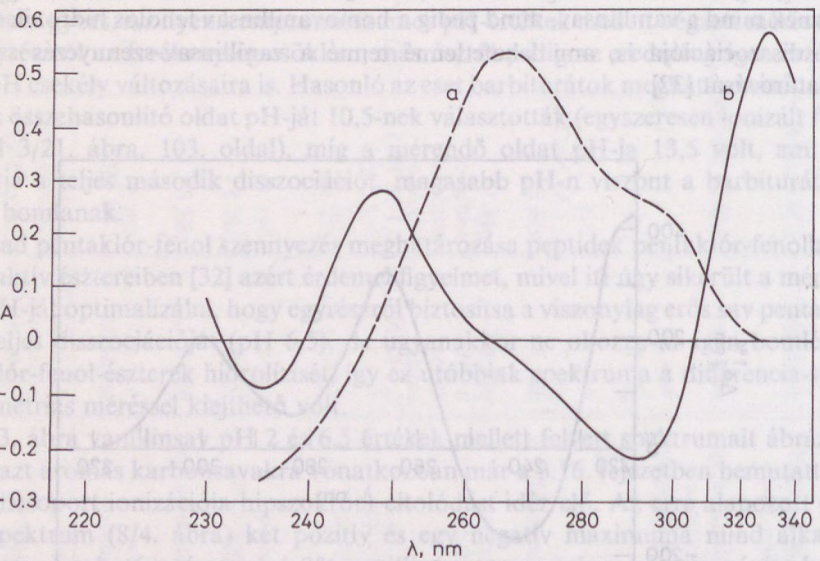


8/4. ábra. Vanillinsav differenciaspektrum. Oldószer: 2% etanolt tartalmazó víz. Összehasonlító oldat: pH 6,5; mért oldat: 0,01 M sósav

Mint kuriózum érdemel említést, hogy a differencia-spektrofotometriás módszer olyan rendkívül gyenge sav, ill. bázis ionizációjára alapozott módszer kidolgozását is lehetővé tette, mint a telítetlen oxim típusú 20-oximino-5,16-pregnadién-3β-ol--acetát [37b], ill. koffein [49], ha a bázis, ill. sav koncentrációját megfelelően nagyra választjuk.

Az is kiemelést érdemel a 8/1. táblázat példái közül, hogy a módszer még egy olyan csekély ultraibolya aktivitású vegyület esetében is alkalmazható, mint az ampicillin, ahol a kromofor egy izolált benzolgyűrű, s a pH csökkentése hatására csupán a benzil-amin típusú aminocsoport protonálódása következik be. Ennek hatása a spektrumra mindössze az aromás sáv finomszerkezetének némi megerősödése csekély intenzitásnövekedéssel ($\Delta A^{1\%}_{1\,cm} = 3{,}8$). Ez a kis különbség is lehetővé teszi azonban a meghatározást számos más, ilyen funkcióscsoportot nem tartalmazó penicillinszármazék jelenlétében [8].

Ha kihasználjuk a különböző vegyületek spektrumának különböző pH-függését és egyidejűleg a különböző differenciaspektrumok különböző alakját és a maximumok különböző hullámhosszon való megjelenését is, igen kényes feladatok egyszerű megoldására nyílik lehetőség. Ezt példázza a 8/1. táblázatban összefoglalt módszerek közül az acetil-szalicilsavat, acetaminofent, szalicilamidot és koffeint tartalmazó tablettakészítmény analízise [49], ahol a három utóbbi hatóanyagot határozzák meg differencia-spektrofotometriásan. Mivel az acetaminofen fenolos hidroxilcsoportjának pK_a-értéke 9,0 és a szalicilamidé 8,4, az összehasonlító oldat 6-os pH-ján még nem indul el a disszociáció, a mérendő oldat 10-es pH-ján pedig mindkét anyag esetében csaknem teljes. Így a differenciaspektrumot közösen produkálják. Amint az



8/5. ábra. Szalicilamid és acetaminofen differenciaspektrumai. Oldószer: víz.

a görbe: szalicilamid (1,54 mg/100 ml); *b* görbe: acetaminofen (1,35 mg/100 ml). Összehasonlító oldat: pH 6; mért oldat: pH 10. (N. Shane, M. Kowblansky, J. Pharm. Sci. **57**, 1221 (1968) [49])

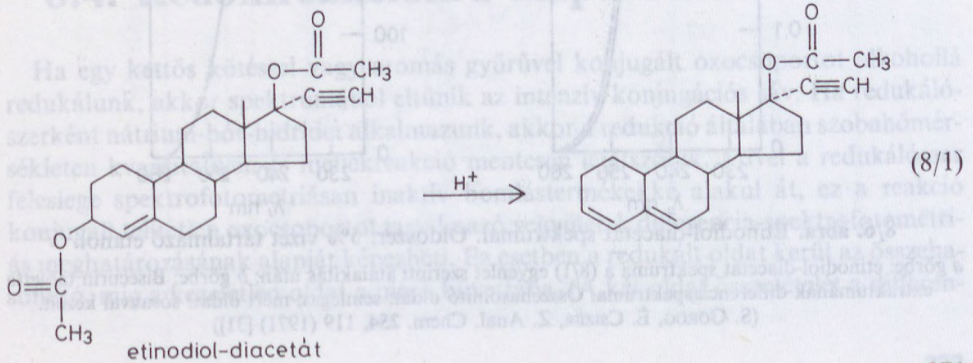
a 8/5. ábrán látható, 330 nm-nél, ahol a szalicilamid differenciaspektrumának maximuma van, az acetaminofen már nem rendelkezik elnyeléssel, míg az utóbbi differenciaspektrumának maximumhelyén, 263,5 nm-nél a szalicilamid spektrumának éppen izozbesztikus pontja van, vagyis a differenciaabszorbancia zéró. Ennek a szerencsés véletlennek köszönhetően a két komponens egymás melletti meghatározása a két hullámhosszon zavartalanul elvégezhető. Az acetil-szalicilsav, amit a meghatározás előtt enyhe lúgos hidrolízissel szalicilsavvá alakítanak, nem zavarja a meghatározást, mivel a szalicilsav fenolos hidroxiljának pK_a-értéke 13,4, s így disszociációja pH 10-nél még nem indul meg. Hasonlóképpen kiesik a savas funkciós csoporttal nem rendelkező koffein fényelnyelése is. Ez utóbbit viszont igen gyenge bázicitása alapján lehet meghatározni ($pK_a = 0{,}61$). Az enyhébben és erősen savasra beállított mérendő és összehasonlító oldat pH-i között természetesen a másik három komponens már nem változtatja spektrumát.

Abounassif módszere [1] brómazepámnak tablettában történő meghatározására külön figyelmet érdemel. A differencia-spektrofotometriás módszer alkalmazása során 239 nm-nél határozták meg a 0,1 M nátrium-hidroxidos oldat fényelnyelését a 0,1 M sósavas oldattal szemben. A mérés szelektivitása tovább növelhető volt a differencia-derivatív spektrofotometriás módszer alkalmazásával, a lúgos és savas közegben felvett első derivált spektrum (lásd 4.5.3. fejezet) differenciájának képzésével.

8.3. Sav, ill. bázis katalizálta irreverzíbilis reakciókra alapozott módszerek

A 8.2. fejezetben ismertetett reverzíbilis sav-bázis egyensúlyokra alapozott módszereken túlmenően néhány esetben spektrumváltozással járó sav-, ill. bázis katalizálta irreverzíbilis reakciók is alapját képezik differencia-spektrofotometriás módszereknek. Valamennyi ismertetett módszerre az jellemző, hogy spektrofotometriásan inaktív vagy csak gyengén aktív vegyületeket alakítunk át eliminációs vagy izomerizációs reakcióval intenzív abszorpciós sávval rendelkező vegyületté.

A sav katalizálta reakción alapuló módszerek közül először etinodiol-diacetát meghatározását mutatjuk be.

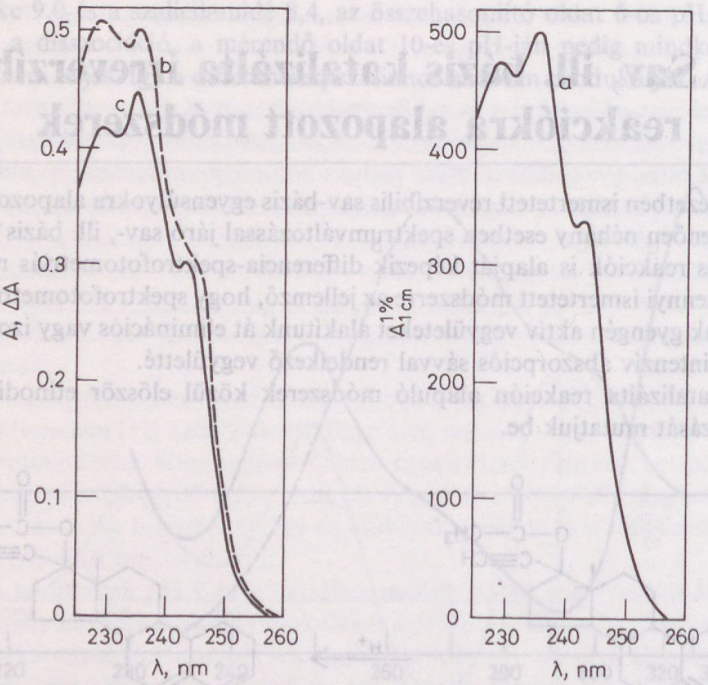


(8/1)

etinodiol-diacetát

Amint az a (8/1) egyenletből látható, ez a spektrofotometriásan gyakorlatilag inaktív szintetikus gesztagén hormon sósavas kezelés hatására átalakul intenzív spektrummal rendelkező 3,5-dién-vegyületté, amelynek mint *transz*-diénnek 236 nm-nél van az abszorpciós maximuma, jellegzetes mellékmaximumokkal 228 és 243 nm-nél. Ez az abszorpciós sáv lehetővé teszi etinodiol-diacetát spektrofotometriás meghatározását. A reakció körülményeit illetően gyógyszerkönyvek [3, 51b] 50 ml metanol, 2 ml víz és 3 ml tömény sósav elegyében való 10 perces forralást írnak elő, Görög és Csizér [31] pedig a 10 ml etanolban oldott mintát szobahőmérsékleten reagáltatja 5 ml tömény sósav és 5 ml etanol frissen készített elegyével. Az utóbbi szerzők a módszer differencia-spektrofotometriás változatát alkalmazták etinodiol-diacetát meghatározására tabletta készítményekben [31] és a tabletták „content uniformity" vizsgálatára is [36]. Amint az a 8/6. ábrán látható, a tabletta ösztrogén komponense, valamint a háttér jellegű zavaró fényelnyelés miatt a tablettaextraktum spektrumán csak torzított formában ismerhető fel a 3,5-dién spektruma, a differencia-spektrum viszont, ami úgy készül, hogy a sósavval nem kezelt oldattal szemben mérik a kezelt oldatot, teljesen megegyezik a tiszta hatóanyag differenciaspektrumával.

Ugyancsak sav katalizálta vízeliminációs reakción alapul 2,5-dimetil-α-etil-benzrol meghatározása toxikológiai vizsgálatokhoz használt tápban. Az izolált aromás

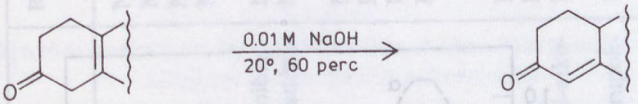


8/6. ábra. Etinodiol-diacetát spektrumai. Oldószer: 5% vizet tartalmazó etanol.

a görbe: etinodiol-diacetát spektruma a (8/1) egyenlet szerinti átalakítás után; *b* görbe: Bisecurin tabletta extraktumának differenciaspektruma. Összehasonlító oldat: semleges; mért oldat: sósavval kezelt. (S. Görög, É. Csizér, Z. Anal. Chem. **254**, 119 (1971) [31])

gyűrűket tartalmazó vegyület saját spektruma ($\lambda_{max} = 268$ nm; $\varepsilon = 795$) a nagy háttér mellett nem alkalmas a feladat megoldására. 1,3 mólos sósavas etanolos közegben szobahőmérsékleten 3 óra alatt lejátszódik az 1-(2,5-dimetil-fenil)-1-fenil-1-propénhez vezető dehidratálási reakció és a sztirolszerű termék 247 nm-nél intenzív sávval rendelkezik ($\varepsilon = 13\,970$) [38]. Az erős háttér miatt még ebben a formában sem lehet elvégezni a meghatározást; a háttér differencia-spektrofotometriás eliminálása azonban lehetővé teszi e meghatározás elvégzését. Itt érdemes megjegyezni azt, hogy a háttérspektrum pH-függő összetevőinek hatását úgy lehetett kiejteni, hogy az összehasonlító és mérendő oldat nemcsak a táp extraktumát tartalmazta azonos koncentrációban, hanem a sósavat is. A különbség mindössze annyi volt, hogy a mérendő oldat úgy készült, hogy a fenti reakcióidő után került sor az oldat 20-szoros hígítására, míg az összehasonlító oldatban először került sor a hígításra, s így az extraktum már csak a hígított sósavval találkozott, s ebben a koncentrációban a mérés időtartama alatt nem játszódik le a dehidratálás [39].

Eliminációs reakciókon túlmenően sav, ill. bázis katalizálta átrendeződési reakciók is alapját képezhetik differencia-spektrofotometriás módszereknek. Példaként $\Delta^{5(10)}$-3-keto-szteroidok meghatározását mutatjuk be. Amint az a (8/2) egyenleten látható, ezek a nem konjugált helyzetben kettős kötést és ketoncsoportot tartalmazó szteroidok igen enyhe lúgos kezelés hatására átrendeződnek az intenzív abszorpciós sávval rendelkező Δ^4-3-keto-vegyületekké, ($\lambda_{max} = 240$ nm; $\varepsilon \sim 17\,000$).



(8/2)

Ez a reakció felhasználható volt pl. noretinodrel (17α-etinil-17-hidroxi-5(10)-ösztrén-3-on) meghatározására tablettakészítményben [36], ill. 5(10)-ösztrén-3,17-dion szennyezés meghatározására 500-szoros mennyiségű 3,3-dimetoxi-5(10)-én-17-onban. Ez utóbbi esetben az összehasonlító és a mért oldat összetétele teljesen azonos volt, mindössze annyi különbséggel, hogy a mérendő oldat a fenti lúgos kezelés után került semlegesítésre ecetsavval, míg az összehasonlító oldatba előbb került az ecetsav majd azt követően a nátrium-hidroxid [27].

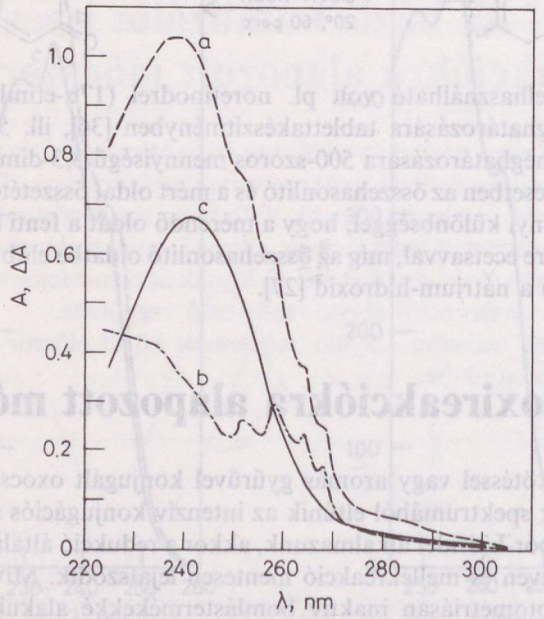
8.4. Redoxireakciókra alapozott módszerek

Ha egy kettős kötéssel vagy aromás gyűrűvel konjugált oxocsoportot alkohollá redukálunk, akkor spektrumából eltűnik az intenzív konjugációs sáv. Ha redukálószerként nátrium-bór-hidridet alkalmazunk, akkor a redukció általában szobahőmérsékleten kvantitatíven és mellékreakció mentesen lejátszódik. Mivel a redukálószer feleslege spektrofotometriásan inaktív bomlástermékekké alakul át, ez a reakció konjugált telítetlen oxocsoportot tartalmazó vegyületek differencia-spektrofotometriás meghatározásának alapját képezheti. Ez esetben a redukált oldat kerül az összehasonlító, míg a kezeletlen oldat a mérő küvettába. (A két oldat összetételét a differen-

cia-spektrofotometria általános elveinek megfelelően még közelebb hozhatjuk egymáshoz oly módon, hogy az összehasonlító oldatban a nátrium-bór-hidridet metanol vagy híg sósav alkalmazásával a redukció után elbontjuk, a mérendő oldatba viszont már csak az azonos mennyiségű redukálószer azonos módon való elbontása után visszük be a törzsoldat részletét.) Az így nyert differenciaspektrumra jellemző, hogy a redukció során eltűnő sáv környezetében megegyezik vagy igen hasonló a redukciónak alávetett vegyület eredeti spektrumával. A szelektív meghatározás elvégezhető minden olyan anyag jelenlétében, amely nem változtatja a spektrumát a redukálószerrel való kölcsönhatás során.

A nátrium-bór-hidrides redukcióra alapozott differencia-spektrofotometriás módszert eredetileg GÖRÖG írta le α,β-telítetlen 3-ketoszteroidok meghatározására [24—26]. A módszert később CHAFETZ [6] és KIRSCHBAUM [45] módosította. Az előbbi a nehezebben redukálható $\Delta^{1,4}$-3-keto-szteroidok redukciójára lítium-bór-hidridet javasolt, az utóbbi pedig propilénglikolnak a reakcióelegyhez való adásával komplexbe vitte a bomlott nátrium-bór-hidrid mintákban szennyezésként jelenlevő nátrium-metaborátot, ami inhibiálja a redukciót, s így növelte a módszer megbízhatóságát. A módszer különböző gyakorlati feladatokra való alkalmazásait a 8/2. táblázatban foglaljuk össze.

A 8/2. táblázatban bemutatott példák közül a 8/7. ábrán bemutatjuk progeszteron meghatározását Limovanil olajos injekcióban. Látható, hogy az injekció metanolos



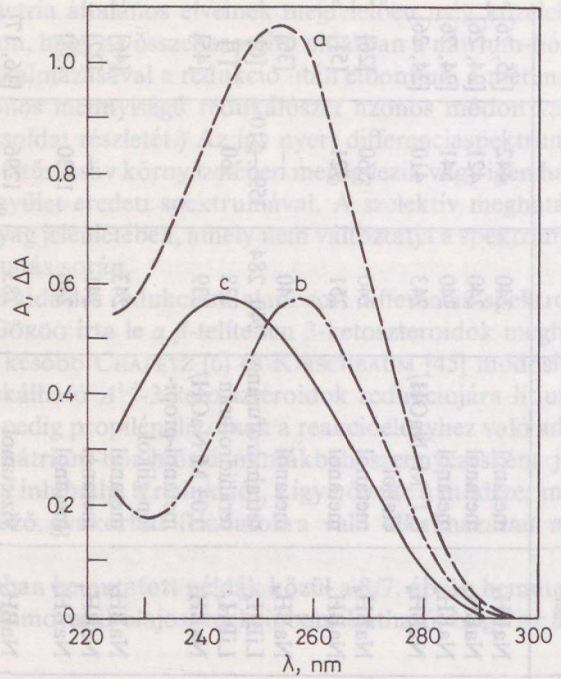
8/7. ábra. Progeszteron meghatározása Limovanil[R] olajos injekcióban. Oldószer: metanol.

a görbe: extraktum spektruma nátrium-bór-hidrides kezelés nélkül. *b* görbe: extraktum spektruma nátrium-bór-hidrides kezelés után. *c* görbe: differenciaspektrum (összehasonlító oldat: kezelt; mért oldat: kezeletlen). (S. GÖRÖG, J. Pharm. Sci. **57**, 1737 (1968) [24])

8/2. táblázat. Alkáli-bór-hidrides redukción alapuló differencia-spektrofotometriás módszerek

Mért vegyület	Minta	Redukáló-szer	Oldószer	λ_{max}, nm	$\Delta A^{1\%}_{1\,cm}$	Irodalom
Hidrokortizon	fermentlé	$NaBH_4$	metanol	240	442	[25, 26]
19-nortesztoszteron-fenilpropionát	olajos injekció	$NaBH_4$	metanol	240	421	[24, 26]
Progeszteron	olajos injekció	$NaBH_4$	metanol	240	541	[24, 26]
Prednizolon	tabletta, kenőcs	$NaBH_4$	0,1 M NaOH/ etanol	243	410	[24, 26]
Noretiszteron	szennyezés etinodiolban	$NaBH_4$	metanol	240	560	[26]
Aromás ketonok pl. 4-metil-propiofenon	Friedel—Crafts-szintézis reakcióelegye	$NaBH_4$	metanol	251	921	[51]
Norgesztrel	tabletta	$NaBH_4$	metanol	240	—	[36]
Δ^4-3-keto-, $\Delta^{1,4}$-3-keto-, $\Delta^{4,6}$-3-ketoszt.		$LiBH_4$	tetrahidrofurán	240, 284	359—510	[6]
Fluocinolon acetonid	kenőcs	$LiBH_4$	terahidrofurán	238	360	[7]
Halcinonid stb.	—	$NaBH_4$	0,03 M NaOH/ metanol-propilén-glikol	239	—	[45]
Quingestanol acetát*	olajos injekció	$NaBH_4$	metanol	243		[46]
Norgesztrel	tabletta	$NaBH_4$	metanol	241	—	[22]
Benzaldehid	szennyezés benzil-alkoholban	$NaBH_4$	metanol	246	1130	[34]
5-Hidroxilmetil-furfuraldehid	bomlástermék szirupokban	$NaBH_4$	víz-etanol	283	1296	[16, 17]

* Noretiszteron-acetáttá való átalakítás után.



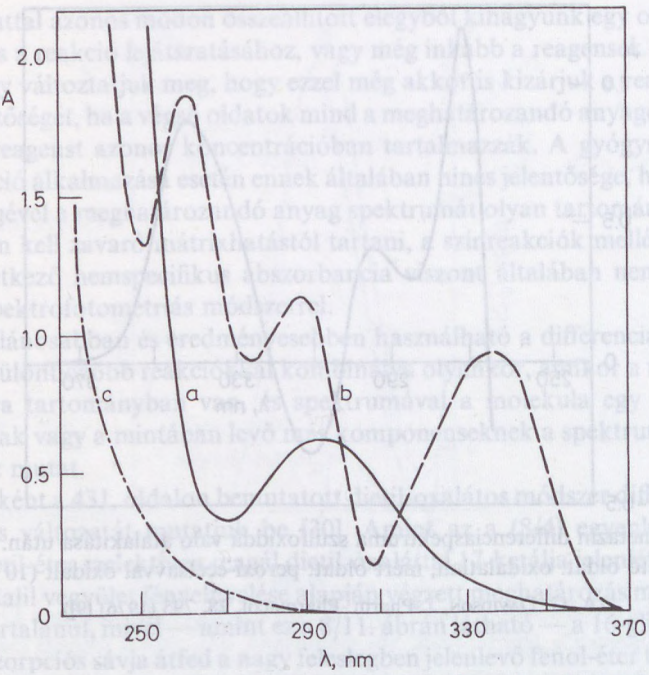
8/8. ábra. Prednizolon meghatározása kenőcsben. Oldószer: etanol. Az *a*, *b* és *c* görbék aláírása megegyezik a 8/7. ábránál megadottal.

(S. Görög, J. Pharm. Sci. **57**, 1737 (1968) [24])

extraktumának spektruma erősen torzult a tiszta progeszteronéhoz viszonyítva (*a* görbe). A redukált oldat (*b* görbe) alapján felismerhetők a torzulás okai: a spektrum rövidhullámú része az injekcióban levő ösztradiol-benzoáttól, a finomszerkezettel rendelkező rész a benzil-alkoholtól, a hátteret adó rész pedig az olajból kioldódó definiálatlan komponensektől származik. Amint az várható, az előbbi két komponens nem reagál nátrium-bór-hidriddel, a differenciaspektrum (*c* görbe) jó egyezése a progeszteron spektrumával azt mutatja, hogy ez utóbbi háttér sem változik a reakció során.

Egy másik példát a 8/8. ábrán mutatunk be. Prednizolon kenőcs alapspektrumában a jelenlevő metil-paraben aromás sávja miatt már alig ismerhető fel a prednizolon spektruma. Mivel ez utóbbi nem reagál nátrium-bór-hidriddel, a differenciaspektrum (*c* görbe) itt is alkalmas a hatóanyag prednizolon meghatározására, míg a redukált oldat spektrumában (*b* görbe) a metil-paraben spektruma ismerhető fel.

Oxidációs reakciók is képezhetik differencia-spektrofotometriás módszerek alapját, amennyiben az oxidációs reakció egyértelműen játszódik le, az oxidálószer nem rendelkezik számottevő elnyeléssel a mérési tartományban, és a meghatározandó anyag oxidált alakjának spektruma kellőképpen különbözik az eredeti spektrumtól. Ezek a feltételek maradéktalanul teljesülnek a Davidson által fenotiazin-gyógyszerek-

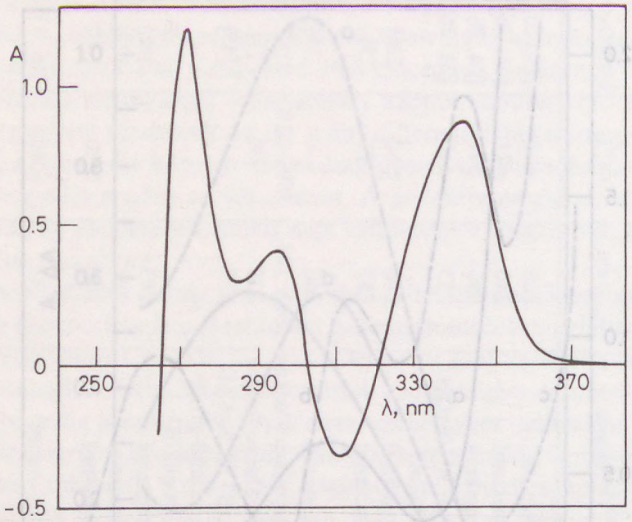


8/9. ábra. Spektrumok prometazin meghatározásához szulfoxiddá való átalakítás után. Oldószer: víz.

a görbe: prometazin-hidroklorid (10^{-4} M/l); *b* görbe: prometazin szulfoxid (10^{-4} M/l); *c* görbe: hígított (1+19) oxidáló reagens (peroxi-ecetsav). (A. G. DAVIDSON, J. Pharm. Pharmacol. **28**, 795 (1976) [34])

re kidolgozott módszer esetében [9, 10]. A módszer alapja a fenotiazin váz oxidációja peroxiecetsavval a megfelelő szulfoxiddá. Ez vizes vagy jégecetes közegben szobahőmérsékleten lejátszódik, miközben a spektrumok jelentős batokróm eltolódást szenvednek. A 8/9. ábrán tüntettük fel kezeletlen prometazin, annak oxidált alakja, valamint az oxidálószer spektrumát, míg a 8/10. ábrán látható a differenciaspektrum (az oxidálatlan oldattal szemben mért oxidált oldat).

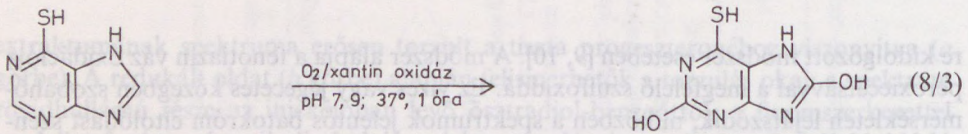
A megvizsgált számos fenotiazinszármazék (prometazin, klórpromazin, trifluoperazin, tioridazin, promazin stb.), valamint a HACKMANN és munkatársai [42] által vizsgált levomepromazin differenciaspektrumának maximuma 333 és 353 nm között van, s a differencia fajlagos abszorbanciák 56 és 166 közti értékek, ami kielégítően érzékeny és igen szelektív meghatározást tesz lehetővé. Ezt ki is használták számos folyékony és szilárd gyógyszerkészítmény hatóanyagtartalmának meghatározására. Külön kiemelendő, hogy a szulfoxid éppen a fenotiazinszármazékok fő bomlástermé-ke, a differencia-spektrofotometriás módszer természetesen ezzel a bomlástermékkel szemben specifikus az átalakulatlan hatóanyagra. Érdekes, hogy a szulfoxid típusú bomlástermék szelektív meghatározására viszont az ismertetett módszer fordítottját: a szulfoxid cink/sósavas redukcióján alapuló differencia-spektrofotometriás módszert dolgoztak ki [10].



8/10. ábra. Prometazin differenciaspektruma szulfoxiddá való átalakítása után. Oldószer: víz. Összehasonlító oldat: oxidálatlan; mért oldat: peroxi-ecetsavval oxidált (10^{-4} M/dm^3).

(A. G. Davidson, J. Pharm. Pharmacol. **28,** 795 (1976) [9])

Ugyancsak oxidációs reakció képezi az alapját Görög és Görög [40] módszerének is 6-merkaptopurin meghatározására. A xantin oxidáz enzim által katalizált reakcióban a levegő oxigénje oxidálja tiohúgysavvá a meghatározandó anyagot (8/3 egyenlet):



6-merkapto-purin

λ_{max} = 312 nm
ε = 19 040

tiohúgysav

λ_{max} = 347 nm
ε = 23 000

Az enzimet nem tartalmazó oldattal szemben felvéve az enzimesen oxidált oldatot, differenciaspektrumhoz jutunk ($\lambda_{max} = 348$ nm; $\Delta\varepsilon = 22\,600$), ami olyan nagy szelektivitást biztosít a módszernek, hogy lehetővé teszi 6-merkaptopurin meghatározását vizeletben metabolitok és endogén anyagok jelenlétében.

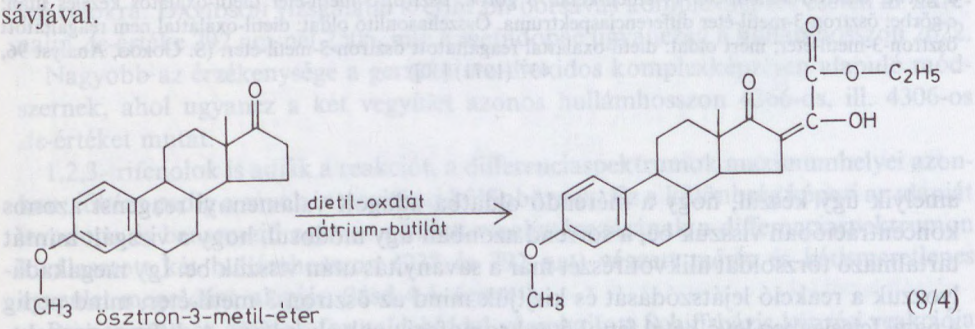
8.5. Egyéb reakciókra alapozott módszerek

Elvileg bármely kémiai reakcióra alapozott spektrofotometriás módszernek ki lehet dolgozni a differencia-spektrofotometriás változatát is. A korábban leírtak alapján ezt úgy lehet elérni, hogy az összehasonlító oldat elkészítése során az egyébként a

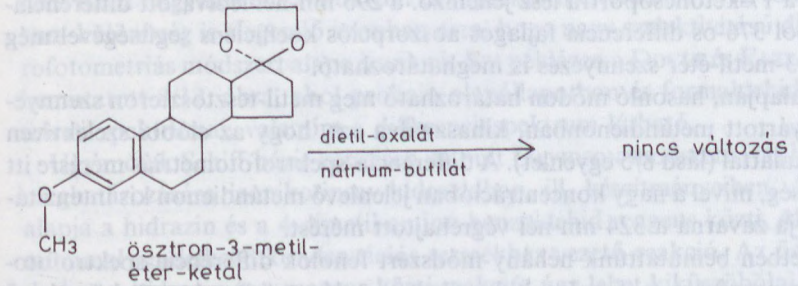
mérendő oldattal azonos módon összeállított elegyből kihagyunk egy olyan reagenst, ami szükséges a reakció lejátszatásához, vagy még inkább a reagensek adagolásának sorrendjét úgy változtatjuk meg, hogy ezzel még akkor is kizárjuk a reakció lejátszódásának lehetőségét, ha a végső oldatok mind a meghatározandó anyagot, mind pedig valamennyi reagenst azonos koncentrációban tartalmazzák. A gyógyszer-analitikában színreakció alkalmazása esetén ennek általában nincs jelentősége, hiszen a színreakció segítségével a meghatározandó anyag spektrumát olyan tartományba toljuk el, ahol már nem kell zavaró mátrixhatástól tartani, a színreakciók melléktermékeként gyakran keletkező nemspecifikus abszorbancia viszont általában nem ejthető ki a differencia-spektrofotometriás módszerrel.

Annál általánosabban és eredményesebben használható a differencia-spektrofotometria a legkülönbözőbb reakciókkal kombinálva olyankor, amikor a reakciótermék az ultraibolya tartományban van, és spektrumával a molekula egy másik, izolált kromoforjának vagy a mintában levő más komponenseknek a spektruma több-kevesebb átfedést mutat.

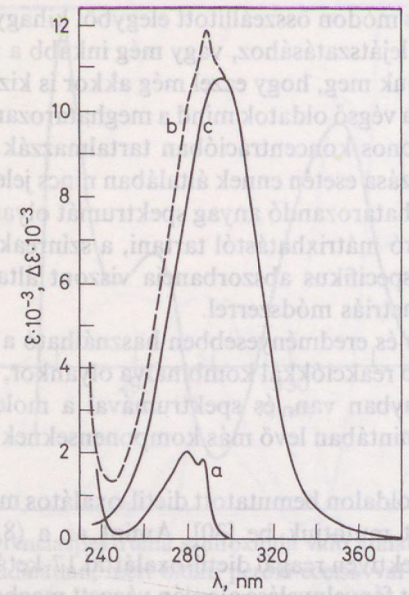
Első példaként a 431. oldalon bemutatott dietil-oxalátos módszer differencia-spektrofotometriás változatát mutatjuk be [30]. Amint az a (8/4) egyenletben látható, ösztron-3-metil-éter szelektíven reagál dietil-oxaláttal 17-ketálja jelenlétében. A keletkező 16-glioxalil vegyület fényelnyelése alapján végzett meghatározás mégsem hajtható végre zavartalanul, mivel — amint ez a 8/11. ábrán látható — a 16-glioxalil-17-keto rendszer abszorpciós sávja átfed a nagy feleslegben jelenlevő fenol-éter típusú *A* gyűrű sávjával.



(8/4)



A mérést ezért úgy célszerű kivitelezni, hogy a vízmentes, nátrium-alkoholátos közegben végrehajtott Claisen-kondenzáció reakcióelegye savas-vizes elbontás után a mérő küvettába kerül, az összehasonlító küvettába viszont egy olyan oldatot töltünk,



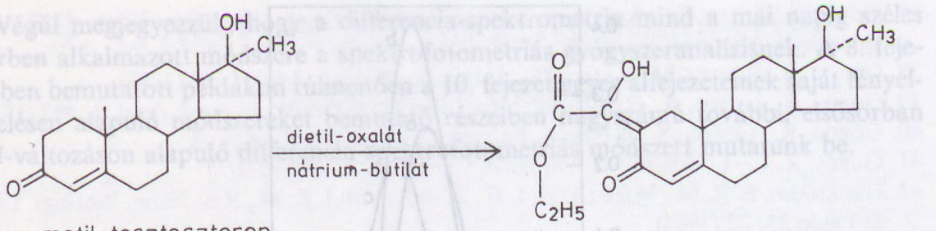
8/11. ábra. Spektrumok ösztron-3-metil-éter szennyezés meghatározásához 17-etilén-ketáljában. Oldószer: 9% *terc*-butanol, 5% ciklohexán, 0,02 mólos sósavas etanolban.

a görbe: ösztron-3-metil-éter-17-etilén-ketál; *b* görbe: ösztron-3-metil-éter dietil-oxalátos kezelés után; *c* görbe: ösztron-3-metil-éter differenciaspektruma. Összehasonlító oldat: dietil-oxaláttal nem reagáltatott ösztron-3-metil-éter; mért oldat: dietil-oxaláttal reagáltatott ösztron-3-metil-éter. (S. Görög, Analyst **96,** 437 (1971) [30])

amelyik úgy készül, hogy a mérendő oldatba adagolt valamennyi reagenst azonos koncentrációban visszük be, a sorrend azonban úgy módosul, hogy a vizsgált mintát tartalmazó törzsoldat alikvot részét már a savanyítás után visszük be. Így megakadályozzuk a reakció lejátszódását és kiejtjük mind az ösztron-3-metil-éter, mind pedig a nagy feleslegben levő ketál fenol-éter kromoforjainak elnyelését. A differenciaspektrum már csak a 17-ketoncsoportra lesz jellemző: a 295 nm-nél leolvasott differenciaabszorbanciából 376-os differencia fajlagos abszorpciós koefficiens segítségével még 0,1% ösztron-3-metil-éter szennyezés is meghatározható.

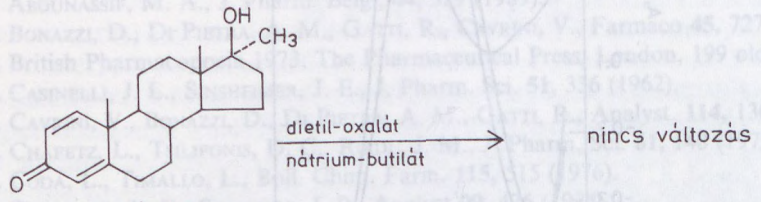
Azonos elv alapján, hasonló módon határozható meg metil-tesztoszteron szennyezés a belőle gyártott metándienonban, kihasználva azt, hogy az előbbi szelektíven reagál dietil-oxaláttal (lásd 8/5 egyenlet). A differencia-spektrofotometriás mérésre itt azért van szükség, mivel a nagy koncentrációban jelenlevő metándienon kis intenzitású n — π^* sávja zavarná a 324 nm-nél végrehajtott mérést.

A 8.2. fejezetben bemutattunk néhány módszert fenolok differencia-spektrofotometriás meghatározására a fenolos hidroxilcsoport lúgos közegben bekövetkező ionizációja alapján. A következőkben még szelektívebb módszereket mutatunk be 1,2-difenolok meghatározására bórsavval [13], ill. germánium-dioxiddal [14,15] végbemenő gyűrűs komplexképződés alapján. A pH 7-nél, ill. pH 6-nál végrehajtott



metil-tesztoszteron

(8/5)



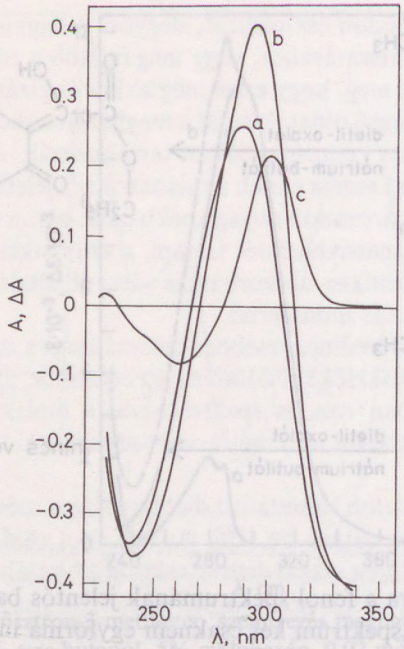
metándienon

komplexképződés hatására a fenol spektrumának jelentős batokróm eltolódása következik be. A differenciaspektrum két csaknem egyforma intenzitású pozitív maximumot ad, amelyek közül a hosszabb hullámhossznál megjelenőt használják analitikai célokra. DAVIDSON vizsgálatai szerint pl. bórsavas komplexképzés esetén az adrenalin $\Delta\varepsilon$-értéke 292 nm-nél 2506, míg a metildopáé ugyanezen a hullámhosszon 2622. Nagyobb az érzékenysége a germánium-dioxidos komplexképzésen alapuló módszernek, ahol ugyanez a két vegyület azonos hullámhosszon 4366-os, ill. 4306-os $\Delta\varepsilon$-értéket mutat.

1,2,3-trifenolok is adják a reakciót, a differenciaspektrumok maximumhelyei azonban, főként pedig a sávok intenzitásai különböznek. Ez a különbség képezi az alapját levodopa és benserazid egymás melletti meghatározásának a differenciaspektrumon kiválasztott két hullámhosszon (238 és 292 nm) végzett mérés és kétismeretlenes egyenlet megoldása alapján (lásd 4.4. fejezet).

Primer aromás aminok formaldehiddel végrehajtott Schiff-bázis képzési reakciója nem okoz nagymértékű batokróm és hiperkróm eltolódást, még ez a szerény spektrum-különbség is elegendő azonban arra, hogy nagy szelektivitású differencia-spektrofotometriás módszert alapozzunk rá. Ezt példázza a DOYLE és FAZZARI [21] nyomán bemutatott 8/12. ábra, ahol prokain alapállapotban és formaldehides reakció után felvett spektrumai, valamint a differenciaspektrum látható.

Ugyancsak Schiff-bázis képzésen alapult DAVIDSON módszere [11] hidrazinnyomok meghatározására izonikotinsav-hidrazidban, ill. készítményeiben. A meghatározás alapja a hidrazin és a 4-dimetil-amino-benzaldehid reagens közti, 456 nm-nél maximummal rendelkező kondenzációs termékhez vezető reakció. Az összehasonlító oldatban a hidrazin és a reagens közti reakciót úgy lehet kiküszöbölni, hogy a reagens hozzáadása előtt a hidrazint aceton hozzáadásával megkötjük. A módszer lehetővé teszi izonikotinsav-hidrazidban 10 ppm nagyságrendű hidrazinszennyezés meghatározását, s ezért alkalmas készítményei bomlottsági fokának meghatározására.

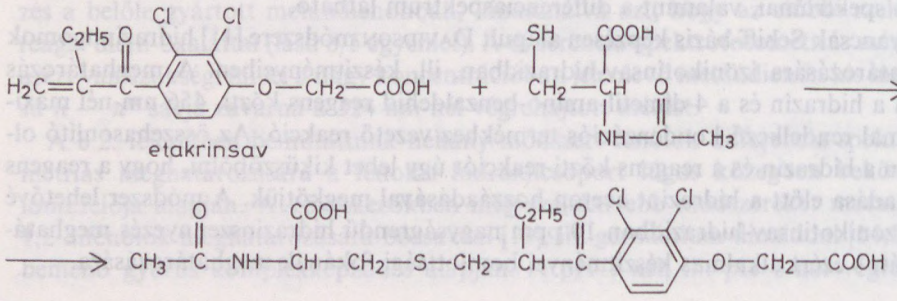


8/12. ábra. Spektrumok prokain meghatározásához formadehiddel való kondenzáció után.

a görbe: prokain spektruma (1 mg/100 ml); *b* görbe: prokain spektruma formaldehiddel való reakció után (1 mg/100 ml); *c* görbe: differenciaspektrum (1 mg/100 ml). Összehasonlító oldat: formadelhiddel kezeletlen; mért oldat: formaldehiddel kezelt. (T. D. Doyle, F. R. Fazzari, J. Pharm. Sci. **63**, 1921 (1974) [21])

Ennek az elvnek fordítottja érvényesül az ugyancsak Davidson [15] által leírt módszernél 5-hidroximetil-furfuraldehid bomlástermék meghatározására szirup készítményekben. A mérés alapjául szolgáló reakció itt az aldehidcsoport kölcsönhatása izonikotinsav-hidrazid reagenssel.

Utolsó példaként bemutatjuk Cavrini és munkatársai [5] módszerét etakrinsav meghatározására gyógyszerkészítményekben. Amint az a (8/6) reakcióegyenleten látható, ennek a vegyületnek terminális vinilcsoportja könnyen addicionál *N*-acetilciszteint. A reakció hatására a spektrumban végbemenő hipszokróm és hiperkróm eltolódás képezi az alapját a szelektív, stabilitási vizsgálatokra is alkalmas differenciaspektrofotometriás módszernek (mérés 270 nm-nél).



Végül megjegyezzük, hogy a differencia-spektrometria mind a mai napig széles körben alkalmazott módszere a spektrofotometriás gyógyszeranalízisnek. A 8. fejezetben bemutatott példákon túlmenően a 10. fejezet egyes alfejezeteinek saját fényelnyelésen alapuló módszereket bemutató részeiben nagyszámú további, elsősorban pH-változáson alapuló differencia-spektrofotometriás módszert mutatunk be.

Irodalom

1. Abounassif, M. A., J. Pharm. Belg., **44,** 329 (1989).
2. Bonazzi, D., Di Pietra, A. M., Gatti, R., Cavrini, V., Farmaco **45,** 727 (1990).
3. British Pharmacopoeia 1973, The Pharmaceutical Press, London, 199 old.
4. Casinelli, J. L., Sinsheimer, J. E., J. Pharm. Sci. **51,** 336 (1962).
5. Cavrini, V., Bonazzi, D., Di Pietra, A. M., Gatti, R., Analyst. **114,** 1307 (1989).
6. Chafetz, L., Tsilifonis, D. C., Riedl, J. M., J. Pharm. Sci. **61,** 148 (1972).
7. Coda, L., Timallo, L., Boll. Chim. Farm. **115,** 515 (1976).
8. Davidson, A. G., Stenlake, J. B., Analyst **99,** 476 (1974).
9. Davidson, A. G., J. Pharm. Pharmac. **28,** 795 (1976).
10. Davidson, A. G., J. Pharm. Pharmac. **30,** 410 (1978).
11. Davidson, A. G., Analyst **107,** 422 (1982).
12. Davidson, A. G., J. Pharm. Sci. **73,** 55 (1984).
13. Davidson, A. G., J. Pharm. Biomed. Anal. **2,** 45 (1984).
14. Davidson, A. G., J. Pharm. Sci. **73,** 1582 (1984).
15. Davidson, A. G., J. Pharm. Biomed. Anal. **3,** 235 (1985).
16. Davidson, A. G., J. Clin. Pharm. Therap **12,** 11 (1987).
17. Davidson, A. G., Dawodu, T. O., J. Pharm. Biomed. Anal. **5,** 213 (1987).
18. Davidson, A. G., Dawodu, T. O., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 61 (1988).
19. Davidson, A. G., J. Pharm. Pharmacol. **41,** 63 (1989).
20. Demetrius, J. C., Sinsheimer, J. E., J. Pharm. Sci. **49,** 523 (1960).
21. Doyle, T. D., Fazzari, F. R., J. Pharm. Sci., **63,** 1921 (1974).
22. Fell, A. F., Advances in Steroid Analysis. (Görög, S. ed.), Akadémiai Kiadó — Elsevier, Budapest — Amsterdam 1982, 495 old.
23. Fell, A. F., „Difference spectroscopy", in A. Knowles, C. Burgess (ed.), Practical Absorption Spectrometry. Chapman and Hall, London 1984.
24. Görög, S., J. Pharm. Sci. **57,** 1737 (1968).
25. Görög, S., Steroids **11,** 93 (1968).
26. Görög, S., Magy. Kém. Folyóirat **74,** 447 (1968).
27. Görög, S., Acta Chim. Hung. **61,** 341 (1969).
28. Görög, S., Farm. Tidende **80,** 321 (1970).
29. Görög, S., Csizér, É., Proc. Anal., Conf. Budapest, 1970. Vol. 2, 65. old.
30. Görög, S., Analyst **96,** 437 (1971).
31. Görög, S., Csizér, É., Z. Anal. Chem. **254,** 119 (1971).
32. Görög, S., Proc. 2nd Symp. Appl. Phys. Chem. Veszprém, 1971, Akadémiai Kiadó, Budapest, p. 323.
33. Görög, S., Analyst **101,** 512 (1976).
34. Görög, S., Sütő, J., Acta Pharm. Hung. **46,** 227 (1976)
35. Görög, S., Fütő, M., Laukó, A., Acta Pharm. Hung. **46,** 113 (1976).
36. Görög, S., Zbl. Pharm. **116,** 259 (1977).

37. Görög, S., Szász, Gy., Analysis of Steroid Hormone Drugs. Akadémiai Kiadó — Elsevier, Budapest — Amsterdam 1978. a. 325 old.; b. 355 old.
38. Görög, S., Rényei, M., Laukó, A., J. Pharm. Biomed. Anal. **1,** 39 (1983).
39. Görög, S., Laukó, A., Rényei, M., Hegedüs, B., J. Pharm. Biomed. Anal. **1,** 497 (1983).
40. Görög, K., Görög, S., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 109 (1988).
41. Gupta, R. C., Lundberg, G. D., Anal. Chem. **45,** 2403 (1973).
42. Hackmann, E. R. M., Magalhaes, J. F., Santoro, M. I. R. M., Rev. Farm. Biochim. Univ. S. Paulo **22,** 22 (1986).
43. Horváth, P., Szepesi, G., Acta Pharm. Hung. **48,** 199 (1978).
44. Kannan, K., Manavalan, R., Kelkar, A. K., Indian Drugs **25,** 128 (1987).
45. Kirschbaum, J., J. Pharm. Sci. **67,** 275 (1978).
46. Penner, M. H., Tsilifonis, D. C., Chafetz, L., J. Pharm. Sci. **60,** 1388 (1971).
47. Rondina, R. V. D., Bandoni, A. L., Coussio, J. D., J. Pharm. Sci. **62,** 502 (1973).
48. Sethi, P. D., Chatterje, P. K., Jain, C. L., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 253 (1988).
49. Shane, N. A., Kowblansky, M., J. Pharm. Sci. **57,** 1218 (1968).
50. Shane, N. A., Routh, J. I., Anal. Chem. **39,** 414 (1967).
51. Szepesi, G., Görög, S., Szakolczay, I., Chem. Anal. **16,** 211 (1971).
52. The United States Pharmacopoeia XIX, Mack Publ. Co., Easton, Pa., 1975, a. 181. old.; b. 191. old.
53. Wahbi, A. M., Farghaly, A. M., J. Pharm. Pharmacol. **22,** 848 (1970).
54. Williams, L. A., Zak, B., Clin. Chim. Acta. **4,** 170 (1959).
55. Zwillenberg, L. O., Bösiger, G., Zwillenberg, H. H. L., Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol. **4,** 575 (1982).
56. Young Soon Chae, W. H. Shelwer, J. Pharm. Sci. **65,** 1178 (1976).

9. Gyógyszerek spektrofotometriás meghatározása különféle mátrixokban

9.1. Bevezetés

Miután a 4—8. fejezetekben áttekintettük gyógyszervegyületek spektrofotometriás meghatározásának lehetőségeit és mielőtt a 10. fejezetben felvázoljuk a gyógyszerek legfontosabb családjai spektrofotometriás meghatározásának problémáit, ebben a fejezetben röviden áttekintjük azokat a speciális kérdéseket, amiket gyógyszereknek különféle mátrixokban való meghatározása vet fel.

Így röviden megtárgyaljuk gyógyszer-alapanyagok spektrofotometriás vizsgálatának problémáit, majd a hatóanyagok meghatározását különböző kiszerelt készítményekben, ahol a problémát részben a mátrix spektrofotometriás aktivitása zavaró hatásának eliminálása, részben pedig a hatóanyag megfelelő extrakciója okozza. Ennek kapcsán röviden áttekintjük a spektrofotometria lehetőségeit gyógyszerkészítmények stabilitásvizsgálatában. Az extrakció és a mátrix zavaró hatásának eliminálása jelenti — a gyógyszerkészítményeknél tárgyaltnál lényegesen nagyobb — problémát biológiai mintáknak a következő alfejezetben tárgyalandó spektrofotometriás vizsgálatánál. Valamennyi feladattípus esetében erőteljes tendencia érvényesül a vizsgálatok automatizálása irányába; ezért az ezzel kapcsolatos kérdéseket is itt tárgyaljuk.

9.2. Gyógyszer-alapanyagok

Gyógyszer-alapanyagok spektrofotometriás vizsgálatánál természetesen nem kell a szó klasszikus értelmében vett mátrixhatással számolni. A gyakorlatban azonban a gyógyszer-alapanyag a hatóanyag és szennyezései elegyének tekinthető, s így a hatóanyag-tartalom meghatározása esetén a szennyezéssel, a szennyezés meghatározása esetén pedig a hatóanyaggal kell mint mátrixszal számolni.

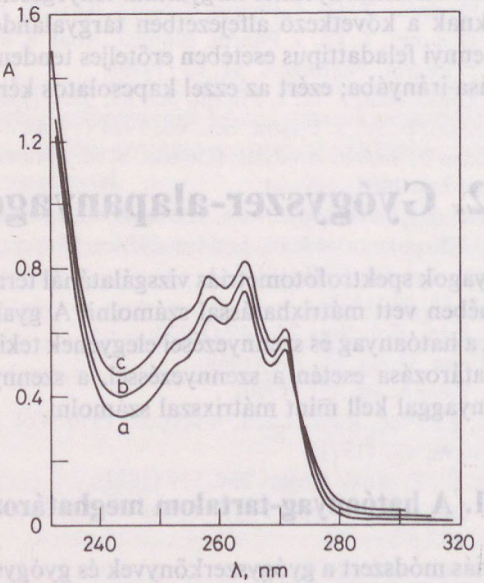
9.2.1. A hatóanyag-tartalom meghatározása

A spektrofotometriás módszert a gyógyszerkönyvek és gyógyszervizsgálati szabványok igen gyakran alkalmazzák gyógyszer-alapanyagok vizsgálatára. Ha a feladat csupán a hatóanyag azonosítása, akkor általában csak a maximum (esetleg minimum) hullámhosszának a standard mintáéval való megegyezése a kritérium. Meg kell

jegyezni, hogy ennek az azonosítási módszernek az értéke általában elmarad a sokkal sávgazdagabb infravörös vagy NMR-spektrum alapján történő azonosítás információtartalma mögött.

A kvantitatív mérésnek kétféle formája terjedt el. Az egyik esetben a kritérium csupán az, hogy a maximumhelyen mért fajlagos abszorpciós koefficiens egyezzen meg (általában ± 2—3%-on belül) a párhuzamosan vizsgált referens standard azonos értékével. Ez esetben tehát a fajlagos abszorpciós koefficiens meghatározását nem tekintjük sem többnek, sem kevesebbnek, mint egy olyan fizikai állandó meghatározásának, mint az olvadáspont vagy a fajlagos forgatóképesség. Ennek megfelelő értéke szükséges, de semmi esetre sem elégséges feltétele annak, hogy az alapanyag minőségét megfelelőnek tekinthessük. Ennek a korlátozásnak az oka az, hogy — amint arra a 4.1. fejezetben számos gyakorlati példa kapcsán rámutattunk — a gyógyszer-alapanyag szennyezései a főkomponensével azonos vagy hasonló spektrummal rendelkezhetnek, s így csupán a fajlagos abszorpciós koefficiens alapján a reálisnál kedvezőbb képet kaphatunk. Ha azonban — ami a gyógyszerkönyvekben általában a gyakorlat — a rokon szennyezések mennyiségét valamilyen kvantitatív vagy félkvantitatív kromatográfiás módszerrel (általában vékonyréteg-kromatográfiásan) limitáljuk, akkor a fajlagos abszorpciós koefficiens meghatározása jól illeszkedik bele a reális kép kialakításába a gyógyszer-alapanyag minőségéről.

Sokkal problematikusabb a helyzet akkor, ha a mért fajlagos abszorpciós koefficiensnek a standard megfelelő értékével való összehasonlítását a hatóanyag-tartalom kiszámítására használják, hiszen a fenti gondolatmenet és a 4.1. fejezetben felsorolt



9/1. ábra. Tiszta és szennyezett flumecinol spektrumai. Oldószer: etanol; $c = 0{,}0237$ g/100 ml.

a görbe: tiszta flumecinol; *b* görbe: 0,5% 3-trifluor-metil-benzofenont tartalmazó flumecinol; *c* görbe: 1,0% 3-trifluor-metil-benzofenont tartalmazó flumecinol

példák alapján az így mért hatóanyag-tartalom gyakran csak látszólagos érték, ami csak akkor tekinthető reális hatóanyag-tartalomnak, ha valamennyi szennyezés spektrofotometriásan inaktív.

További korlátozást jelent a korábbi fejezetekben tárgyaltak alapján természetesen az is, hogy megbízható kvantitatív mérés céljaira csupán 220 nm feletti, és legalább 1000, de célszerűen inkább 10 000 feletti moláris abszorpciós koefficienssel jellemezhető sáv alkalmas. Kis intenzitású sávra alapozott spektrofotometriás mérés esetén az esetleg jelenlévő szennyezésből származó hiba nemcsak olyan jellegű lehet, hogy a szennyezés spketruma megegyezik a főkomponensével, hanem annál sokkal (bizonyos esetekben nagyságrenddel) nagyobb is lehet. Ilyen esetekben esetleg már kis mennyiségű szennyezés jelenléte 100%-nál jelentősen magasabb látszólagos hatóanyag-tartalmat eredményez. Ennek illusztrálására a 9/1. ábrán bemutatjuk az izolált aromás gyűrűkkel rendelkező és ennek következtében 264 nm-nél mindössze 870-es moláris abszorpciós koefficienssel rendelkező flumecinol (képletét lásd 157. oldal) spektrumát 0,5, ill. 1% 3-trifluor-metil-benzofenon (potenciális szennyezés) jelenlétében. Ez utóbbi abszorpciós maximuma 249 nm-nél van ($\varepsilon = 16\,050$); ez az érték 264 nm-nél 9900. Látható, hogy már 0,5% szennyezés következtében a látszólagos hatóanyag-tartalom 106,2%-ra nő. Természetesen ez a 100% feletti „hatóanyag-tartalom" is az anyag szennyezettségéről tanúskodik, de azt is könnyű belátni, hogy ilyen esetekben egy-egy spektrofotometriásan erősen aktív, ill. inaktív szennyezés véletlen mennyiségi kombinációjából előállhat olyan eset, amikor egy erősen szennyezett minta 100%-osnak mutatkozik. Az is kétségtelen tény azonban, hogy ilyen hibát csak akkor követhetünk el, ha csak a maximum hullámhosszán mért abszorbanciából számolunk. Teljes spektrum felvétele esetén ui. a spektrum bizonyos mértékű torzulása ilyen esetben is jelzi a minta szennyezettségét, annak lehetőségét ui. ki lehet zárni, hogy a főkomponensnél nagyobb spektrofotometriás aktivitású szennyezés spektrumának alakja teljesen megegyezzen a főkomponensével.

Természetesen valamennyi eddig tett megállapítás a saját fényelnyelés alapján végzett spektrofotometriás meghatározásra vonatkozik. Megfelelő kémiai reakció kiválasztásával a spektrofotometriásan nem kellőképpen aktív hatóanyagok is spektrofotometriásan mérhetővé válnak, ill. a szennyezések zavaró hatása is csökkenthető vagy esetleg eliminálható. Ilyen esetekben azonban figyelembe kell venni azt, hogy a kémiai reakciókra alapozott módszerek pontossága mindenképpen kisebb (bizonyos reakciók esetén lényegesen kisebb), mint a saját elnyelésre alapozott módszereké, s így annak ilyen módszerrel való eldöntését, hogy az anyag pl. 98, 98,5 vagy 99%-os, csak igen körültekintő munkával (mind az anyagból, mind pedig a párhuzamosan vizsgált standardból sok parallel vizsgálatával) lehet esetleg elvégezni. Általánosságban az állapítható meg, hogy — bár a gyógyszerkönyvek és gyógyszervizsgálati szabványok gyakran taralmaznak ilyen módszereket — a kémiai reakcióra alapozott spektrofotometriás mérés nem a legszerencsésebb megoldás gyógyszer-alapanyagok hatóanyag-tartalmának meghatározásánál.

9.2.2. Szennyezések meghatározása

Bár a szennyezések számának meghatározása, azonosításuk és mennyiségi mérésük tipikusan kromatográfiás feladat a korszerű gyógyszer-analitikában, kedvező spektrális adottságok esetén egy-egy szennyezés direkt spektrofotometriás meghatározását is el lehet végezni. Ilyen lehetőség elsősorban a spektrofotometriásan inaktív főkomponensben levő aktív szennyezések esetében nyílik. Pl. etinodiol-diacetátban a gyógyszerkönyvek „Konjugált diének" címen limitálják a fényabszorpciót 236 nm-nél [140a]. A megengedett abszorbancia (0,500, 0,05%-os oldatban) a két potenciális konjugált szennyezés, a 236, ill. 240 nm-nél abszorpciós maximummal rendelkező 17α-etinil-3,5-ösztradién-17-ol-acetát, ill. 17α-etinil-17-hidroxi-4-ösztrén-3-on-acetát 1,6, ill. 2,0%-nyi mennyiségben való jelenlétét teszi lehetővé.

Szerencsés esetben spektrofotometriásan aktív anyagban levő szennyezés is meghatározható, feltéve, ha spektruma kellőképpen különbözik a főkomponensétől. Kisebb különbség esetén csak százalék nagyságrendű szennyezés határozható meg, nagyobb különbség esetén, mint pl. a benzdiazepin-származékokban szennyezés, ill. bomlástermék formájában jelenlevő 2-amino-benzofenon-származékok (lásd 7.6. fejezet) esetében pedig ennél kevesebb is.

Bizonyos esetekben, mint pl. 1,4-di-(2,5-dimetil-fenil)-1,4-difenil-bután-1,4-diol szennyezés meghatározása esetében 2,5-dimetil-α-etil-benzhidrolban (RGH-3995) kémiai reakció is (ez esetben sav katalizálta vízelimináció — lásd 7.6. fejezet) elősegítheti a szelektív meghatározás lehetőségének megteremtését [49], ilyen esetek azonban viszonylag ritkák és — amint arra már utaltunk — gyógyszer-alapanyagok szennyezettségének meghatározása alapvetően kromatográfiás feladatnak tekinthető.

9.3. Tabletták és kapszulák

Tabletták és kapszulák hatóanyag-tartalmának meghatározására mind a mai napig az ultraibolya-látható spektrofotometria a leggyakrabban alkalmazott módszer. Ez a módszer meghatározó jelentőségű az e területen felmerülő mind a négy feladattípus (hatóanyag-tartalom meghatározása, hatóanyagdózis kiszerelési egységenkénti egyenletes eloszlásának vizsgálata, vagyis az ún., „content uniformity" vizsgálatok, a kioldódás mértékének és a kioldódás sebességének meghatározása) megoldásánál. Ezt az teszi lehetővé, hogy a tabletták és kapszulák gyártása során felhasznált segédanyagok általában egyrészről spektrofotometriásan inaktívok, másrészről általában gyakorlatilag oldhatatlanok a hatóanyag extrahálására használt oldószerekben (víz, híg sav, ill. lúg, metanol, etanol, kloroform, ill. ezek elegyei). Hangsúlyozni kell azonban, hogy a segédanyagok extrakciója során nyert oldatok spektruma a tiszta oldószerrel szemben felvéve általában az ultraibolya tartomány rövidhullámú vége tájékán több-kevesebb, a hullámhossz emelkedésével csökkenő, majd zéróvá váló abszorbanciát mutat. Ennek elhanyagolása különösen a rövidhullámú tartományban és kis hatóanyag-tartalmú készítmények, ill. alacsony moláris abszorpciós koefficienssel rendelkező anyagok esetében pozitív hibát okoz. Ezért erre a területre különösen

érvényes az a többször említett korlátozás, hogy 220 nm alatt nem célszerű dolgozni, továbbá nagyobb pontosság igényű mérések esetén szükség lehet háttérkorrekcióra, előzetes kromatográfiás elválasztásra vagy kémiai reakció alkalmazására is.

9.3.1. A hatóanyag-tartalom meghatározása

Általában 10—20 tabletta finomra őrölt porából vagy ugyanennyi kapszula egyesített és homogenizált tartalmából indulunk ki. Ebből mérünk be a hatóanyag-tartalom nagyságától és a mérés alapjául szolgáló moláris abszorpciós koefficiens értékétől függő mennyiséget. Amennyiben az oldékonysági viszonyok azt lehetővé teszik, az extrakcióra vizet, valamilyen puffert, ill. híg savat vagy lúgot használunk. Igen elterjedt extraháló oldószer a metanol és etanol is. Kloroformot csak abban az esetben használhatunk, ha a mérés alapjául szolgáló sáv 240 nm felett van, vagy az extrakció után oldószercserét hajtunk végre. Az extrakció után nyert elegyet szűréssel meg kell szabadítani az oldatlanul maradt tabletta alkotórészektől. Ezt üvegszűrő vagy szűrőpapír segítségével végezhetjük el. Különösen az utóbbi esetében és rövidhullámú méréseknél hibaforrást jelenthet a szűrőről leoldódó szennyezés. Ezért célszerű úgy eljárni, hogy az extrahált elegyet az extraháló oldószerrel mérőlombikban pontos térfogatra egészítjük ki, s ezt az elegyet szűrjük meg oly módon, hogy a szűrlet első részletét elöntjük, és a mérést a szűrlet további részéből közvetlenül vagy alkalmas hígítás után végezzük el.

A spektrofotometriás mérést elvégezhetjük saját fényelnyelés alapján közvetlenül vagy kémiai reakció után származék formájában. Megfelelő helyzetű és intenzitású sávval rendelkező anyagok esetében a gyógyszerkönyvek és gyógyszervizsgálati szabványok általában a saját fényelnyelés alapján történő mérést írják elő. (A szakirodalomban megjelenő tabletták spektrofotometriásan alapállapotban is aktív hatóanyag-tartalmának új kémiai reakció alapján történő meghatározását leíró rendkívül nagyszámú közlemény túlnyomó részénél a reakció alkalmazása alig vagy egyáltalában nem jelent előnyt a direkt méréshez viszonyítva.) Amennyiben a saját elnyelésre alapozott módszernél a kiszerelési segédanyagoktól vagy egyéb tényezőtől származó zavaró hatástól kell megszabadulni, erre számos lehetőség van:

a) Az extraktum tisztítása további extrakcióval. A következő két példa az USP XXII-ből származik. Brómfeniramin maleát tabletta esetében [140b] az elporított tablettát rázótölcsérben pH 11-re állított vízzel kezelik, majd a bázist hexánnal extrahálják. A hexános extraktumból híg sósavval történő kirázással lehet eljutni a spektrofotometriás mérés alapjául szolgáló oldathoz, ahol a sósavas só formájába vitt hatóanyagot 264 nm-nél mérik. A másik példa klorokinium-foszfát tabletta vizsgálata. Itt vizes oldás majd szűrés után a szabad bázist ammónium-hidroxidos lúgosítás után kloroformmal extrahálják, majd a kloroformos oldatot híg sósavval visszaextrahálják, végül 343 nm-nél mérik [140c].

b) Oszlopkromatográfiás tisztítás. Karbamazepin tabletta hatóanyag-tartalmának meghatározása során az USP XXI [139] etanol—metanol 95 : 5 elegyével extraháltat, az extraktumot ciklohexános hígítás után centrifugáltatja, majd egy 30 × 1,9 cm-es

szilikagél oszlopon kromatografáltat. Az apoláris frakció elöntése után a metanolos eluátumot spektrofotometráltatja 285 nm-nél.

c) Háttérkorrekciós módszerek alkalmazása. A 4.3. fejezetben leírt valamennyi módszer alkalmazható. Az ott leírt módszerek közül a legegyszerűbbet, a két hullámhosszas módszert még gyógyszerkönyvek is előírják. Amfetamin-szulfát tabletta vizsgálata során pl. nemcsak a mérés alapjául szolgáló gyenge sáv (amfetamin izolált aromás gyűrűjének α-sávja) maximumán, 257 nm-nél mérünk, hanem 280 nm-nél is, ahol amfetamin elnyelése már elhanyagolhatóan csekély. A számolásnál a két abszorbancia különbségéből számolunk mind a tabletta extraktum, mind pedig a párhuzamosan vizsgált standard oldat esetében [140d]. Egy másik példa klórpromazin-hidroklorid meghatározása, ahol a két hullámhossz 254 nm (a fentiazingyűrű spektrumának intenzív maximuma), valamint 277 nm, ahol egy rendkívül meredek szakasz után a spektrum egy csekély elnyeléssel rendelkező minimumot mutat (lásd 3/26. ábra a 109. oldalon) [140e].

d) Derivatív spektroszkópia alkalmazása. Amint azt a 4.6. fejezet számos példája mutatja, a derivatív spektrofotometria kitűnő lehetőséget nyújt a tablettaanalízisben fellépő háttérproblémák megoldására.

Bár — amint ezt már említettük — a gyógyszerkönyvek és gyógyszervizsgálati szabványok az esetek nagyobb részében saját fényelnyelésen alapuló módszert írnak elő tabletták hatóanyag-tartalmának meghatározására, igen nagy a jelentősége a kémiai reakcióra alapozott módszereknek is. Ezekkel az előző és következő fejezetekben részletesen foglalkozunk, itt csak az USP XXII-ből vett néhány jellegzetes példán keresztül mutatjuk be a kémiai reakcióra alapozott módszer alkalmazásának vélhető indokait. Spektrofotometriásan gyengén aktív vegyületek, mint pl. a pusztán izolált fenilcsoportokat tartalmazó benztropin-mezilát [140f] és biperiden-hidroklorid [140g] esetében a bázisok savas típusú festékekkel (brómfenolkék, brómkrezolbíbor) alkotott ionpárjának kloroformos extrakciója (lásd 7.8. fejezet) után 415, ill. 408 nm-nél a származékképzés nélkül az ultraibolya tartományban elérhetőnél sokkal nagyobb érzékenységgel végezhetjük el a meghatározást. Ugyancsak valószínűleg a hatóanyag gyenge spektrofotometriás aktivitása teszi szükségessé színreakció, hidroxil-aminos hidroxámsav-képzésen, majd ennek vas(III)komplexén alapuló mérés (lásd 7.7. fejezet) alkalmazását β-laktám típusú antibiotikumokat tartalmazó tabletták mérésére [140 ll]. Az érzékenységet nem javítja, de a kis hatóanyag-tartalom mellett a viszonylag rövidhullámú maximumban (240 nm) fellépő zavaró hatásokat kiküszöböli noretiszteron, ill. norgesztrel esetében a 3-as ketoncsoporton végrehajtott izonikotinsav-hidrazon-képzés (lásd 7.4. és 10.13. fejezetek), ami az abszorpciós maximumot 380 nm-ig tolja el [140h]. Az etinilösztradiol és mesztranol tabletták esetében alkalmazott kénsavas reagensen alapuló színreakció (7.5. és 10.13. fejezetek) célja mind a mérés érzékenységének, mind pedig szelektivitásának fokozása [140i].

Tablettakombinációk hatóanyagainak egymás melletti meghatározását vagy több hullámhosszas mérés és egyenletrendszerek segítségével végezhetjük el (példát a 4.4. fejezetben írtunk le), vagy az egyes komponensekre szelektív kémiai reakción alapuló módszereket alkalmazunk, az ilyen készítmények analízisét azonban egyre inkább kromatográfiás módszerekkel végzik el.

9.3.2. „Content uniformity" vizsgálatok

Annak ellenőrzésére, hogy egy-egy kiszerelési egység milyen szórással tartalmazza a deklarált hatóanyag-tartalmat, a kötelezően megmérendő parallelek nagy száma miatt különösen alkalmasak az egyszerű, megfelelően érzékeny és könnyen automatizálható spektrofotometriás módszerek. Sok esetben a gyógyszerkönyvek azonos spektrofotometriás módszert írnak elő mind a hatóanyag-tartalom, mind pedig a „content uniformity" meghatározására, a különbség mindössze a bemérések különbözőségéből adódóan a hígítás módjában és mértékében van. Gyakori az olyan eset is, ahol a hatóanyag-tartalom meghatározását nagy szelektivitású kromatográfiás módszerrel végezzük, míg a „content uniformity" meghatározására a szerényebb szelektivitású, de egyszerűbb és gyorsabb spektrofotometriás módszert alkalmazzuk.

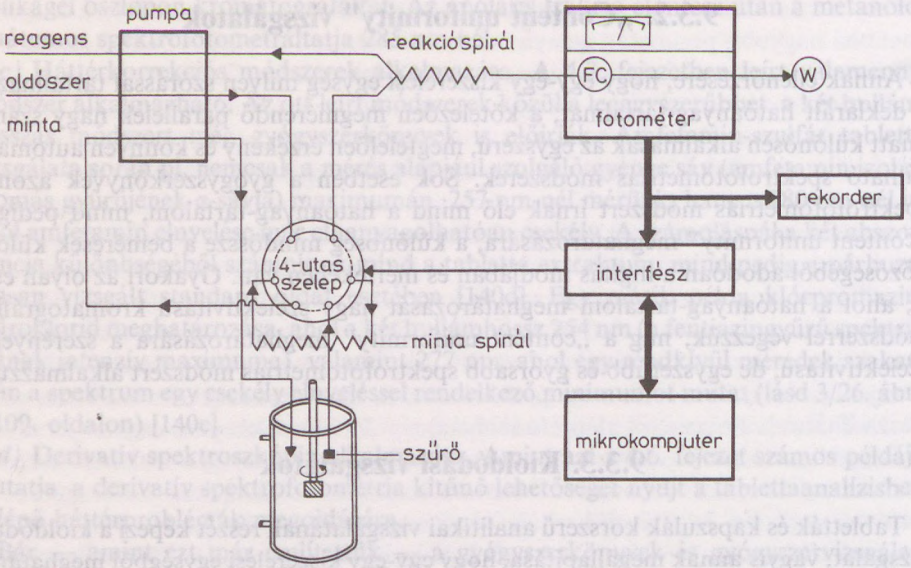
9.3.3. Kioldódási vizsgálatok

Tabletták és kapszulák korszerű analitikai vizsgálatának részét képezi a kioldódási vizsgálat, vagyis annak megállapítása, hogy egy-egy kiszerelési egységből meghatározott idő alatt, meghatározott összetételű és térfogatú oldószerben, meghatározott fordulatszámú kosaras vagy lapátos rendszerű keverő berendezésben [150 jj] kioldódik-e a hatóanyag meghatározott (pl. 70—75%-nyi) mennyisége. Mivel az oldószer általában víz, híg sósav vagy szerves sav, ill. semleges vagy enyhén lúgos foszfátpuffer, nincs akadálya annak, hogy alikvot részek szűrése után a szűrletben spektrofotometriás módszerrel meghatározzák a kioldott anyag koncentrációját. Ennek megfelelően a saját elnyelésen, szükség esetén pedig kémiai reakción alapuló módszerek szerepelnek a leggyakrabban a kioldódási vizsgálatok analitikai ellenőrzésénél.

9.3.4. Kioldódási sebesség meghatározása

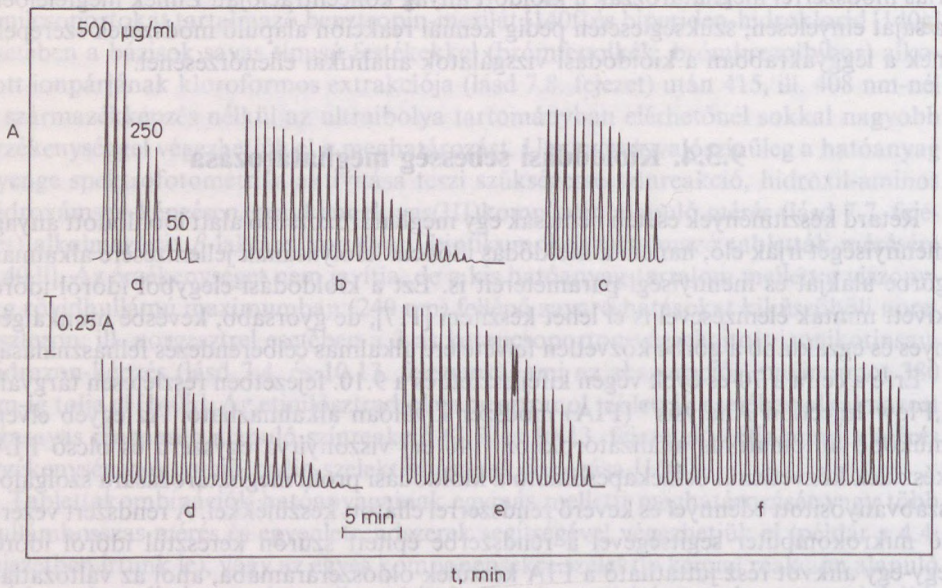
Retard készítmények esetén nemcsak egy meghatározott idő alatt kioldódott anyag mennyiségét írják elő, hanem a kioldódás időbeni lefolyásának jellemzésére alkalmas görbe alakját és mennyiségi paramétereit is. Ezt a kioldódási elegyből időről időre kivett minták elemzésével is el lehet készíteni [117], de gyorsabb, kevésbé munkaigényes és egzaktabb a görbe közvetlen felvételére alkalmas célberendezés felhasználása.

Erre a célra a 70-es évek végén kifejlesztett és a 9.10. fejezetben részletesen tárgyalt „Flow Injection Analysis" (FIA) módszer kiválóan alkalmazható. Az egyéb elven működő automatikus analizátorokhoz [140 ee] viszonyítva egyszerű és olcsó FIA készülék közvetlenül összekapcsolható a kioldódási profil meghatározására szolgáló, szabványosított edénnyel és keverő rendszerrel ellátott készülékkel. A rendszert vezérlő mikrokomputer segítségével a rendszerbe épített szűrőn keresztül időről időre egy-egy alikvot rész juttatható a FIA készülék oldószeráramába, ahol az változatlanul vagy megfelelő kémiai reagensekkel való elegyítés és a reakció lefolyását biztosító reakciókspirálon való áthaladás után jut a koncentráció mérésére alkalmas jelet létrehozó detektorba, ami az esetek túlnyomó részében ultraibolya-látható spektrofoto-



9/2. ábra. Automata FIA rendszerrel összekötött tabletta hatóanyag kioldódás vizsgáló berendezés

(M. A. Koupparis, P. Macheras, C. Reppas, Int. J. Pharm. **20,** 325 (1984) [86])



9/3. ábra. Acetaminofen tartalmú tabletták FIA módszerrel meghatározott kioldódási profiljai.

a görbe: kalibráció; *b* görbe: Distalgesic^R; *c* görbe: Lonarid^R; *d* görbe: Norgesic^R; *e* görbe: Panatol^R; *f* görbe: Depon^R. (M. A. Koupparis, P. Macheras. C. Tsaprounis, Int. J. Pharm. **27,** 349 (1985) [87])

méter. A FIA módszer gyorsasága és nagyfokú rugalmassága lehetővé teszi az akár percenkénti mintavételt is, s így még gyors kioldódási folyamatok regisztrálása is végrehajtható. Ezen a területen különösen KOUPPARIS és munkatársai tevékenysége emelhető ki, akik egy sor tablettakészítmény kioldódási profilját határozták meg [7, 83—88, 99]. A 9/2. ábrán az ő egyik közleményükből vett sémán ábrázoljuk a kioldódási rendszer összekapcsolását a FIA készülékkel, a 9/3. ábrán pedig öt különböző gyártó által előállított acetaminofen tablettának a bemutatott rendszerben felvett kioldódási profilját mutatjuk be [85].

9.4. Kúpok

Kúpok hatóanyag-tartalmának meghatározásánál az ultraibolya-látható spektrofotometria az előző fejezetben a tabletták és kapszulák vizsgálatánál leírtakhoz hasonlóan meghatározó szerepet tölt be. A leglényegesebb különbség természetesen a hatóanyag extrakciójában és az extraktumnak a spektrofotometriás mérésre való előkészítésében vannak.

Az analízis több kúp homogenizálásával kezdődik, amit üvegbottal való szétnyomkodással, önmagában vagy oldószer jelenlétében történő melegítéssel hajtanak végre. A felhasznált oldószerek közül, amelyek elsődleges feladata a kúpkészítés segédanyagainak oldatba vitele, a dietil-éternek van a legnagyobb jelentősége, de erre a célra kloroformot is gyakran alkalmaznak. Ez utóbbit azokban az esetekben, amikor az a meghatározandó anyagnak is jó oldószere, és a meghatározás alapjául szolgáló sáv 240 nm felett van, közvetlenül fel lehet használni a spektrofotometriás mérésre is. Így pl. acetil-szalicilsavat tartalmazó kúp hatóanyag-tartalmát a kloroformos oldat oszlopkromatográfiás tisztítása után (elúció az oszlopról 1% ecetsavat tartalmazó kloroformmal) 280 nm-nél meg lehet határozni [140j]. Tipikusabbak azok a megoldások, ahol az éteres (vagy kloroformos) elegyből híg vizes savval kirázzuk a bázis vagy só típusú hatóanyagot. A vizes fázisban a spektrofotometriás meghatározás közvetlenül elvégezhető, mint pl. Biszakodil kúp esetében 263 nm-nél [140k], klórpromazin [140l] és proklórperazin [140m] esetében pedig a fentiazinszármazékok tablettás kiszerelési formáinak spektrofotometriás analízise kapcsán a 9.3. fejezetben már említett háttérkorrekciós módszerrel (mérés 254 és 277 nm-nél, számolás az abszorbanciák különbségéből) stb. A spektrofotometriás méréshez szükséges tisztítás hatásfoka növelhető, ha újabb extrakciót iktatunk be és/vagy azt kromatográfiás elválasztással kombináljuk. Így pl. ergotamin-tartarátot és koffeint tartalmazó kúp esetében [139c] az éteres diszpergálás után vizes borkősavas extrakció, az extraktum semlegesítése után kloroformos extrakció, végül a kloroformos extraktum oszlopkromatográfiás elválasztása után a koffein közvetlen spektrofotometriával, az ergotamin-tartarát pedig a van Urk-módszerrel, színes származéka formájában (lásd 7.5. és 10.6. fejezet) mérhető.

9.5. Injekciók, szolúciók és egyéb folyékony gyógyszerformák

A folyékony gyógyszerformák hatóanyag-tartalmának meghatározásában a spektrofotometria ugyanolyan nagy szerepet tölt be, mint az eddig tárgyalt gyógyszerformák esetében. A feladat megoldásának nehézségi foka az egyes gyógyszerformákban alkalmazott, a közvetlen spektrofotometriás mérést esetenként erősen zavaró oldószerek és segédanyagok függvénye.

A legegyszerűbb feladatot természetesen az ampullánként egyetlen terápiás dózist tartalmazó, vizes oldatban kiszerelt injekciók analízise jelenti, ahol nem kell számolni a későbbiekben tárgyalandó segédanyagok és oldószerek zavaró hatásaival. Megfelelő spektrofotometriás aktivitással rendelkező hatóanyagot tartalmazó injekciók esetében az injekció egyszerű hígítása után a spektrofotometriás mérés minden további nélkül elvégezhető. A mindennapos gyakorlatban alkalmazott számtalan ilyen módszer közül megemlítjük az USP XXII által előírt módszert B_{12}-vitamin injekció meghatározására vizes hígítás és 361 nm-nél végzett mérés alapján [140n]. A nem pH-függő spektrumú kolchicin meghatározását injekciós készítményből ugyancsak egyszerű vizes hígítás után végzik el 350 nm-nél [139d], míg a klorokin mérését 343 nm-nél 0,01 N sósavas közegben írják elő [140o]. Ha valamely okból szükség van a mérés szelektivitásának növelésére (elválasztás segédanyagtól, szennyezéstől, bomlásterméktől), itt is alkalmaznak extrakciós tisztítási eljárásokat, mint pl. klórfeniramin-maleát injekció esetében: a megsavanyított vizes oldatból először éterrel kirázzuk a nem bázikus komponenseket, majd lúgosítás után a bázist rázzuk át éterbe, ahonnan híg kénsavba visszarázva juthatunk el a 264 nm-nél spektrofotometriásan mért oldathoz [140p].

Akárcsak a tabletták esetén, itt is alkalmaznak legkülönbözőbb kémiai reakciókra alapozott módszereket is a hatóanyag-tartalom meghatározására elsősorban a szakirodalomban közölt hatalmas számú vizsgálati leírásban, de a gyógyszerkönyvek is tartalmaznak sok ilyen leírást. A kémiai reakció alkalmazásának indokai részben a mérés érzékenységének, részben pedig a szelektivitásának növelése lehetnek. Példaként a tablettáknál említetteken túlmenően az anileridin injekciót említjük meg, ahol a primer aromás amin hatóanyag meghatározását diazotálás és *N*-(1-naftil)-etilén-diaminnal való kapcsolás után [140r], ill. natív és hidrált ergot alkaloidokat tartalmazó készítményeket, ahol van Urk-reakció után (oxidáció vas-kloriddal, kapcsolás *p*-dimetil-amino-benzaldehiddel) végzik el a spektrofotometriás mérést [140s].

Olyan oldatos gyógyszerformák spektrofotometriás vizsgálata esetében, amelyek konzerválószereket vagy antioxidánsokat tartalmaznak, figyelembe kell venni, hogy ezek nagy része mint pl. a *p*-hidroxi-benzoesav-észterek, benzoesav és sói, benzil-alkohol, benzalkonium-klorid, cetil-piridinium-bromid, fenol, krezol, di-tercier-butil-*p*-krezol, fenil-etil-alkohol, tiomersal, fenil-merkuri-nitrát, szorbinsav, aszkorbinsav, aszkorbil-palmitát stb. spektrofotometriásan aktív anyagok. Ezek az esetek nagy részében lehetetlenné teszik a saját elnyelésen alapuló spektrofotometriás meghatározás közvetlen alkalmazását a 300 nm alatti spektrumtartományban. Amint azt a 4.6.

és 8. fejezetekben számos példa kapcsán bemutattuk, a differencia- és derivatív spektroszkópia sok esetben lehetőséget nyújt problematikus összetételű oldatos gyógyszerkészítmények hatóanyag-tartalmának saját fényelnyelés alapján történő meghatározására. A differencia-spektrofotometriának ilyen feladatokra való alkalmazásával kapcsolatban a 8.4. fejezet 8/7. ábrájára utalunk, ahol Limovanil injekció progeszterontartalmának meghatározása során a többi között benzil-alkohol zavaró hatását is sikerült kiejteni a nátrium-bór-hidrides módszer alkalmazásával [47]. A derivatív spektrofotometria alkalmazási lehetőségeinek bemutatását a 4/15. és 4/16. ábrán keresztül végezzük el (lásd 157. oldal). Ezeken látható, hogy Zixoryn emulziós oldatban elsősorban a nátrium-benzoát konzerválószer miatt a gyenge spektrofotometriás aktivitású flumecinol hatóanyag közvetlen meghatározása nem végezhető el. A második derivált módszerrel azonban a nátrium-benzoát széles sávja eliminálható, és a meghatározás elvégezhető [48]. További lehetőségeket jelent ilyen típusú feladatok megoldására a már több példa kapcsán említett szelektív extrakció, a mérést megelőző kromatográfiás elválasztás vagy megfelelően szelektív kémiai reakció segítségével a meghatározandó komponens spektrumának a hosszúhullámú tartományba való eltolása, ahol a meghatározás már zavartalanul elvégezhető.

Hasonló jellegű problémák vetődnek fel olajos injekciók vagy más, olajat vagy olaj jellegű anyagot tartalmazó folyékony gyógyszerformák vizsgálata esetén is. Ilyen esetekben maga az oldószer is zavarja a 300 nm alatti közvetlen spektrofotometriás mérést, sőt egyes kémiai reakcióra alapozott színreakciók alkalmazását is (másokét — amint ezt példával illusztráljuk — nem). Ezért ilyen készítmények vizsgálatánál általában extrakciót hajtunk végre. Ennek legegyszerűbb formája pl. napraforgóolaj bázisú injekciók esetében a metanolos extrakció. Az injekció metanolos extraktumának lúgos közegben 300 nm-nél való direkt mérése segítségével a fenolát formába vitt ösztradiol-17-valerát olajos injekció hatóanyag-tartalmának meghatározása elvégezhető [139e]. Ennél általánosabb megoldás azonban megfelelő kémiai reakció alkalmazása. Dezoxikortikoszteron-acetát olajos injekció hatóanyag-tartalmának a bomlásspecifikus tetrazóliumkékes színreakció alapján való meghatározása során (lásd 7.5. és 10.13. fejezet) még szükség van a hatóanyag előzetes extrakciójára izooktán—etanolos megoszlás alapján [140t], menadion injekció esetében azonban az olajos oldat éter—alkohol 1 : 1 elegyével való hígítása után alkalmas a 2,4-dinitro-fenilhidrazinos színreakció és ammóniás lúgosítás után 635 nm-nél a spektrofotometriás mérés végrehajtására [140u]. Hasonlóképpen, az olajos oldat kloroformos hígítása után lehet 4-én-3-ketoszteroidokat pl. nandrolon-dekanoátot [140v] meghatározni az izonikotinsavas reakció után 380 nm-nél (lásd 7.4. és 10.13. fejezet).

9.6. Kenőcsök és krémek

Bár a különböző gyógyszerformák hatóanyag-tartalmának meghatározása közül kenőcsök és krémek vizsgálata során merül fel a legtöbb probléma, ezek elsősorban a minta előkészítésével kapcsolatosak és általában nem gátolják a spektrofotometria alkalmazását, ami ezen a területen is a leggyakrabban használt módszerek közé

tartozik. A spektrofotometria alkalmazási lehetőségeit illetően tehát a helyzet nem különbözik alapvetően az eddig tárgyalt gyógyszerformáknál leírtaktól. Ennek megfelelően a tárgyalást itt is elsősorban az USP XXII-ből vett példákkal illusztráljuk, mellőzve a terület rendkívül terjedelmes szakirodalmát. Megjegyezzük azonban, hogy a terület problematikájával két kitűnő összefoglaló közlemény foglalkozik [144, 145].

A kenőcsök és krémek gyártásánál felhasznált segédanyagok túlnyomó többsége mint pl. propilénglikol, glicerin, szorbit, paraffinok, zsíralkoholok, ezek éterei és észterei, az alkil-szulfátok és kvaterner ammóniumsók zöme spektrofotometriásan inaktív anyagnak tekinthető. Így megfelelő mintaelőkészítés után, megfelelő spektrofotometriás aktivitású és megfelelően magas koncentrációban alkalmazott hatóanyag meghatározása akár saját fényelnyelése alapján is elvégezhető, ha a mérési hullámhossz 235—240 nm felett van. Az itt széles körben alkalmazott konzerválószerek és antioxidánsok azonban ugyanolyan problémákat okoznak, mint azt a 9.5. fejezetben már leírtuk.

Az a tablettáknál és injekcióknál viszonylag gyakran alkalmazható megoldás, hogy a készítmény hígítása vagy egyszerű oldószeres extrakciója után közvetlenül mérhetjük a meghatározás alapjául szolgáló abszorbanciát, itt viszonylag ritkábban alkalmazható. Ezt a megoldást alkalmazták három hosszúhullámú abszorpciós sávval rendelkező készítmény esetén: hidrokinon krém hatóanyag-tartalmát metanolos triturálás és szűrés után 293 nm-nél [140w], nitrofurazon krémet kloroformos kezelés, majd dimetil-formamidos oldás után 385 nm-nél [140z], végül pedig genciánibolya krémet híg sósavas diszpergálás és szűrés után 435 nm-nél [140x] lehet meghatározni.

Tipikusabbak azok az esetek, ahol a spektrofotometriás mérés előtt a hatóanyagot el kell választani a mérést zavaró segédanyagoktól. A 9.3—9.5. fejezetekben már leírt folyadék—folyadék extrakciós eljárásokat itt még szélesebb körben alkalmazzák. Az éteres extrakció, majd a hatóanyagbázis ezt követő kirázása híg savval, lúgosítás után visszarázás éterbe, végül újabb vizes—savas kirázás és spektrofotometriás mérés képezi az alapját tetrakain kenőcs mérésének 310 nm-nél [140y]. Egyszerűbb esetekben elegendő a víz—kloroformos vagy víz—híg sósavas extrakció is ahhoz, hogy a vízoldékony hatóanyag mellől eltávolítsuk az apoláris segédanyagokat, mint pl. mafenide acetát [140 aa] és az acrisorcin krémek [140 bb] esetében (mérés 267, ill. 400 nm-nél). Kortikoszteroid krémek speciális megosztó folyadékpárja a például metilprednizolon-acetát [140 cc] és flumetazon-pivalát [42] esetében alkalmazott acetonitril-hexán, ill. acetonitril-izooktán, ahol az acetonitriles fázist használják fel a hatóanyag kémiai reakció utáni mérésére.

Az extraktum spektrofotometriás mérés előtti oszlopkromatográfiás tisztításának kenőcsök és krémek esetében nagyobb jelentősége van, mint más gyógyszerformáknál. Ezt a megoldást alkalmazzák egyebek között idoxuridine kenőcs [140 ee] és nitrofurazon kenőcs [140 ff] vizsgálatára, valamint benzoesav—szalicilsav kombináció hatóanyagainak a segédanyagoktól és egymástól való elválasztására a 275, ill. 311 nm-nél végzett mérés előtt [140 gg].

Természetesen kenőcsök és krémek vizsgálatánál is tág tér nyílik kémiai reakciókra alapozott spektrofotometriás módszerek alkalmazásának. Dexametazon foszfát szemkenőcs [139f] esetében ez a reakció még csupán a foszfát-észter-csoport enzimatikus hidrolízise, ami lehetővé teszi a felszabaduló dexametazon extrakcióját diklór-

metánnal és mérést 236 nm-nél, az esetek többségében azonban a meghatározandó anyag spektrumát a látható tartományba eltoló reakciókat alkalmazunk. Ilyen pl. clocortolone pivalat meghatározása krém készítményből az izonikotinsav-hidrazidos reakció (7.4. és 10.13. fejezet) forró metanolos extrakció utáni alkalmazásával [140 hh]. A szteroid krémek közül figyelmet érdemel még estropipate készítmény vizsgálata. Itt a savanyú kénsav-észter-só típusú hatóanyag extrakciója során kloroform és vizes piperazin közti megosztást végeznek. A vizes fázisba került kénsav-észtert sósavas savanyítás után hidrolizálják, a felszabaduló ösztront kloroformba rázzák át, majd a kloroform bepárolása után 90 tf%-os kénsavval mint reagenssel kezelve (lásd 10.13. fejezet) 450 nm-nél mérhető színes termékké alakítják át [139g]. A nemszteroid termékek közül megemlítjük szulfizoxazol-diolamin kenőcsöt, amelynek hatóanyagát heptán—vizes lúgos kirázás és a vizes fázis átsavanyítása után diazotálás és *N*-(1-naftil)-etilén-diaminnal való kapcsolás után 540 nm-nél lehet meghatározni [140ü].

Végül megjegyezzük, hogy a spektrofotometriás módszer viszonylag szerény érzékenysége és szelektivitása miatt csak igen nagy nehézségek árán alkalmazható kis hatóanyag-tartalmú készítményekre (egyes, elsősorban fluorozott kortikoszteroidokat 0,01% körüli koncentrációban alkalmazzák kenőcskészítményekben!). Ezek, valamint a nagyszámú kombinációs kenőcskészítmény analízisét a korszerű gyógyszer-analitikában elsősorban nagynyomású folyadékkromatográfiás módszerrel végzik.

9.7. Stabilitási vizsgálatok

Gyógyszerkészítmények stabilitásvizsgálatára a korszerű gyógyszer-analitikában szinte kizárólag vagy közvetlen kvantitatív kromatográfiás módszereket (gázkromatográfia, HPLC és vékonyréteg-denzitometria), vagy a bomlatlan gyógyszer és bomlástermékeinek vékonyréteg-kromatográfiás, ill. oszlopkromatográfiás elválasztása utáni spektrofotometriás módszert alkalmaznak. Ezeknek a módszereknek kétségtelen előnye az, hogy elvégezhető a bomlatlan gyógyszer és a bomlástermék(ek) egyidejű meghatározása, és lehetőség nyílik bonyolultabb (több lépéses vagy nem egyirányú) bomlási folyamatok tanulmányozására is. Egyszerűbb, egyértelmű bomlási folyamatok ellenőrzésére azonban sok esetben egyszerű és megfelelő eredményeket szolgáltató módszer a spektrofotometria is, feltéve, hogy a bomlási folyamat kvantitatív mérés alapjául szolgáló spektrumváltozással jár vagy megfelelően szelektív reakció után spektrofotometriásan különbséget lehet tenni a bomlatlan anyag és a bomlástermék között. Ennek lehetőségeit néhány gyakorlati példa bemutatásával illusztráljuk.

Azt a viszonylag ritka esetet, amikor a bomlatlan gyógyszer és a bomlástermék spektrumai megfelelően különböznek ahhoz, hogy stabilitásvizsgálati módszert lehessen erre a különbségre alapozni prazepam (diazepam ciklopropil-metil analógja) példáján mutatjuk be [25]. Amint azt a 7.5. fejezet (7/21) reakcióegyenletén bemutattuk, benzdiazepin-származékok hidrolitikus bomlási reakciója a 2-amino-benzofenon-származékra és glicinre való hasadás. A 9/1. táblázatban bemutatjuk a bomlatlan gyógyszer, ill. a bomlástermék, 2-ciklopropil-metil-amino-5-klór-benzofenon spektrumadatait. Látható, hogy a bomlás jól követhető mind a bomlástermék 408 nm-nél

9/1. táblázat. Prazepam és bomlásterméke spektrumadatai [25]

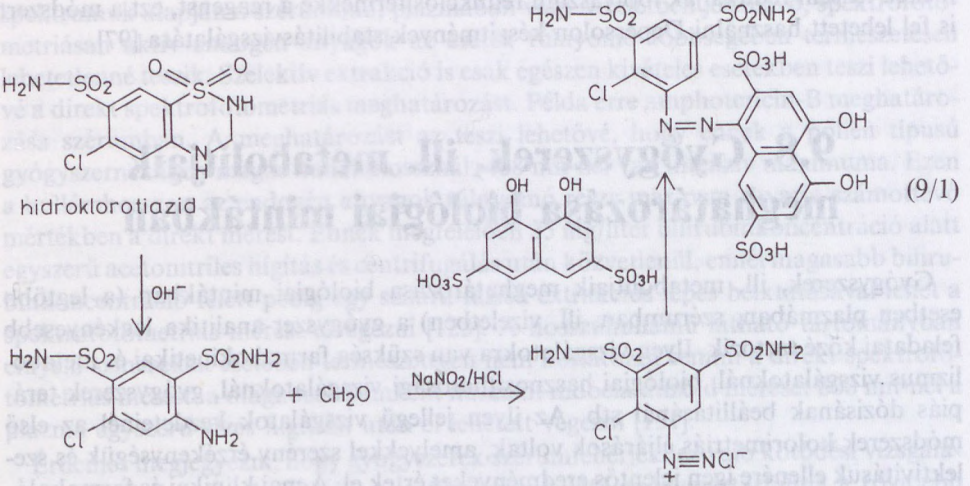
	Metanol		3 tf %-os kénsavas metanol	
	λ_{max}, nm	ε	λ_{max}, nm	ε
Prazepam	227	33 350	241	31 200
	313	2 160	285	16 300
			365	3 800
2-ciklopropil-metil-amino-5-klór-benzofenon	235	24 800	257	12 700
	365	2 700	365	170
	408	7 100		

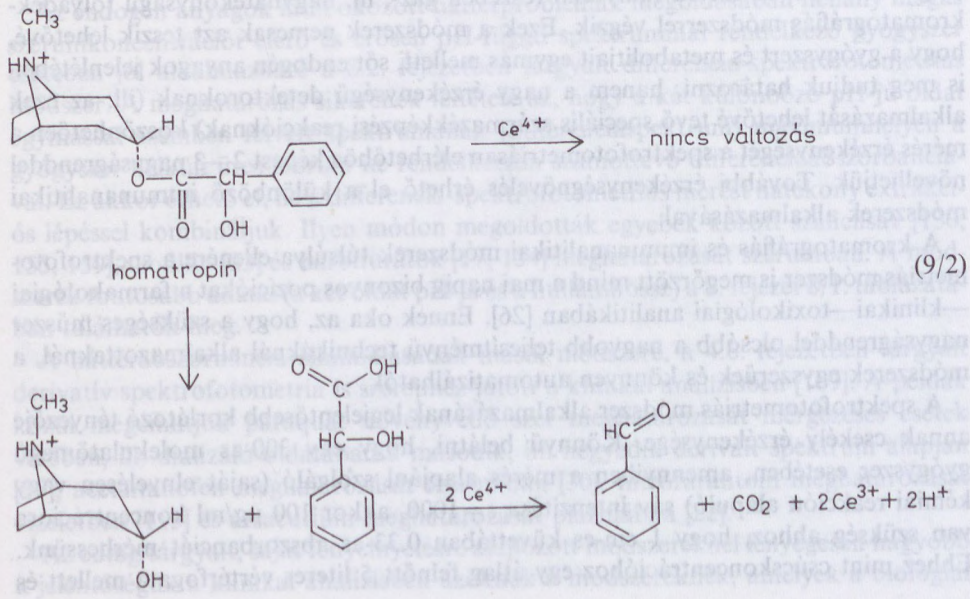
mért abszorpciós maximuma, mind pedig a bomlatlan anyagnak savas metanolban 365 nm-nél mért maximuma alapján. A bomlástermék aminocsoportjának az erősen savas közegben bekövetkező protonálódása miatt ui. hosszúhullámú $n-\pi^*$ sávja eltűnik, és a 365 nm-es abszorbancia gyakorlatilag szelektíven a bomlatlan anyagot méri.

Egy másik érdekes példa nitroprusszid-nátrium fotokémiai bomlásának spektrofotometriás követése [40]. A $[Fe(CN)_5NO]^{2-}$ anionnak a bomlás során bekövetkező redukcióval együtt járó hidratálása $[Fe(CN)_5H_2O]^{3-}$ anionná a kiindulási anyag igen csekély intenzitású, de jellemző spektrumának jelentős megváltozását eredményezi. Ennek során a 498 nm-nél megjelenő váll intenzitása ($\varepsilon = 7{,}4$) nem változik, míg a 394 nm-es maximum ($\varepsilon = 20{,}4$) jelentősen megnő. Ennek alapján a stabilitási vizsgálat elvégezhető volt.

A gyakorlatban ilyen szelektív mérést lehetővé tevő spektrumváltozások ritkán fordulnak elő gyógyszerek bomlási folyamatai során. A korszerű kiértékelési lehetőségek azonban módot nyújthatnak a bomlatlan anyag vagy a bomlástermék szelektív meghatározására olyan esetekben is, amikor ezek spektrumai nem különböznek egymástól olyan mértékben, ami szükséges lenne ahhoz, hogy valamelyiküket szelektíven mérhessük. Az ortogonális polinom módszer (4.3. fejezet) pl. lehetővé teszi kloramfenikol meghatározását azo-benzol típusú lúgos bomlásterméke mellett, s így alkalmas volt ennek a bomlásnak kinetikai tanulmányozására [2]. A derivatív spektrofotometria (4.6. fejezet) is számos feladat megoldását teszi lehetővé. Így pl. az első derivált spektrum alapján szelektíven mérhető volt savas bomlástermékei jelenlétében a pirenzepin [151]. Acetaminofen és fenacetin meghatározását tabletta és szirup készítményekben bomlástermékeik jelenlétében a második derivált módszer segítségével oldották meg [80]. Acetil-szalicilsav kúpok vizsgálata során a második derivált módszer segítségével minden előzetes elválasztás nélkül lehetséges volt mind a bomlatlan anyag, mind pedig a bomlástermék szalicilsav szelektív mérése [78]. A második és harmadik derivált módszer kombinálása alapján fenilbutazon négy különféle bomlásterméke határozható meg a bomlatlan anyag és egymás jelenlétében [114]. A derivatív spektroszkópia még olyan bonyolult molekulák esetében is eredményes volt a stabilitási vizsgálatokban, mint a nisztatin [28]. Ennek spektrumában ui. éppen az a tetraén részlet adja a hosszúhullámú sávrendszert 290 és 320 nm között, ami az oxidatív bomlás során károsodik. Az oxidáció után ebben a tartományban jelentkező maradék-abszorbancia hatása a derivatív spektroszkópiás módszerrel eliminálható, s így ez a módszer itt is alkalmas stabilitási vizsgálatokra.

Gyakran megfelelően szelektív reakciók alkalmazása is elősegítheti a bomlástermék szelektív meghatározására alkalmas spektrofotometriás módszer kidolgozását [24]. A számos ilyen módszer közül mint tipikus példákat megemlítjük pl. hidroklorotiazid hidrolízisének (9/1 reakcióséma) követését a keletkező bomlástermék (4-amino-6-klór-1,3-diszulfonamid) primer aromás aminocsoportjának diazotálás után kromotrópsavval való kapcsolása után [116], valamint mandulasav-észterek (pl. homatropin stb.) hidrolízise során keletkező szabad mandulasav meghatározását cerium(IV)es oxidáció után (9/2 reakcióséma) az erős spektrofotometriás aktivitású benzaldehid alakjában [23].





Az eddig tárgyalt, hidrolitikus bomlásokra specifikus módszereken túlmenően számos módszer ismeretes oxidatív bomlásokkal szemben specifikus módszerekre is a spektrofotometriás gyógyszerstabilitás-vizsgálatban. Kortikoszteroidok tetrazóliumos módszere (7.5. és 10.13. fejezetek) pl. szelektíven az oxidálatlan kortikoszteroidot méri; a 21-es helyzetben oxidálódott vagy intramolekuláris oxidoredukciót szenvedett molekulák ui. nem redukálják színes formazánokká a tetrazólium reagenseket. Így ez a módszer kiválóan alkalmas stabilitási vizsgálatok kiértékelésére [27, 66].

Hasonló elvek alapján lehetett a 21-amino-kortikoszteroid típusú mazipredon meghatározását elvégezni *o*-dinitro-benzolos színreakció alapján. Mivel a bomlástermékek itt sem redukálják ibolyaszínű redukciós termékké a reagenst, ezt a módszert is fel lehetett használni Depersolon készítmények stabilitásvizsgálatára [97].

9.8. Gyógyszerek, ill. metabolitjaik meghatározása biológiai mintákban

Gyógyszerek, ill. metabolitjaik meghatározása biológiai mintákban (a legtöbb esetben plazmában, szérumban, ill. vizeletben) a gyógyszer-analitika legkényesebb feladatai közé tartozik. Ilyen vizsgálatokra van szükség farmakokinetikai és metabolizmus vizsgálatoknál, biológiai hasznosíthatósági vizsgálatoknál, gyógyszerek terápiás dózisának beállításánál stb. Az ilyen jellegű vizsgálatok kezdeteinél az első módszerek kolorimetriás eljárások voltak, amelyekkel szerény érzékenységük és szelektivitásuk ellenére igen jelentős eredményeket értek el. A mai klinikai és farmakológiai analitikai gyakorlatban gyógyszerek és metabolitjaik biológiai mintákban való meghatározását az esetek túlnyomó részében gáz-, ill. nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszerrel végzik. Ezek a módszerek nemcsak azt teszik lehetővé, hogy a gyógyszert és metabolitjait egymás mellett, sőt endogén anyagok jelenlétében is meg tudjuk határozni, hanem a nagy érzékenységű detektoroknak (ill. az ezek alkalmazását lehetővé tevő speciális származékképzési reakcióknak) köszönhetően a mérés érzékenységét a spektrofotometriásan elérhetőhöz képest 2—3 nagyságrenddel növelhetjük. További érzékenységnövelés érhető el a különböző immunanalitikai módszerek alkalmazásával.

A kromatográfiás és immunanalitikai módszerek túlsúlya ellenére a spektrofotometriás módszer is megőrzött mind a mai napig bizonyos pozíciókat a farmakológiai —klinikai—toxikológiai analitikában [26]. Ennek oka az, hogy a szükséges műszer nagyságrenddel olcsóbb a nagyobb teljesítményű technikáknál alkalmazottaknál, a módszerek egyszerűek és könnyen automatizálhatók.

A spektrofotometriás módszer alkalmazásának legjelentősebb korlátozó tényezője annak csekély érzékenysége. Könnyű belátni, hogy egy 300-as molekulatömegű gyógyszer esetében, amennyiben a mérés alapjául szolgáló (saját elnyelésen vagy kémiai reakción alapuló) sáv intenzitása $\varepsilon = 1000$, akkor 100 μg/ml koncentrációra van szükség ahhoz, hogy 1 cm-es küvettában 0,33-as abszorbanciát mérhessünk. Ehhez mint csúcskoncentrációhoz egy átlag felnőtt 5 literes vértérfogata mellett és

ideális 100%-os felszívódást feltételezve, a gyógyszer 500 mg-os egyszeri dózisára lenne szükség. Ilyen intenzitású sávok (amelyek számos egyéb gyógyszer-analitikai feladat megoldását lehetővé teszik) itt nem használhatók. $\varepsilon = 10\,000$ esetén ez a dózis 50 mg-ra csökken, ami már alkalmassá teheti a módszert bizonyos feladatok megoldására. Mivel 20—30 000-nél magasabb moláris abszorpciós koefficiensek csak igen ritkán fordulnak elő a gyógyszer-analitikában, a kb. 20 mg-os egyszeri dózist még ideális esetben is hozzávetőlegesen a spektrofotometriásan mérhető plazmakoncentrációt biztosító dózis alsó határának tekinthetjük.

A meghatározandó anyag közvetlen spektrofotometriás mérését saját ultraibolya spektrumuk alapján a szérumban, plazmában vagy vizeletben jelenlevő, spektrofotometriásan aktív endogén anyagok az esetek túlnyomó többségében természetesen lehetetlenné teszik. Szelektív extrakció is csak egészen kivételes esetekben teszi lehetővé a direkt spektrofotometriás meghatározást. Példa erre amphotericin-B meghatározása szérumban. A meghatározást az teszi lehetővé, hogy ennek a polién típusú gyógyszernek igen magas hullámhossznál, 408 nm-nél van intenzív maximuma. Ezen a hullámhosszon az endogén anyagok túlnyomó része már nem zavarja számottevő mértékben a direkt mérést. Ennek megfelelően 25 mg/liter bilirubinkoncentráció alatt egyszerű acetonitriles hígítás és centrifugálás után közvetlenül, ennél magasabb bilirubinkoncentráció felett pedig egy szilárd fázisú extrakciós lépés beiktatásával lehet a spektrofotometriás mérést elvégezni [123]. A hosszúhullámú látható tartományban elnyelő színezékek esetében természetesen nem korlátozza semmi a direkt spektrofotometriás mérést: a diagnosztikumként használt indocianinzöld mérését 800 nm-nél a plazma egyszerű vizes hígítása után el lehetett végezni [131].

Érdemes megjegyezni, hogy gyógyszerek szérumfehérjékhez való kötődési vizsgálatai során dializátumok [93], ill. ultrafiltrátumok [46] gyógyszertartalma a rövidebb hullámú ultraibolya tartományban is meghatározhatónak bizonyult.

Az endogén anyagok által okozott háttérproblémák megoldásában néhány magas szérumkoncentrációt elérő és erősen pH-függő spektrummal rendelkező gyógyszer esetében jól alkalmazható a 8.2. fejezetben tárgyalt differencia-spektrofotometriás módszer. A meghatározás sikerének feltétele az, hogy a két különböző pH-jú oldat egymással szemben felvett spektrumának (differenciaspektrum) maximumhelyén a gyógyszer nélküli üres szérum ne rendelkezzen számottevő differenciaabszorbanciával. Ez akkor érhető el, ha a differencia-spektrofotometriás mérést hatékony extrakciós lépéssel kombináljuk. Ilyen módon megoldották egyebek között szalicilsav [130, 155, 159], teofillin [53] és barbiturátok [17, 154] meghatározását szérumban. A módszerek fontosabb adatai (a két oldat pH-ja és a hullámhossz) a 8. fejezet 8/1. táblázatában találhatók meg.

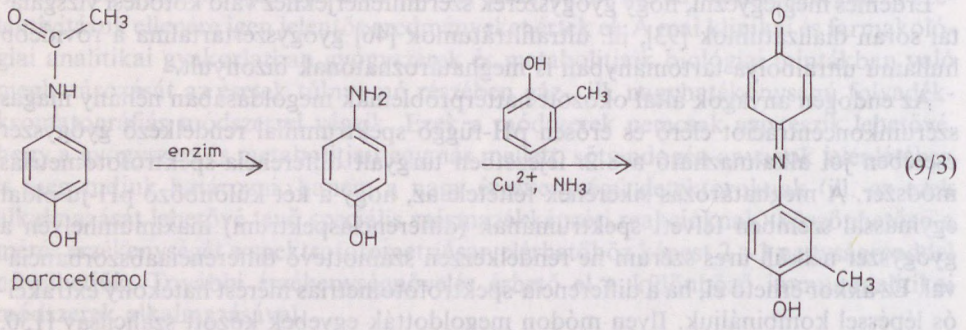
A háttérabszorbancia eliminálásának másik módszere, a 4.6. fejezetben tárgyalt derivatív spektrofotometria is szerephez jutott a klinikai analízisben [109]. A példák közül megemlítjük paraquat növényvédő szer meghatározását mérgezéses esetek vérében, ill. dializáló oldatában a második, ill. negyedik derivált spektrum alapján [35], acetaminofen meghatározását szérumban [30], nitrofurantoin meghatározását vizeletben [113] és atracurium meghatározását plazmában [22].

Az eddig tárgyalt, saját fényelnyelésre alapozott módszereknél lényegesen nagyobb a jelentőségük a klinikai analízisben azoknak a módszereknek, amelyek a biológiai

háttér zavaró hatását úgy küszöbölik ki, hogy a meghatározandó komponens spektrumát egy alkalmasan megválasztott, lehetőleg szelektív reakció segítségével eltolják a látható spektrumtartományba. Ilyen módszereket a legáltalánosabban acetaminofen (paracetamol) és szalicilsav szérumszintjének meghatározásánál használnak.

Az acetaminofen szérumszintjének meghatározására szolgáló számos módszer közül a legelterjedtebbek a vegyület salétromossavas nitrálásán és a keletkező *o*-nitrofenol típusú 2-nitro-4-acetamino-fenol lúgos közegben való mérésén alapulnak, ahol a fenolát alakban levő származék 430 nm-nél mérhető [45, 153]. Szalicilát és más zavaró komponensek hatása szelektív extrakcióval csökkenthető [9]. Egy másik, széles körben alkalmazott elv acetaminofen biológiai mintákban való mérésére a fenol típusú anyag redukáló sajátságain alapul. Foszfomolibdén-volfrámsavat (Folin—Ciocalteu-reagens) [54, 132], ill. vas(III)-2,4,6-tripiridil-s-triazint [95] használva reagensként, a reagensek színes redukált alakjára lehet visszavezetni a módszert. Az eddig felsorolt módszereken alapuló, rutin klinikai analitikai „kit"-ek vannak kereskedelmi forgalomban. Érdekesek és fontosak azok a tanulmányok, amelyek ezeket a módszereket hasonlítják össze pontosság és különböző zavaró hatások (elsősorban szalicilsav zavaró hatása) szempontjából [68].

További reagensek acetaminofen szérumszintjének meghatározására: 2-nitrozo-1-naftol-4-szulfonsav [122], valamint perjódsav—2,5-dimetil-fenol [94]. Kitűnő érzékenység és szelektivitás volt elérhető azzal az enzimatikus módszerrel, amelynek (9/3) reakciósémáját a következőkben mutatjuk be. Az enzimatikus hidrolízis után *o*-krezollal végrehajtott oxidatív kapcsolás eredményeként keletkező indofenol 615 nm-nél mérhető [31].



(9/3)

Szérum szalicilsav szint meghatározására a legelterjedtebb módszer a vas(III)-ionnal képzett ibolyaszínű komplex mérésére alapul. Ezt a klasszikus módszert TRINDER [141] alkalmazta biológiai mintákra; a számos ezt követő módszer [34, 92] elsősorban a minta előkészítésében különbözik az eredetitől. A módszernek számos automatizált változata is használatos, amelyek közül a centrifugális analizátorra [135], ill. a „flow injection" analizátorra [83] adaptált változatot említjük meg.

A másik módszer, amit széles körben használnak szérum szalicilsav spektrofotometriás meghatározására, annak enzimatikus oxidatív dekarboxilezésére alapul [96, 103, 111, 157]. A módszer, amelynek reakcióegyenletét a 7.11. fejezet (7/28) reakciósémáján mutattuk be, sokkal szelektívebb, mint a vas(III)-komplex képzésére alapozott, amelyet természetesen a fenoltípusú anyagok zavarnak.

9/2. táblázat. Néhány gyógyszer, ill. metabolit kémiai reakcióra alapozott spektrofotometriás meghatározása biológiai mintákban

Gyógyszer, ill. metabolit	Minta	Reakció	Extrakciós lépés	Irodalom
Izonikotinsavhidrazid	vizelet	kondenzáció 9-klór-akridinnel	–	[129]
Karbamazepin	plazma, szérum	savkatalizált átrendeződés 9-metil-akridinné	+	[13, 36]
Fenitoin metabolit (4-hidroxi-fenil)	vizelet	4-amino-antipirines oxidatív kondenzáció	+	[105]
Celiprolol	plazma, vizelet	hidrolízis, diazotálás, kapcsolás naftil-etilén-diaminnal	+	[136]
Prokainamid	plazma	diazotálás, kapcsolás naftil-etilén-diaminnal	+	[124]
Fenilbutazon	plazma	permanganátos oxidáció azobenzollá	+	[67]
Bromazepam	vizelet	hidrolízis 2-amino-5-bróm-benzoil-piridinné	+	[143]
Etoposide, Teniposide	plazma	elektrokémiai oxidáció	+	[146, 147]
Clavulansav származékok	szérum, vizelet	kondenzáció imidazollal	–	[74]
Prometazin	vizelet	töltésátviteli komplex képzés morfolin/J_2 reagenssel	–	[158]
Eritromicin	szérum, vizelet	ionpár-extrakció brómkrezolbíbor/kloroformmal	+	[115]
Klorokin és metabolitok	vizelet	ionpár-extrakció metilnarancs/diklór-metánnal	+	[104]
Efedrin, metamfetamin	vizelet	ionpár-extrakció tetrabróm-fenolftalein-etilészter/1,2-diklór-etánnal	+	[119]
Teofillin	szérum	enzimes oxidáció teofillin oxidáz/ferricytokróm C-vel; mérve: ferrocytokróm C	–	[55]
6-Merkaptopurin	vizelet	enzimes oxidáció xantin oxidázzal. Mérve: 6-tiohúgysav	–	[51]
Kloramfenikol	szérum	enzimes acetilezés során keletkező NADH mérése tetrazóliumos módszerrel	–	[58, 102]
Aszkorbinsav*	plazma, szérum	oxidáció $FeCl_3$-mal; keletkező Fe(II) mérése tripiridil-s-triazin komplex alakban; enzimatikus háttér-redukció	–	[120]
Dapsone	vizelet, plazma	kondenzáció 4-dimetil-amino-benzaldehiddel	+	[138]
Klorokin	vizelet	ionpár-extrakció; brómtimolkék/diklór-metán, metilnarancs/kloroform, tetrabrómfenolftalein/kloroform	+	[12]
Pyrimethamine	vizelet	Schiff-bázis képzés szalicilaldehiddel, ennek cinkkomplexe	+	[64]

* Lásd 7.11. fejezet

Számos más gyógyszerre és metabolitra is dolgoztak ki kémiai reakción alapuló spektrofotometriás módszert, s ilyen módszerek kidolgozása és alkalmazása mind a mai napig tart. Néhány módszert a 9/2. táblázatban foglaltunk össze. Megjegyezzük, hogy CHAMBERLAIN idézett monográfiájában [26] számos további módszer ismertetése található.

9.9. Gyógyszerek meghatározása drogextraktumokban

Az előző fejezetben leírtakhoz hasonló problémákkal kerül szembe az analitikus, amikor drogok, ill. extraktumok hatóanyag-tartalmának meghatározását végzi el. A „háttérproblémák" itt sem kisebbek, hiszen a meghatározást növényi festékek és számos más zavaró komponens mellett kell elvégezni. Ami ezen a területen kifejezetten nehezíti a helyzetet, az a meghatározandó komponenst kísérő számos, szerkezetileg sokszor igen hasonló rokonvegyület jelenléte. Ez az oka annak, hogy a korszerű igényeknek megfelelő gyógynövény-analitikai módszereket az esetek túlnyomó többségében kromatográfiás elválasztásra és ezzel kapcsolt direkt mérésre alapozzák. A gázkromatográfia és a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia mellett igen nagy szerephez jutnak a vékonyréteg-kromatográfia kvantitatív módszerei is.

A kromatográfiás elválasztást nem tartalmazó, saját fényelnyelésen alapuló, közvetlen spektrofotometriás mérés lehetőségei általában igen szerények. Megfelelően szelektív extrakció után, jó spektrofotometriás adottságokkal rendelkező vegyületek, mint pl. a 420 nm-nél abszorpciós maximummal rendelkező berberin esetében azonban a meghatározás növényi extraktumokból is elvégezhető [106]. Más esetekben a meghatározás célja csak a hasonló szerkezetű és spektrumú anyagok együttes meghatározása lehet, mint pl. flavonoid aglikonok (myricetin, quercetin stb.) meghatározása 375 nm-nél [90].

Bizonyos olyan esetekben, ahol a rokon szerkezetű származékok spektrumában van annyi különbség, hogy arra két vagy több hullámhosszas mérést lehet alapozni (lásd 4. fejezet), ezt a lehetőséget is kihasználták a mérésre. Számos ilyen klasszikus módszer található a régebbi gyógyszer-analitikai kézikönyvekben, pl. HIGUCHI és BROCHMANN-HANSSEN könyvében is [60a], de időről időre még az utóbbi időkben is közölnek ilyen módszereket, mint pl. sztrichnin és brucin egymás melletti meghatározását *Nux-vomica* extraktumokban [41, 82], ill. vinkamin és vincin egymás melletti mérését *Vinca minor* drogban [10] stb.

További néhány ilyen típusú módszer: kinin-kinidin valamint cinkonin-cinkonidin egymás melletti meghatározása *Cinchona succirubrae* extraktumban 330 és 282 nm-en való mérés után [59], szennozidok és rhein glikozidok egymás melletti mérése hidrolízis, többszörös extrakciós tisztítás és 377, ill. 430 nm-nél lefolytatott mérés után [57], valamint flavonolok és izoflavonolok egymás melletti meghatározása *Sophora japonica* tinktúra savas hidrolizátumából 261 és 370 nm-en [37].

A derivatív spektrofotometria nagy szelektivitása és háttéreliminálló képessége természetesen ezen a területen is kihasználható, amit pl. cinchona extraktumok

kinin-kinidin és cinkonin-tartalmának [32], valamint sztrichnin és brucin *Nux vomica* extraktumban való egymás melletti meghatározására [81] hasznosítottak.

A háttér eliminálásának és a szelektivitási problémák megoldásának legáltalánosabban használt módszere kromatográfiás elválasztási lépés beiktatása a spektrofotometriás mérés előtt. Az elválasztást számos esetben oszlopkromatográfiásan végzik el, mint pl. *Crataegus* összes flavonoidtartalmának meghatározását poliamid oszlopon való kromatografálás után [77], a leggyakrabban azonban vékonyréteg-kromatográfiás elválasztást alkalmaznak. A rendkívül nagyszámú ilyen mérés közül az 5.4. és 5.5. fejezetekben részletesen ismertetett két módszerre utalunk: *Digitalis lanata* digoxin, ill. digoxinné alakítható hatóanyag-tartalmának meghatározása vékonyréteg-kromatográfiás elválasztás, elúciót és xanthidrolos reakciót követő spektrofotometriás mérés alapján [61], valamint vinblasztin meghatározása *Catharanthus roseus* extraktumban kétdimenziós vékonyréteg-kromatográfia majd az elválasztott folt elúció és kémiai reakció nélküli direkt reflexiós spektrofotometriás mérése segítségével [62].

A további módszerek közül megemlítjük condurangin meghatározását condurangoban a glikozid-fahéjsav-észter vékonyréteg-kromatográfiás elválasztása, majd a fahéjsav tartalom lúgos hidrolízis után 266 nm-nél történő mérése alapján [128], juglon mérését 520 nm-en extrakció, savas hidrolízis, vékonyréteg-kromatográfiás elválasztás, elúció után [156], valamint sanguiritrin [79], rutin [6], methoxsalen [121], sylibin [133] és individuális flavon-glikozidok [5] mérését.

A kromatográfiás elválasztási lépést nem tartalmazó spektrofotometriás módszerek szelektivitását általában kémiai reakciók beiktatásával növelik. Ilyen módszer pl. Baccou és munkatársainak rendkívül érzékeny ($\varepsilon_{430\,nm} = 49\,000$) módszere szapogeninek meghatározására drogokban [8]. Ez a vanillin—kénsav—etil-acetát reagenssel végrehajtott módszer elég szelektív ahhoz, hogy a szapogeninek összegét meghatározzuk szterinek, szénhidrátok, növényi olajok, zsírsavak stb. jelenlétében, ha azonban a feladat az individuális szapogeninek meghatározása, akkor ezek előzetes vékonyréteg-kromatográfiás elválasztására is szükség van. Hasonlóan lehet pl. anyarozs-alkaloidok összegét meghatározni extraktumokban a van Urk-módszer segítségével [60] vagy szennozidok meghatározását nátrium-ditionitos redukció után [152].

Alkaloidok meghatározásának legfontosabb fotometriás módszere az ionpár-extrakción alapuló eljárás. Ez a 7.8. és 10.6. fejezetekben részletesen ismertetett módszer természetesen alkalmas növényi extraktumok alkaloidtartalmának meghatározására is. A klasszikus módszer újabb alkalmazásai közül megemlítjük atropin és szkopolamin meghatározását belladonnában és egyéb drogokban brómtimolkék [52, 56], metilnarancs [19, 127] és tropeolin-000 [112] segítségével, thebain meghatározását brómkrezolzöld [100], khellin és bergapten mérését brómtimolkék [63] gangleronét pedig kálium-jodo-bizmutátos extrakció és spektrofotometriás mérés [69] után.

Számos redoxireakció is alkalmazásra kerül a gyógynövény-analízisben. Megemlítjük hidroxi-antracén-származékok meghatározását vas(III)-kloridos oxidáció után hidroxi-antrakinonok formájában 515 nm körül. Ez a módszer a gyógyszerkönyvekben is hivatalos *Cascara Sagrada* vizsgálatára [16, 140 kk]. Ugyancsak a polifenolok redukáló sajátságain alapul tannin meghatározása drogokban a Folin—Ciocalteu-reagens alkalmazásával [43]. Egy rutin meghatározására szolgáló indirekt módszer oxidáló ágense a cerium(IV); a redukció során keletkező cerium(III)-ionokat arzena-

zo(III) reagenssel képzett kelátja alakjában mérik [18]. Itt említhető meg aszkorbinsav meghatározása növényi mintákban az aszkorbinsav oxidáz—vas(III)-klorid—2,4,6-trisz-piridil-s-triazinos módszerrel 593 nm-nél [126]; a módszer elvi alapjait a 7.11. fejezetben tárgyaltuk.

Széles körben alkalmazott reagens a gyógynövény-analízisben a 4-dimetilaminobenzaldehid. A van Urk-reakcióval kapcsolatban már ismertetett felhasználásán túlmenően [60] ezt a reagenst sikerrel alkalmazták chamazulen meghatározására drogokban 642 nm-en történő mérés [149], ill. a módszer differencia-spektrofotometriás változata [150] segítségével, továbbá iridoid glikozidok [65], atropin és szkopolamin [72] meghatározására.

Flavonoidok meghatározására gyakran használják az alumínium-kloridos komplexképzésen alapuló színreakciót [5, 44, 90]. Megemlítjük még kapszaicin meghatározását fűszernövényekben nitrálás és a nitro-fenolát 430 nm-nél végzett mérésével [125], karvon szelektív meghatározását illóolajokban 1,3-dinitro-benzol reagenssel [73], ginzengozidok meghatározását ginzengben vanillin—ecetsav—perklórsav reagens alkalmazásával [134], valamint judaicin mérését *Artemisia judaica*-ban ánizsaldehid—kénsavas reagenssel [75].

9.10. A spektrofotometriás mérések automatizálása

A gyógyszerek minőségére vonatkozó igények folyamatos növekedése az utolsó két évtizedben mind mennyiségi, mind minőségi tekintetben ugrásszerűen megnövelte az igényt gyógyszereknek különböző közegben való meghatározására. Ezeknek az igényeknek (különösen mennyiségi tekintetben) csak a meghatározások automatizálásával lehet eleget tenni. Ennek megfelelően jelentős erőfeszítések történtek a gyógyszeranalitikai módszerek automatizálására; már a 60-as években kialakultak az alapvető mérési technikák, amelyeket a következő években tömegesen használatba is vettek. A módszerek tökéletesítése és további területekre való kiterjesztése mind a mai napig tart.

Az ultraibolya-látható spektrofotometriás mérés kiválóan alkalmas az automatizálásra: a különböző automata analizátorok a legtöbb esetben spektrofotometriás detektorral működnek a gyógyszer-analitikai gyakorlatban. Ez az egyik oka annak, hogy a spektrofotometria megőrizte pozíciói jelentős részét a gyógyszeranalízisben, sőt a különböző klasszikus módszerek automatikus analizátorokra való adaptálása és új elvek kidolgozása a spektrofotometriás gyógyszer-analitikai kutatás új hullámát indította el. Különösen azokon a területeken ért el jelentős eredményeket az automatizált spektrofotometriás gyógyszeranalízis, ahol a nagy sorozatokban elvégzendő, munkaigényes mérések automatizálása jelentősen meggyorsítja, objektívebbé, pontosabbá teszi a vizsgálatokat, és csökkenti azok munkaigényességét, mint pl. tabletták hatóanyag-tartalmának mérése különös tekintettel a „content uniformity" és kioldódási profil vizsgálatokra és gyógyszerek meghatározására biológiai mintákban.

Az automatizált spektrofotometriás analízis első korszakában bevezetett módszereket szinte kivétel nélkül az AutoAnalyser típusú elemzőkre alapozták. Ezekben egy perisztaltikus-proporcionális pumpa szívja be és továbbítja a vizsgálandó oldatot, valamint a kémiai reakcióra alapozott spektrofotometriás módszer reagenseit. Ezek térfogatarányait a felhasznált flexibilis csövek keresztmetszete határozza meg. A mintaadagoló egység mintatároló edényeiből kiszívott, adott térfogatú folyadékrészleteket levegőbuborékokkal választjuk el egymástól. Ugyancsak levegőbuborékokkal szegmentálják a reagensek áramát is. A minta oldata és a reagensek keverő hurokban elegyednek egymással. A reakciók többé-kevésbé kvantitatív lefolyását az ezután következő, tetszés szerinti hőmérsékletre beállítható csőspirál biztosítja, ahol a reakció maximális lejátszódását a hőmérséklet emelésén kívül a spirál hosszának növelésével és az áramlási sebesség csökkentésével is befolyásolhatjuk. A mérendő anyag koncentrációjával arányos abszorbanciát az ezután következő, átfolyó küvettával rendelkező spektrofotométerrel határozzuk meg. A számításokat a mérendő oldatok közé beiktatott ismert koncentrációjú standard oldatoknál mért abszorbanciára alapozzuk. A reakció 100%-os lefutása nem kulcsfontosságú kérdés: ha a mérendő oldatokra és a standardokra vonatkoztatva biztosítjuk a teljesen azonos térfogati viszonyokat és reakciókörülményeket, akkor a nem teljes reakciólefolyásból származó hiba kiesik.

Meg kell még jegyezni azt is, hogy a rendszer elé ún. Solid Prep egységet kapcsolhatunk, ami automatikusan elvégzi a tabletták dezintegrálását, extrakcióját, szűrését és az oldat hígítását is az analizátorba való betáplálás előtt.

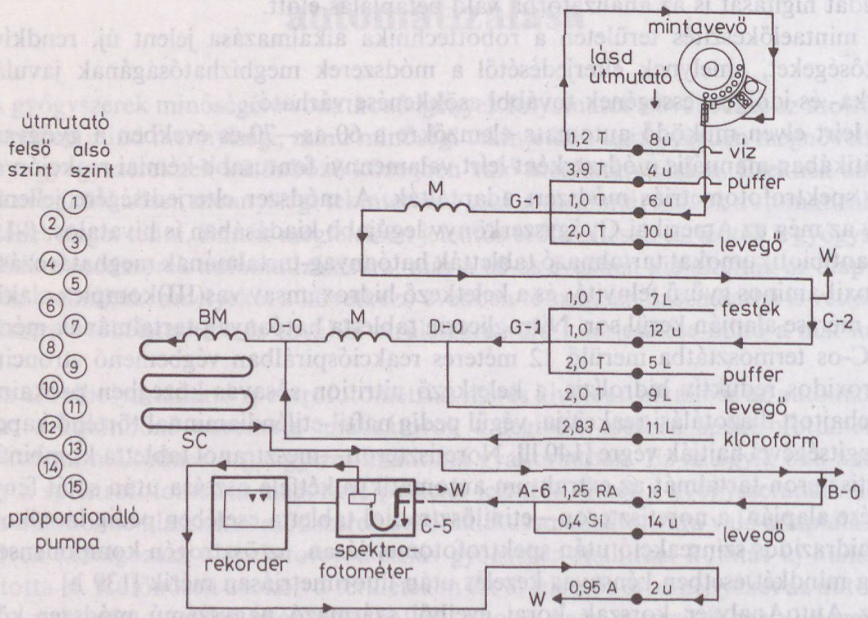
A mintaelőkészítés területén a robottechnika alkalmazása jelent új, rendkívüli lehetőségeket, amelynek elterjedésétől a módszerek megbízhatóságának javulása, munka- és időigényességének további csökkenése várható.

A leírt elven működő automata elemzőkre a 60-as—70-es években a gyógyszeranalitikában manuális módszerként leírt valamennyi fontosabb kémiai reakción alapuló spektrofotometriás módszert adaptálták. A módszer elterjedtségére jellemző, hogy az még az Amerikai Gyógyszerkönyv legújabb kiadásában is hivatalos. β-Laktám antibiotikumokat tartalmazó tabletták hatóanyag-tartalmának meghatározására hidroxil-aminos gyűrű felnyitás és a keletkező hidroxámsav vas(III)komplex alakban való mérése alapján kerül sor. Nitroglicerin tabletta hatóanyag-tartalmának mérését 50 °C-os termosztátba merülő 12 méteres reakcióspirálban végbemenő stroncium-hidroxidos reduktív hidrolízis, a keletkező nitrition sósavas közegben prokainnal végrehajtott diazotálási reakciója, végül pedig naftil-etiléndiaminnal történő kapcsolás segítségével hajtják végre [140 ll]. Noretiszteron—mesztranol tabletta kombináció noretiszteron-tartalmát az extraktum automatikus kétfelé osztása után saját fényelnyelése alapján, a noretiszteron—etinilösztradiol tabletta esetében pedig izonikotinsav-hidrazidos színreakció után spektrofotometriásan, az ösztrogén komponenseket pedig mindkét esetben kénsavas kezelés után fluorimetriásan mérik [139 h].

Az AutoAnalyser korszak korai éveiből származó nagyszámú módszer közül megemlítjük acetaminofen meghatározását elixír és tabletta készítményekben nitrálás, majd a keletkező nitro-fenol lúgos közegben való mérése (lásd 342. oldal) alapján [29], valamint a legkülönbözőbb szteroid tabletták analízisét a tetrazóliumos, izonikotinsavas, kénsavas stb. reagensek segítségével [50]. Ilyen módszereket, bár csökkenő

mértékben, a legutóbbi időkig is közölnek. Ilyen pl. BONGIOVANNI és munkatársainak módszere salétromsav-észter típusú gyógyszeres tabletták analízisére a fenti elv alkalmazásával: lúgos hidrolízis, a nitrát redukciója nitritté s ennek mérése azo-kapcsolásos reakcióban [15] ABDALLA és munkatársainak módszere cefalosporinok mérésére lúgos hidrolízis és az ennek során képződő szulfidion *N-N*-dimetil-*p*-fenilén-diamin —vas(III) reagenssel metilénkékké való ciklizálása alapján [1] vagy KIROHHOEFER módszere tridihexetil-klorid szelektív meghatározására meprobamáttal kombinált tabletta kiszerelési formájából [76]. Ennek a módszernek folyamatábráját a 9/4. ábrán mutatjuk be.

A módszer a tridihexetil bázis brómkrezol-bíboros ionpár extrakcióján és mérésén alapul (lásd 7.7. fejezet). Ezzel kapcsolatban érdemes megjegyezni, hogy az Auto-Analyseres módszerek lehetővé teszik extrakciós lépések beiktatását is. A mintaadagoló polisztirol csészéi a tabletta vizes extraktumát, ill. a hatóanyag ismert koncentrációjú vizes oldatait tartalmazzák. Az innen kiszívott, 5,3-as pH-jú foszfát pufferral elegyített és levegővel szegmentált minta egy újabb keverő spirálban elegyedik a hozzápumpált lúgos festékoldat és újabb pufferoldat megfelelő térfogataival. A pillanatreakció miatt itt természetesen nincs szükség késleltetésre, ill. emelt hőmérsékletű reakciótérre. A kloroformárammal való találkozás után az extrakció a nagy felületű érintkezést lehetővé tevő *BM* jelzésű spirálban megy végbe, a kloroformos fázisnak a kiextrahált



9/4. ábra. Tridihexetil klorid meghatározásának sémája AutoAnalyzerrel.

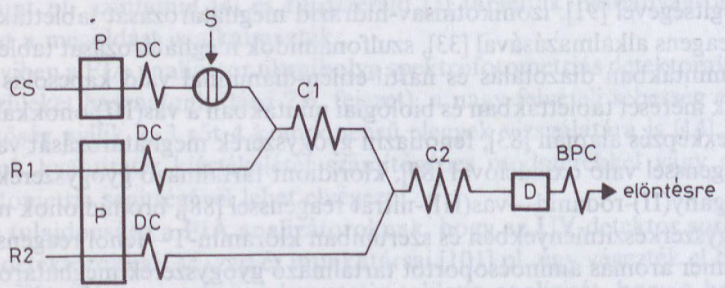
T: Tygon pumpa cső; *RA:* vörös acidflex pumpa cső; *A:* acidflex pumpa cső; *Si:* szilikon pumpa cső; *M:* 28 fordulatos keverőspirál (2,4 mm belső átmérő); *BM:* 28 fordulatos, töltött keverőspirál; *SC:* 5 fordulatos ülepítőspirál (2,4 mm belső átmérő); *C—2, B—O, D—O, G—1, C—5, A—6* üvegcsapok és csatlakozások; *W:* elöntésre kerülő folyadék. (R. D. KIRCHHOEFER, J. Ass. Off. Anal.Chem. **67**, 677 (1984) [76])

vizes fázistól való elválasztása pedig a vertikális elhelyezésű *SC* spirál, ill. a *B-O* jelzésű üvegcsap segítségével. A kloroformos fázis a spektrofotométer átfolyó küvettájába kerül, ahol 408 nm-nél végezzük el a mérést. A módszer óránként 30 minta elemzését teszi lehetővé, ami általánosságban is jellemzi a hasonló módszerek kapacitását.

A módszer gazdag irodalmából külön kiemelendő KUBIN, BREHM és ULMEN [89] közleménye. Ezek a szerzők egy Solid Prep egységgel ellátott AutoAnalyser folyadékáramát kétfelé osztották, s így szimultán lehetőség nyílott a tabletta extraktumok fotometriás és HPLC technikával történő mérésére. Ezzel a technikával elvégezték ergotamin-tartarát mérését (a vas(III)—*p*-dimetil-amino-benzaldehides módszerrel), kodein-foszfát meghatározását (a foszfáttartalom molibdénkékes meghatározásával), valamint fenotiazinszármazékok mérését (palládium(II)-komplexük alakjában).

A gyógyszer-analitikában alkalmazott automata analizátorok második generációját a 70-es évek végén kifejlesztett, majd a legutóbbi években igen gyorsan terjedő „Flow Injection Analysis" (FIA) technika teremtette meg. Ez a módszer, amelyről már monográfiák [118, 142], gyógyszer-analitikai alkalmazásairól pedig összefoglaló közlemények is [20, 98] jelentek meg, lényegesen különbözik az eddigiek során tárgyalt AutoAnalyser technikától. Itt egy pumpa folyamatos, szegmentálatlan folyadékáramlást biztosít. Ebbe az áramló folyadékba injektáljuk be egy mikroprocesszor-kontrollált hurokinjektor segítségével a vizsgálandó oldatot, valamint a (másik pumpa által szállított) reagenseket. A reakció megfelelő mértékben való lejátszatását itt is melegíthető reakciós pirál segíti elő. A folyadék folyamatosan áramlik keresztül a detektorcellán, a rekorder pedig regisztrálja a jelet, ami a készülék megfelelő méretezése és megfelelő áramlási sebesség mellett a viszonylag kismértékű diffúzió miatt egy megfelelően éles folyadék-kromatográfiás jelhez hasonlít. A különböző optikai, ill. elektrokémiai elveken alapuló detektorok közül a legelterjedtebbek az ultraibolya-látható spektrofotometriás detektorok.

Gyakorlati példaként OHTA és munkatársai [110] módszerét mutatjuk be *N*-nitrozocsoportot tartalmazó gyógyszerek meghatározására. A módszer kémiai alapja: az *N*-nitrozo-vegyületet 2,5%-os jégecetes hidrogén-bromid-oldattal denitrozáljuk, a keletkező nitrozil-bromid diazoniumszármazékká alakítja a Griess-reagensben levő



9/5. ábra. *N*-nitrozo-csoportot tartalmazó anyagok meghatározására szolgáló FIA rendszer. A betűjelzések magyarázatát a szövegben adtuk meg.

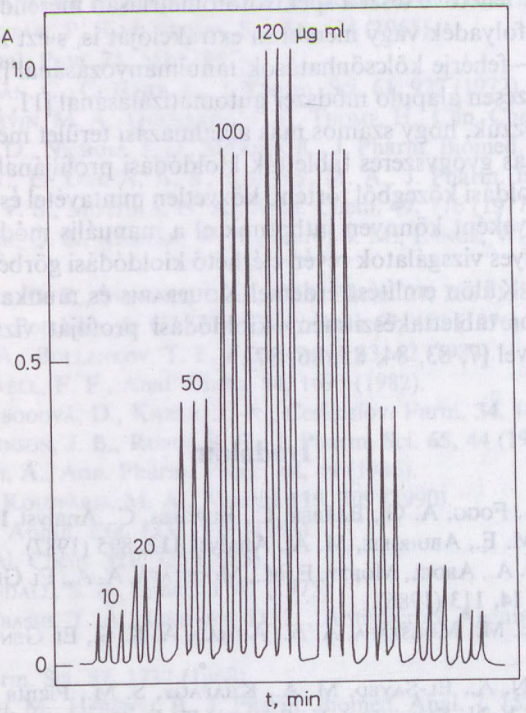
(T. OHTA, N. GOTO, S. TAKITANI, Analyst **113**, 1333 (1988) [110])

szulfanilsav-amidot, ezt kapcsoljuk naftil-etilén-diaminnal (lásd 233. oldal) színes reakciótermék keletkezése közben. A készülék sémáját a 9/5. ábrán mutatjuk be. A felső *P* jelzésű pumpa szállítja az oldószert (etil-acetát) 0,7 ml/perc sebességgel. Ebbe az áramba injektáljuk a vizsgálandó *N*-nitrozo-vegyület etil-acetátos oldatának 200 µl-ét az *S* jelzésű injektorral. Az alsó pumpa szállítja egyrészről az R_1 jelzésű denitrozáló reagenst és a Griess-reagenst (R_2) 0,3—0,3 ml/perc sebességgel. A denitrozálási reakció a c_1 jelzésű 2 m hosszú reakcióspirálban, a diazotálási és kapcsolási reakciók pedig a c_2 jelzésű 6 m hosszú reakcióspirálban játszódnak le. A spektrofotometriás detektor cellájának térfogata 8 µl, a hullámhossz pedig 550 nm. Innen az elegy egy fojtóspirálon keresztül (*BCP*) távozik. A *DC* jelzésű pulzálásgátló spirálok a folyamatos, sima áramlást segítik elő.

A FIA technika előnyei: a készülék egyszerű, olcsó, könnyen átállítható az egyik módszerről a másikra, igen jó a módszer érzékenysége (az előbbi példában pl. $5 \cdot 10^{-8}$ M/l), és igen nagy az óránként vizsgálható minták száma, ami elérheti a 2—300-at is. Természetesen ennél a módszernél sem biztosítható minden esetben a reakció kvantitatív lefolyása. Erre azonban nincs is feltétlenül szükség, sőt erre általában nem is törekednek, hiszen a paraméterek pontos betartása esetén a jel reprodukálhatósága így is biztosítható. Koupparis és munkatársai pl. acetaminofen tabletta hatóanyag-tartalmának a vas(III)—2,4,6-tripiridil-s-triazin módszerrel való meghatározása során kimutatták, hogy a redoxireakció mindössze néhány százalékos konverzióval játszódik le, a módszer pontossága mégis igen jó (szórás 0,4% alatt) [87].

A koncentrációt általában a csúcsmagasság alapján számítjuk ki, de lehetőség van a görbe alatti területből való számolásra is. A jel—koncentráció kalibrációs görbe általában lineáris, de megfelelő kalibráció és megfelelő számú standard oldat párhuzamosan végzett vizsgálata segítségével lehetőség van nem lineáris kalibrációs görbék alapján való kiértékelésre is. A 9/6. ábrán a prometazin meghatározásához készült kalibrációs görbe felvétele során kapott csúcsokat tüntettük fel [85].

A FIA módszer számos gyógyszer-analitikai alkalmazása közül megemlítjük klórhexidin brómkrezolzölddel való extrakció nélküli ionpár képzésén alapuló módszert [21], 4-amino-antipirin meghatározását fenollal való oxidatív kapcsolása után [39], kortikoszteroidok meghatározását gyógyszerkészítményekben a tetrazólium-kékes reakció segítségével [91], izonikotinsav-hidrazid meghatározását tablettákban metavanadát reagens alkalmazásával [33], szulfonamidok meghatározását tablettákban és biológiai mintákban diazotálás és naftil-etilén-diaminnal való kapcsolás után [84], szalicilátok mérését tablettákban és biológiai mintákban a vas(III)ionokkal végbemenő komplexképzés alapján [83], fenotiazin gyógyszerek meghatározását vas(III)-perklorát reagenssel való oxidációval [85], kloridiont tartalmazó gyógyszerek meghatározását higany(II)-rodanid—vas(III)-nitrát reagenssel [88], bromidionok meghatározását gyógyszerkészítményekben és szérumban klóramin-T—fenol reagens segítségével [7], primer aromás aminocsoportot tartalmazó gyógyszerek meghatározását 4-*N*-metil-amino-fenollal végzett oxidatív kapcsolással [148], 3- és 4-szubsztituált fenolok mérését 1-nitrozo-2-naftollal való oxidatív kapcsolás után [42], valamint karboxilcsoportot tartalmazó gyógyszerek mérését 2-nitro-fenil-hidrazinnal végzett kondenzáció után [137] stb.



9/6. ábra. FIA kalibrációs görbe elkészítéséhez készült felvételek: prometazin növekvő és csökkenő koncentrációi vas(III)-perklorátos oxidáció után.

(M. A. Koupparis, A. Barchuchová, Analyst **111**, 313 (1986) [85])

Az eddig tárgyalt, kémiai reakción alapuló módszereken túlmenően (akárcsak a levegő-szegmentált analizátorok) a FIA módszer természetesen alkalmas saját fényelnyelés alapján való detektálásra és mérésre is; a manuális módszerrel szemben ennek a megoldásnak előnye a nagyobb mérési sebesség, ezért egyszerűbb feladatok megoldására, mint pl. azintamid [4] és furoszemid [3] tabletták hatóanyag-tartalmának mérése, ezt a megoldást is alkalmazták.

Amennyiben a FIA analizátor ultraibolya spektrofotometriás detektoraként diódasoros készüléket használunk (lásd 2.6. fejezet), a nagy felvételi sebesség eredményeként lehetőség nyílik 2, 3 sőt 4 komponensű elegyek vizsgálatára is [14]. Az átfedő spektrumok kvantitatív kiértékelését számítógépes módszerekkel vagy a derivatív spektrofotometria segítségével lehet elvégezni.

Értékes tulajdonsága a FIA analizátoroknak, hogy az UV-detektor sorbakapcsolható más detektorokkal. Mazzo és munkatársai [101] pl. úgy végezték el butil-hidroxi-anizol antioxidánst tartalmazó lovastatin tabletta analízisét, hogy a hatóanyagot 254 nm-nél mérték, az antioxidánst pedig (amelynek fényelnyelése elhanyagolható az adott koncentrációviszonyok között az adott hullámhosszon) az UV-detektor után kapcsolt amperometriás detektorral.

A FIA módszer lehetővé teszi a spektrofotometriásan mérendő komponens folyamatos folyadék—folyadék vagy membrán extrakcióját is, s ezt felhasználták a többi között gyógyszer—fehérje kölcsönhatások tanulmányozásánál [99], és számos, elsősorban ionpárképzésen alapuló módszer automatizálásánál [11, 38, 70, 71, 107, 108].

Végül megjegyezzük, hogy számos más alkalmazási terület mellett a FIA technika különösen alkalmas gyógyszeres tabletták kioldódási profiljának automatizált meghatározására. Az oldási közegből történő közvetlen mintavétel és a minták igen gyors analízise eredményeként könnyen juthatunk el a manuális módszerrel csak nagyon idő- és munkaigényes vizsgálatok révén elérhető kioldódási görbéhez (lásd a 9/3. ábra a 9.3. fejezetben). Külön említést érdemel Koupparis és munkatársai tevékenysége, akik egy egész sor tablettakészítmény kioldódási profilját vizsgálták meg a FIA módszer segítségével [7, 83, 84, 85, 86, 87].

Irodalom

1. Abdalla, M. A., Fogg, A. G., Barber, C., Burgess, C., Analyst **108,** 53 (1983).
2. Abdel Hamid, M. E., Abuirjeie, M. A., Analyst **112,** 895 (1987).
3. Abdel Kader, S. A., Abdel, Moety, E. M., Moustafa, A. A., El Gendy, A., Arch. Farm. Chemi. Sci. Ed. **14,** 113 (1986).
4. Abdel Moety, E. M., Moustafa, A. A., Ahmad, A. K. S., El Gendy, A., Sci. Farm. **55,** 259 (1987).
5. Abd El-Salam N. A., El-Sayed, M. A., Khafagy, S. M., Planta Med. **30,** 402 (1975).
6. Abdullabekova, V. N., Sokolov, I. V., Sabirov, K. A., Gunar, V. I., Khim.-Farm. Zh. **23,** 1367 (1989).
7. Anagnostopoulou, P. I., Koupparis, M. A., Anal. Chem. **58,** 322 (1986).
8. Baccou, J. C., Lambert, F., Sauvaire, Y., Analyst **102,** 458 (1977).
9. Bailey, D. N., Clin. Chem. **28,** 187 (1982).
10. Bayer, J., Acta Pharm. Hung. **42,** 249 (1972).
11. Bergamin, F. H., Madeiros, J. X., Reis, B. F., Zagatto, E. A. G., Anal. Chim. Acta **101,** 9 (1978).
12. Bergqvist, Y., Eckerbom, S., Gerhardt, W., Rombo, L., Therap. Drug Monit. **12,** 366 (1990).
13. Beyer, K. H., Klinge, K., Arzneim.-Forsch. **19,** 1759 (1969).
14. Blanco, M., Gené, J., Iturriaga, H., Maspoch, S., Analyst **112,** 619 (1987).
15. Bongiovanni, G., Giani, C., Innocenti, F., Maccari, M., Minet, E., Pogliano, L., Boll. Chim. Farm. **123,** 14 (1984).
16. British Pharmacopoeia 1988, Her Majesty's Stationery Office, London, 1988. p. 671—672.
17. Broughton, P. M. G., Biochem. J. **63,** 207 (1956).
18. Buhl, F., Dul Zarychta, E., Chwistek, M., Acta Pol. Pharm. **45,** 369 (1988).
19. Bystrova, L. V., Polisar, R. D., Shatrova, V. M., Grigoreva, V. M., Farmatsiya **34,** 65 (1985).
20. Calatayud, J. M., Pharmazie **41,** 92 (1986).
21. Calatayud, J. M., Falcó, P. C., Anal. Chim. Acta **189,** 323 (1986).
22. Carlucci, G., Maurizi, G., Mazzeo, P., Varrassi, G., Farmaco, Ed. Prat. **43,** 297 (1988).
23. Chafetz, L., J. Pharm. Sci. **53,** 1162 (1964).
24. Chafetz, L., J. Pharm. Sci. **60,** 335 (1971).
25. Chafetz, L., Gaglia, C. A., J. Pharm. Sci. **56,** 1681 (1967).

26. Chamberlain, J., Analysis of drugs in biological fluids. CRC Press, Boca Raton 1985.
27. Comer, J. P., Hartsaw, P. E., J. Pharm. Sci. **54,** 524 (1965).
28. Coutts, A. G., Anal. Proc. **22,** 111 (1985).
29. Daly, R. E., Moran, C., Chafetz, L., J. Pharm. Sci. **61,** 927 (1972).
30. Dingeon, B., Charvin, M. A., Quenard, M. T., Thome, H., Clin. Chem., **34,** 1119 (1988).
31. Edwardson, P. A. D., Nichols, J. D., Sudgen, K., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 287 (1989).
32. El Sebakhy, N. A., El Din, A. A. S., Korany, M. A., J. Pharm. Belg. **41,** 222 (1986).
33. Eswara Dutt, V. V. S., Mottola, H. A., Anal. Chem. **49,** 776 (1977).
34. Farid, N. A., Born, Q. S., Kessler, W. V., Shaw, S. M., Lange, W. E., Clin. Chem. **21,** 1167 (1975).
35. Fell, A. F., Jarvie, D. R., Stewart, M. J., Clin. Chem. **27,** 286 (1981).
36. Fellenberg, A. J., Pollard, A. C., Clin. Chim. Acta **69,** 423 (1976).
37. Fetkhullina, G. A., Bullenkov, T. I., Farmatsiya **33,** 42 (1984).
38. Fossey, L., Cantwell, F. F., Anal. Chem. **54,** 1693 (1982).
39. Fraenkl, M., Svobodová, D., Karlicek, R., Ceskoslov. Farm. **34,** 168 (1985).
40. Frank, M. J., Johnson, J. B., Rubin, S. H., J. Pharm. Sci. **65,** 44 (1976).
41. Gaudy, D., Puech, A., Ann. Pharm. Franc. **44,** 49 (1986).
42. Georgiou, C. A., Koupparis, M. A., Analyst **115,** 309 (1990).
43. Glasl, H., Dtsch. Apoth. Ztg. **123,** 1979 (1983).
44. Glasl, H., Z. Anal. Chem. **321,** 325 (1985).
45. Glynn, J. P., Kendall, S. E., Lancet 1147 (1975).
46. Gootz, T. D., Subashi, T. A., Lindner, D. L., Antimicrob. Agents Chemoter. **32,** 159 (1988).
47. Görög, S., J. Pharm. Sci. **57,** 1737 (1968).
48. Görög, S., Rényei, M., Herényi, B., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 1527 (1989).
49. Görög, S., Rényei, M., Laukó, A., J. Pharm. Biomed. Anal. **1,** 39 (1983).
50. Görög, S., Szász, Gy., Analysis of Steroid Hormone Drugs. Akadémiai Kiadó, Budapest —Elsevier, Amsterdam 1978, 391—392. old.
51. Görög, K., Görög, S., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 109 (1988).
52. Grishina, M. S., Kovalenko, L. I., Popov, D. M., Samylina, I. A., Khim. Farm. Zh. **19,** 1102 (1985).
53. Gupta, R. C., Lundberg, G. D., Anal. Chem. **45,** 2403 (1973).
54. Gupta, R. N., Pickersgill, R., Stefanec, M., Clin. Biochem. **16,** 220 (1983).
55. Gupta, S. K., Agarwal, A. K., de Castro, A. F., Clin. Chem. **34,** 1267 (1988).
56. Guven, K. C., Altinkurt, T., Gulhan, S., Eczacilik Bul. **19,** 42 (1977).
57. Habib, A.-A. M., El-Sebakhy, N. A., J. Nat. Prod. **43,** 452 (1980).
58. Hammond, P. M., Miller, J., Price, C. P., Morris, H. C., Lancet **II.,** 449 (1987).
59. Háznagy, A., Acta Pharm. Hung. **47,** 249 (1977).
60. Higuchi, T., Brochmann-Hanssen, E., Pharmaceutical Analysis. Interscience Publ., New York, London 1961. a. 427—428. old., b. 435—438. old.
61. Horváth, P., Acta Pharm. Hung. **52,** 133 (1982).
62. Horváth, P., Iványi, G., Acta Pharm. Hung. **52,** 150 (1982).
63. Ibrahim, S. M., Kadry, H. A., El-Olemy, M. M., J. Nat. Prod. **42,** 366 (1979).
64. Idowu, O. R., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 893 (1989).
65. Ivanov, V. D., Georgievskii, V. P., Grizodub, A. I., Kommissarenko, N. F., Ladygina, E. Ya., Farmatsiya **33,** 30 (1984).
66. Jakovljevic, I. M., Hartsaw, P. E., Drummond, G. E., J. Pharm. Sci. **54,** 1771 (1965).
67. Jaenchen, E., Levy, G., Clin. Chem. **18,** 984 (1972).
68. Jenny, R. W., Clin. Chem. **31,** 1158 (1985).

69. Kalugina, Z. G., Vikhareva, E. B., Saveleva, G. I., Farmatsiya **37,** 82 (1988).
70. Karlberg, B., Johansson, P. A., Thelander, S., Anal. Chim. Acta **104,** 21 (1979).
71. Karlberg, B., Thelander, S., Anal. Chim. Acta **98,** 1 (1978).
72. Karawya, M. S., Abdel-Wahab, S. M., Hifnawy, M. S., Ghourab, M. G., J. Ass. Off. Anal. Chem. **58,** 854 (1975).
73. Karawya, M. S., Hifnawy, M. S., El-Hawary, S. S., J. Ass. Off. Anal. Chem. **62,** 250 (1979).
74. Kenig, M. D., Analyst **113,** 761 (1988).
75. Khafagy, S. M., Abdel, Salam, M. A., El-Ghazooly, M. G., Planta Med. **30,** 21 (1976).
76. Kirchhoefer, R. D., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **67,** 677 (1984).
77. Kiseleva, T. L., Samylina, I. A., Farmatsiya **36,** 30 (1987).
78. Kitamura, K., Mabuchi, M., Fukui, T., Hozumi, K., Chem. Pharm. Bull. **35,** 3914 (1987).
79. Kolypova, I. E., Masalova, G. A., Perelson, M. E., Khim.-Farm. Zh. **14,** 58 (1980).
80. Korany, M. A., Bedair, M., Mahgoub, H., Elsayed, M. A., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **69,** 608 (1986).
81. Korany, M. A., El-Din, A. A. S., J. Ass. Off. Anal. Chem. **67,** 138 (1984).
82. Kostennikova, Z. P., Farmatsiya **35,** 68 (1986).
83. Koupparis, M. A., Anagnostopoulou, P. J., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 35 (1988).
84. Koupparis, M. A., Anagnostopoulou, P. I., Anal. Chim. Acta **204,** 271 (1988).
85. Koupparis, M. A., Barcuchová, A., Analyst **111,** 313 (1986).
86. Koupparis, M. A., Macheras, P., Reppas, C., Int. J. Pharm. **20,** 325 (1984).
87. Koupparis, M. A., Macheras, P., Tsaprounis, C., Int. J. Pharm. **27,** 349 (1985).
88. Koupparis, M. A., Sarantonis, E. G., J. Pharm. Sci. **75,** 800 (1986).
89. Kubin, H., Brehm, M., Ulmen, J., Pharm. Ind. **44,** 1269 (1982).
90. Kudrin, A. N., Maidykov, A. A., Akimov, P. P., Galushkina, L. R., Farmatsiya **5,** 55 (1986).
91. Landis, J. B., Anal. Chim. Acta **114,** 155 (1980).
92. Levy, G., Procknal, J. A., J. Pharm. Sci. **57,** 1330 (1968).
93. Lim, C.-F., Wynne, K. N., Barned, J. M., Topliss, J. D., Stockigt, J. R., J. Pharm. Pharmacol. **38,** 795 (1986).
94. Liu, T. Z., Afshari, J. T., Clin. Chem. **34,** 1267 (1988).
95. Liu, T. Z., Oka, K. H., Clin. Chem. **26,** 69 (1980).
96. Longenecker, R. W., Trafton, J. E., Edwards, R. B., Clin. Chem. **30,** 1369 (1984).
97. Lukáts, B., Takácsi Nagy, G., Acta Pharm. Hung. **35,** 116 (1965).
98. Luque de Castro, M. D., Valcárcel, M., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 1291 (1989).
99. Macheras, P., Koupparis, M. A., Tsaprounis, C., Int. J. Pharm. **30,** 123 (1986).
100. Maghssoudi, R. H., Fawzi, A. B., J. Pharm. Sci. **67,** 32 (1978).
101. Mazzo, D. J., Biffar, S. E., Forbes, K. A., Bell, C., Brooks, M. A., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 271 (1988).
102. Morris, H. C., Hunter, J., Campbell, R. S., Hammond, P. M., Atkinson, T., Clin. Chem. **32,** 1083 (1986).
103. Morris, H. C., Overton, P. D., Ramsay, J. R., Campbell, R. S., Hammond, P. M., Atkinson, T., Clin. Chem. **36,** 131 (1990)
104. Mount, D. L., Patchen, L. C., Williams, S. B., Churchill, F. C., Bull. WHO **65,** 615 (1987).
105. Moustafa, M. A. A., Belal, F., El Emam, A. A., J. Pharm. Belg. **42,** 53 (1987),
106. Naidovich, L. P., Maslova, G. A., Bondarenko, L. T., Perelson, M. E., Tolkachev, O. N., Khim.-Farm. Zh. **12,** 132 (1978).
107. Nord, L., Karlberg, B., Anal. Chim. Acta **118,** 285 (1980).

108. Ogata, K., Taguchi, K., Anal. Chem. **54,** 2127 (1982).
109. O'Haver, T. C., Clin. Chem. **25,** 1548 (1979).
110. Ohta, T., Goto, N., Takitani, S., Analyst **113,** 1333 (1988).
111. Opperman, E., Johnson, G. F., Clin. Chem. **34,** 1269 (1988).
112. Petrishek, I. A., Gaevsky, A. V., Lovkova, M. Y., Golovkin, A. B., Grinkevich, N. I., Khim. Farm. Zh. **20,** 710 (1986).
113. Poulou, M., Macheras, P., Int. J. Pharm. **34,** 29 (1986).
114. Quaglia, M. G., Carlucci, G., Cavicchio, G., Mazzeo, P., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 421 (1988).
115. Regosz, A., Dabrowska, D., Laman, M., Sci. Pharm. **54,** 23 (1986).
116. Rehm, C. R., Smith, J. B., J. Amer. Pharm. Ass., Sci. Ed. **49,** 386 (1960).
117. Reisner, E., Nikolics, K., Acta Pharm. Hung. **52,** 179 (1982).
118. Ruzicka, J., Hansen, E. H., Flow Injection Analysis. J. Wiley and Sons, New York 1982.
119. Sakai, T., Ohno, N., Analyst **112,** 149 (1987).
120. Samyn, W., Clin. Chim. Acta **133,** 111 (1983).
121. Shawl, A. S., Vishwapaul, Analyst **102,** 779 (1977).
122. Shihabi, Z. K., David, R. M., Ther. Drug Monit. **6,** 449 (1984).
123. Shihabi, Z. K., Wasilauskas, B. L., Peacock, J. E., Ther. Drug Monit. **10,** 486 (1988).
124. Sitar, D. S., Graham, D. N., Rangno, R. E., Dusfresne, L. R., Ogilvie, R. I., Clin. Chem. **22,** 379 (1976).
125. Sivasamy, K., Rajeswari, S., J. Indian Chem. Soc. **64,** 176 (1987).
126. Skaltsa, H. D., Izakou, O. A., Koupparis, M. A., Philianos, S. M., Anal. Letters **20,** 1679 (1987).
127. Sokolov, A. V., Popov, D. M., Farmatsiya **38,** 62 (1989).
128. Steinegger, E., Brunner, P., Pharm. Acta Helv. **52,** 139 (1977).
129. Stewart, J. T., Settle, D. A., J. Pharm. Sci. **64,** 1403 (1975).
130. Stewenson, G. W., Anal. Chem. **32,** 1522 (1960).
131. Svensson, C. K., Edwards, D. J., Lalka, D., J. Pharm. Sci. **71,** 1305 (1982).
132. Swanson, M. B., Walters, M. I., Clin. Chem. **28,** 1171 (1982).
133. Szilajtis-Obieglo, R., Kowalewska, K., Herba Pol. **30,** 27 (1984).
134. Tai, B., Geng, C., Li, J., Yaowu Fenzi Zazhi **3,** 234 (1983).
135. Tai Kwong, Adams, N., Young, N., Clin. Biochem **17,** 170 (1984).
136. Takacs, F., Hippmann, D., Arzneim.-Forsch. **33,** 5 (1983).
137. Takeuchi, T., Kabasawa, I., Horikawa, R., Tanimura, T., Analyst **113,** 1673 (1988).
138. Tawada, J. C., Midio, A. F., Rev. Farm. Bioquim. Univ. Sao Paulo **25,** 177 (1989).
139. The United States Pharmacopoeia XXI, USP Convention Inc., Rockville, Md., 1985. a. 157; b. 1146; c. 389; d. 245; e. 400; f. 293; g. 405; h. 1145—1159.
140. The United States Pharmacopoeia XXII, USP Convention Inc., Rockville, Md., 1990. a. 554; b. 190; c. 286; d. 85; e. 294; f. 154; g. 176; h. 958; i. 547; j. 113; k. 178; l. 292; m. 1150; n. 363; o. 286; p. 290, 1544; r. 96; s. 514; t. 391, 1532; u. 819; v. 916; w. 666; z. 951; x. 605; y. 1331; aa. 785; bb. 29; cc. 876; dd. 571; ee. 684; ff. 951; gg. 149; hh. 327; ii. 1300; jj. 1579; kk. 235; ll. 1473—7.
141. Trinder, P., Biochem. J. **57,** 301 (1954).
142. Valcárcel, M., Luque de Castro, M. D., Flow Injection Analysis: Principles and Applications. Ellis Horwood, Chichester 1987.
143. Valdeon, J. L., Escribano, M. T. S., Hernandez, L. H., Analyst **112,** 1365 (1987).
144. Van de Waart, F. J., Hulshoff, A., Indemans, A. W. M., Pharm. Weekblad **115,** 1429 (1980).

145. Van de Waart, F. J., Hulshoff, A., Indemans, A. W. M., J. Pharm. Biomed. Anal. **1,** 507 (1983).
146. van Opstal, M. A. J., Blauw, J. S., Holthuis, J. J. M., van Bennekom, W. P., Bult, A., Anal. Chim. Acta **202,** 35 (1987).
147. van Opstal, M. A. J., Blauw, J. S., Holthuis, J. J. M., van Bennekom, W. P., Bult, A., Pharm. Weekbl. Sci. Ed. **9,** 145 (1987),
148. Verma, K. K., Stewart, K. K., Anal. Chim. Acta **214,** 207 (1988).
149. Verzár-Petri, G., Cuong, B. N., Acta Pharm. Hung. **47,** 134 (1977).
150. Verzár-Petri, G., Cuong, B. N., Sci. Pharm. **45,** 25 (1977).
151. Wahbi, A. M., Abounassif, M. A., El Obeid, H. A., Al Julani, A. M., Arch. Pharm. Chemi Sci. Ed. **14,** 69 (1986).
152. Wahbi, A. M., Abu-Shady, H., Soliman, A., Planta Med. **30,** 269 (1976).
153. Walberg, C. B., J. Anal. Toxicol. **1,** 79 (1977).
154. Walberg, C. B., Clin. Toxicol. **18,** 879 (1981).
155. Williams, L. A., Linn, R. A., Zak, B., J. Lab. Clin. Med. **53,** 156 (1959).
156. Wojcik, E., Farm. Pol. **40,** 523 (1984).
157. You, K., Bittikofer, J. A., Clin. Chem. **30,** 1549 (1984).
158. Youssef, A. F., El Shabouri, S. R., Mohamed, F. A., Rageh, A. M. I., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **69,** 513 (1986).
159. Zwillenberg, L. O., Bösiger, G., Zwillenberg, H. H. L., Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol. **4,** 575 (1982).

10. Néhány fontosabb gyógyszercsalád spektrofotometriás analízise

10.1. Bevezetés

Ebben a fejezetben — az 1—9. fejezetekben leírt általános ismeretekre támaszkodva — röviden összefoglaljuk gyógyszerkincsünk legfontosabb csoportjainak gyakorlati spektrofotometriás analízisét. Az anyagnak 16 alfejezetre való bontása természetesen nem tudta teljesen kiküszöbölni az önkényességet és a szubjektivitást. Bár arra törekedtünk, hogy a lehetőség szerint kémiailag egységesen tárgyalható anyagok kerüljenek egy fejezetbe, ez alól bizonyos esetekben (elsősorban vitaminok, antibiotikumok) a hatástani szempontok mint rendszerező elv előtérbe kerülése miatt kivételt kellett tenni. Hangsúlyozni szeretnénk, hogy könyvünk jellege és terjedelmi korlátai semmi esetre sem tették lehetővé a teljességre való törekvést: számos kisebb gyógyszercsoporttal egyáltalán nem foglalkozunk, s az egyes tárgyalt fejezeteken belül sem törekedtünk valamennyi odatartozó gyógyszer spektrofotometriás analízisének tárgyalására.

Könyvünk már említett jellege és az ebből következő terjedelmi korlátok azt sem tették lehetővé, hogy még a tárgyalt vegyületcsaládok spektrofotomeriás analízise területén is akárcsak megközelítőleg is a teljességre törekedjünk. Ez a korlátozás több vonatkozásban is jelentkezik.

A 10. fejezet 16 alfejezetének irodalomjegyzékeiben található mintegy 1500 irodalmi hivatkozás csekély törtrészét képezi az illető vegyületcsaládok spektrofotometriás analízisével a kezdetektől napjainkig publikált cikkek számának. Az idézett publikációk kiválasztásánál csupán azt a szerény célkitűzést kívántuk megvalósítani, hogy az egyes fejezetek áttanulmányozása során az olvasó képet kapjon arról, mik a vegyületcsalád analitikájának ma is több-kevesebb jelentőséggel bíró módszerei, ill. milyen lehetőségek vannak az egyes gyógyszereknek a kor követelményeinek megfelelő színvonalú spektrofotometriás analízisére. Gyógyszerek spektrofotometriás analízisének régi irodalmát illetően kiváló monográfiák állnak rendelkezésre, amelyek közül különösen KAKAC és VEJDELEK, valamint PESEZ és BARTOS, továbbá SNELL és SNELL műveit emeljük ki,* de számos más, nem kifejezetten spektrofotometriás jellegű általános gyógyszer-analitikai könyv spektrofotometriás fejezetei is bő forrását jelentik a szakterület régi, sok esetben ugyan elavult, de gyakran még ma is igen hasznosan tanulmányozható irodalmának. A leírtak miatt az általunk idézett irodalomban csak

* Lásd az 1. fejezet irodalomjegyzékének [11, 12, 17, 22, 28] hivatkozásait.

ritkán nyúltunk vissza az idézett monográfiák által lefedett régebbi szakirodalomhoz: elsősorban az utolsó 15—20 év, azon belül is súlypontilag a legutóbbi évek irodalmára koncentráltunk. Ez az önkorlátozás is felvetett azonban több problémát. Az említett időszakban ui. a spektrofotometriás gyógyszeranalízisben publikált irodalom mennyiségi súlypontja nagymértékben áttolódott a kevéssé fejlett, ill. fejlődő országokba, ami a közlési fórumokat illetően azt eredményezte, hogy túlsúlyba kerültek a nehezen hozzáférhető kelet-európai, indiai, kínai stb. folyóiratokban publikált cikkek. Hogy az olvasó számára a részletesebb tájékozódást megkönnyítsük, az idézett irodalom kiválasztásánál fontos szempontnak tekintettük az idézett publikáció hozzáférhetőségét is. A nehezen hozzáférhető nyelven és helyen történt publikációk túlsúlya azonban olyan nagy a legutóbbi évek irodalmában, hogy még ezek mellett az erőfeszítések mellett is igen sok ilyen publikációt idézünk a következő alfejezetekben.

Egy másik probléma ui., hogy a régi, sőt egészen régi irodalom tanulmányozása az utolsó 15—20 évben publikált módszerek nagy része esetén is azt mutatja, hogy ezeknek a módszereknek megvolt a korai elődje, s a különbségek gyakran nem is számottevőek. Mivel terjedelmi okokból lehetetlen volt egy-egy módszer fejlődésének a teljes történetét bemutatni, olvasónk csak akkor kaphat teljes képet egy-egy módszer lehetőségeiről és korlátairól, ha az idézett monográfiákban, ill. a könyvünkben nem idézett korábbi publikációkban is utána néz a kérdésnek.

Az idézett módszerek kiválasztásánál, a módszerek korszerűségének megítélésénél fontos szempontnak tekintettük, hogy a mai gyógyszerkönyvekben szereplő módszerek kiemelten kerüljenek bemutatásra. E tekintetben a legújabb kiadású brit és amerikai gyógyszerkönyveket tekintettük kiindulási alapnak.

Mivel az idézett publikációk kiválasztását még az ismertetett korlátozó szempontok mellett is a bőség zavara nehezítette, további korlátozó elvnek tekintettük a következőket:

1. Lehetőség szerint csak olyan módszerek kerüljenek bemutatásra vagy legalábbis azokra helyezzük a súlyt, amelyek stabilis, egyértelmű és ismert kémiai alapokon nyugszanak.

2. Csupán kvantitatív analitikai módszerekkel foglalkozunk; nem tárgyaljuk a kvalitatív analitikai, azonosítási célokra szolgáló színreakciókat.

3. Bár könyvünk témakörétől nem idegen gyógyszerek meghatározása emberi, állati vagy növényi mintákban (lásd 9.8. és 9.9. fejezet), annak fő vonalát mégis gyógyszeralapanyagok és gyógyszerkészítmények vizsgálata képezi, így a 10. fejezetben is szerényebb szerephez jutnak a biológiai minták vizsgálatával foglalkozó közlemények.

4. Az 5. fejezetben összefoglaltuk a kromatográfiás elválasztással kapcsolatos spektrofotometriás módszereket. A 10. fejezet példái között denzitometriás módszerek egyáltalán nem szerepelnek és az oszlop-, ill. vékonyréteg-kromatográfiás elválasztás utáni spektrofotometriás módszerek is csak akkor kerülnek említésre, ha ez utóbbinak külön érdekessége van.

5. Az egyes meghatározási módszerek tárgyalása során még a legfontosabb módszerek esetében sem nyílik lehetőség az eljárás receptszerű leírására; ilyen tekintetben az idézett publikációkra utalunk.

A 10. fejezet egyes alfejezeteiben tárgyalt vegyületcsoportok spektrofotometriás analízisének tárgyalása során először minden esetben a saját fényelnyelésre alapozott módszereket ismertetjük (messzemenően támaszkodva és hivatkozva a 3. fejezetben ismertetett szerkezet—spektrum összefüggésekre). Ezt követik — amennyiben ilyen rendelkezésre áll — az ugyancsak saját fényelnyelésre alapozott különböző algebrai és derivatív spektrofotometriás módszerek (lásd. 4. fejezet). Az egyes alfejezetek második részében a kémiai reakciókra alapozott módszerek kerülnek bemutatásra. Miután a fontosabb módszerek elvi alapjait a 7. fejezetben már bemutattuk, erre a fejezetre gyakran hivatkozunk a részletes tárgyalás során.

10.2. Fenil-alkil-aminok és oxi-fenil-alkil-aminok

10.2.1. Meghatározás saját fényelnyelés alapján

Ebben a fejezetben olyan vegyületek spektrofotometriás meghatározását tárgyaljuk, ahol a molekula egyetlen kromofor csoportja a fenilcsoport, amelyet szénlánc (általában két szénatom) választ el az aminocsoporttól. Ez utóbbi lehet primer aminocsoport (amfetamin), szekunder aminocsoport (efedrin, adrenalin), tercier (difenhidramin), ill. heterociklusos tercier amin is (klemasztin). A fenilcsoport általában szubsztituálatlan, de itt tárgyaljuk a fenol-jellegű 3-hidroxi (fenilefrin), 4-hidroxi (bametan), 3,4-dihidroxi (adrenalin, noradrenalin, izoprenalin), 3,5-dihidroxi (terbutalin) és 1,4-dihidroxi-éter (pramoxin) származékokat is. Külön említést érdemelnek a szénlánc α-helyzetében hidroxilcsoportot tartalmazó származékok (efedrin, izoprenalin), valamint az aromás gyűrű(ke)t benzhidril-éter formájában tartalmazó származékok (difenhidramin, klemasztin).

Az ismertetett vegyülettípusok közül elsősorban a fenolos hidroxilcsoportot tartalmazók rendelkeznek közvetlen analitikai meghatározást lehetővé tevő saját ultraibolya fényelnyeléssel.

A vegyületcsaládhoz tartozó fenol jellegű anyagok meghatározására az USP XXII-ben pl. a következő közvetlen spektrofotometriás módszerek hivatalosak. Isoptorenol tabletta meghatározása extrakció után 279 nm-nél hajtható végre [88h]. Pramoxin-hidroklorid meghatározását zselé készítményből savas extrakció, az extraktum éteres mosása, majd a vizes fázis lúgosítása és a lúgos közegből végzett éteres extrakció majd vizes savba való visszarázás után 286 nm-nél végzik el [88r]. Az esetleg fellépő háttérproblémákat alapvonal korrekció segítségével küszöbölik ki (lásd 4.3.2. fejezet), mint pl. a fenilefrin injekció esetében [88p] vagy kromatográfiás elválasztás után végzik el a spektrofotometriás mérést, mint pl. az isoxsuprin-hidroklorid injekció esetében 275 nm-nél [88i].

A csupán izolált aromás gyűrű(ke)t tartalmazó származékok közvetlen spektrofotometriás meghatározásának lehetőségei az alacsony moláris abszorpciós koefficiens ($\varepsilon < 1000$) következtében természetesen szerényebbek, ill. a meghatározásnál számos

zavaró tényezővel kell számolni. Ennek ellenére találkozhatunk ilyen módszerekkel, különösen két fenilcsoportot tartalmazó származékok esetében. Így pl. propoxifen kapszula, ill. ciklizin tabletta meghatározását extrakció után 257, ill. 264 nm-nél végzik el [88 s,e], az injekciók közül pl. a ketamin injekció hatóanyag-tartalmát extrakció után 269 nm-nél [88j], a fenmetrazin tablettáét pedig lúgos közegből való extrakció, majd vizes sósavba való visszarázás után 256 nm-nél [88o]. A meghatározás érzékenysége jelentősen növelhető, ha a mérést a nagyobb intenzitású aromás *p*-sáv maximumán végezzük. Az ilyen módszerek azonban csak akkor tekinthetők megbízhatónak, ha a mérést 220 nm felett tudjuk elvégezni. Ilyen megoldás pl. a bromodifenhidramin kapszula „content uniformity" vizsgálata 228 nm-nél [88c].

A BP 1988-ban hivatalos módszerek közül megemlítjük noradrenalin meghatározását injekcióban hígítás és 279 nm-es mérés után [10a], valamint ciklizin meghatározását tabletta és injekciós készítményben 225 nm-en való mérés alapján [10b], az utóbbi esetben éteres extrakció, majd az éteres fázis kénsavas—vizes extrakciója után.

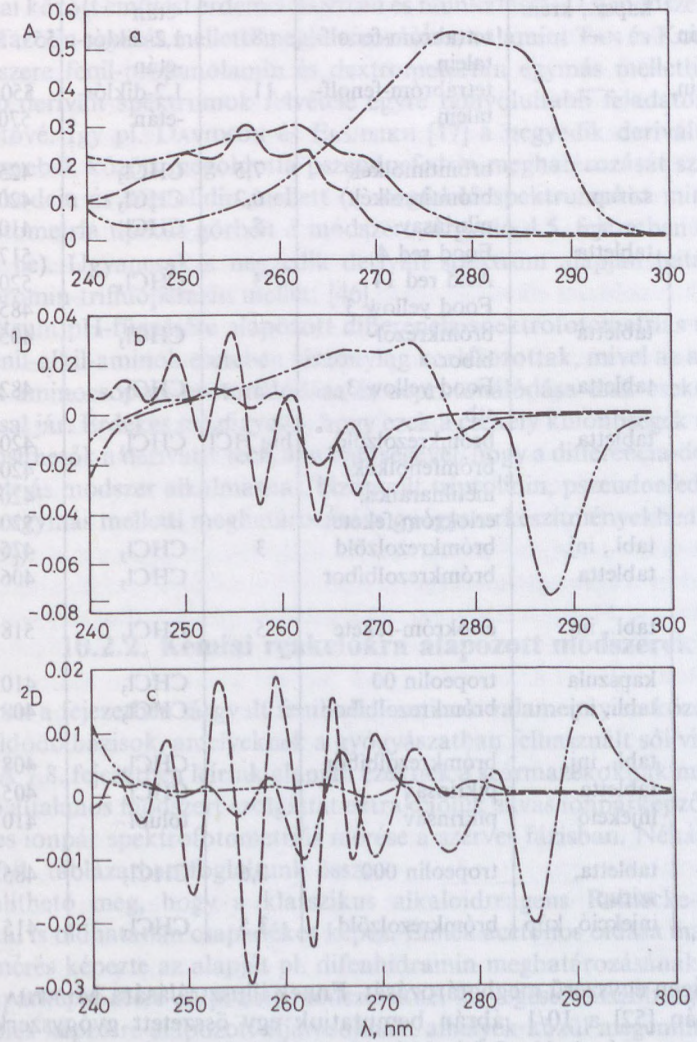
A gyakran fellépő háttérproblémák kiküszöbölése céljából időnként előzetes oszlopkromatográfiás elválasztást alkalmaznak, mint pl amfetamin-szulfát alapanyag és tabletta esetében [88a]. Sokszor használnak (egyes esetekben kromatográfiás elválasztással kombinálva) algebrai háttérkorrekciós módszereket is, így pl. a 4.3.2. fejezetben leírt megoldások közül az egyszerű két hullámhosszas mérést (amfetamin-szulfát esetében számolás $(A_{257}-A_{280})$-ból, maprotilin-hidroklorid tabletta esetében pedig $(A_{273}-A_{300})$-ból [88 a,k]).

A leírtnál természetesen sokkal hatásosabb az 5-5 hullámhosszon történő mérésen és ortogonális polinomokkal való számoláson alapuló módszer, ami nemcsak háttérproblémák megoldását tette lehetővé, hanem Korany és munkatársai szerint [45] olyan kényes feladatok megoldását is, mint efedrin és difenhidramin egymás melletti meghatározása gyógyszerkészítményekben.

A háttérkorrekcióra használatos módszerek közül a derivatív spektrofotometria kiemelkedően jó lehetőségeket biztosít az ebben a fejezetben tárgyalt benzolszármazékok meghatározására. Az alapspektrumok intenzitásai ugyan itt meglehetősen alacsonyak, a meredek szakaszokban gazdag és finomszerkezettel rendelkező spektrumok deriváltjai megfelelően érzékeny és szelektív meghatározásokat tesznek lehetővé. Mivel (amint azt a 4.5. fejezetben kifejtettük) megfelelően magas rendű derivált spektrumok felvételével többféle típusú háttérhatás kiejthető, ez a módszer előzetes elválasztás nélkül is számos gyakorlati feladat megoldását teszi lehetővé kiszerelt gyógyszerkészítmények körében: ez tekinthető a derivatív spektrofotometria legfontosabb gyógyszer-analitikai alkalmazási területének.

Az erről a területről megjelent legszélesebb körű publikáció Davidson és Hassan [18], valamint Abdel-Khalek és munkatársai [1] dolgozata, akik egyebek között trihexifenidil, klórciklizin, ciklizin, debrizokin, difenhidramin, metadon, orfenadrin és tolazolin meghatározását írták le tabletta és kapszula készítményekben a második derivált spektrofotometria segítségével. Ugyancsak a második derivált spektrumot használta fel Milch és Szabó [50] prenilamin és fendilin tablettákban való meghatározására, Fell és munkatársai [37] difenhidraminnak szirupban való meghatározására, valamint Bedair és munkatársai [7] klemasztin fumarátot tartalmazó tabletta, injekció és szirup meghatározására.

A derivatív spektrofotometriás módszer nem csak háttérproblémák megoldását teszi lehetővé fenil-alkil-aminok körében. A rendkívül strukturált „ujjlenyomatszerű" második derivált spektrumok sokkal alkalmasabbak szerkezetileg hasonló származékok közötti kvalitatív különbség tételére, mint az alapspektrumok, amit LAWRENCE és MACNEIL [47] eredményesen használt ki amfetamin, fenil-etil-amin, fentermin, efedrin és meperidin megkülönböztetésére. Ugyancsak a derivatív spektrumok finomszerkezetében fellelhető különbségek teszik lehetővé összetett gyógyszerké-



10/1. ábra. Spektrumok ψ-efedrin-hidroklorid (0,3 mg/ml), klórfeniramin-maleát (0,02 mg/ml) és dextrometorfan-hidrobromid (0,1 mg/ml) egymás melletti meghatározásához. Oldószer: acetátpuffer; pH 5. ψ-efedrin-hidroklorid – – – – klórfeniramin-maleát – . – . – . dextrometorfan-hidrobromid – . . – . . – . .

a) Alapspektrumok; *b)* Első derivált spektrumok; *c)* Második derivált spektrumok. (J. L. MURTHA, T. N. JULIAN, G. W. RADEBAUGH, J. Pharm. Sci. 77, 715 (1988) [52])

10/1. táblázat. Néhány ionpár-extrakción alapuló módszer fenil-alkil-aminok meghatározására

Vegyület	Készítmény	Reagens	pH	Extraháló oldószer	Hullámhossz, nm	Irodalom
Difenhidramin	kapsz., inj.	brómkrezolzöld		$CHCl_3$	415	[48]
Difenhidramin	kapsz., inj. elixír	dipikrilamin	5	$CHCl_3$	420	[75]
Difenhidramin	tabl., inj. kapsz., krém	metilnarancs	5	1,2-diklór-etán	422	[22]
Difenhidramin	—	tetrabróm-fenolftalein	8	1,2-diklór-etán	553, 573	[53]
Metamfetamin, metilefedrin, efedrin	—	tetrabróm-fenolftalein	11	1,2-diklór-etán	550, 570	[58]
Efedrin	—	brómtimolkék	7,5	$CHCl_3$	425	[55]
Efedrin	szirup	brómtimolkék	6,2	$CHCl_3$	420	[15, 16]
Efedrin	—	pikrinsav	5	$CHCl_3$	410	[82]
Prociklidin	tabletta	Food red 4 Acid red 14 Food yellow 3	3	$CHCl_3$	517 520 485	[57]
Prociklidin	tabletta	brómkrezolbíbor		$CHCl_3$	405	[88m]
Verapamil, oxifedrin	tabletta	Food yellow 3 stb.	3	$CHCl_3$	482	[65]
Oxifedrin	tabletta	brómkrezolzöld, brómfenolkék, metilnarancs, eriokróm-fekete	híg HCl	$CHCl_3$	420 420 420 520	[64]
Meperidin	tabl., inj.	brómkrezolzöld	3	$CHCl_3$	425	[35]
Klemasztin-fumarát	tabletta	brómkrezolbíbor		$CHCl_3$	406	[88d]
Klemasztin-fumarát	tabl., inj.	eriokróm-fekete	5	$CHCl_3$	518	[83]
Loperamid	kapszula	tropeolin 00		$CHCl_3$	410	[87]
Tridihexetil-klorid	tabl., inj.	brómkrezolbíbor		$CHCl_3$	408	[88t]
Biperiden	tabl., inj.	brómkrezolbíbor		$CHCl_3$	408	[88b]
Metilfenidát	tabletta	pikrinsav		$CHCl_3$	405	[88l]
Orfenadrin-citrát	injekció	pikrinsav		toluol	410	[88n]
Pentoxiverin-citrát	tabletta, szirup	tropeolin 000	2,6	$CHCl_3$	485	[95]
Tilidin	injekció, kúp	brómkrezolzöld	3,5	$CHCl_3$	415	[97]

szítmények igen egyszerű meghatározását. Ennek illusztrálására MURTHA és munkatársai nyomán [52] a 10/1. ábrán bemutatjuk egy összetett gyógyszerkészítmény három komponensének (ψ-efedrin-hidroklorid, klórfeniramin-maleát és dextrometorfan-hidrobromid) alapspektrumait (10/1*a* ábra), ugyanezek első deriváltjait (10/1*b* ábra) valamint a második deriváltakat (10/1*c* ábra). Látható, hogy az alapspektrumok alapján csak a dextrometorfan-hidrobromid szelektív meghatározása lenne lehetséges, a másik két átfedő spektrumú komponensé semmi esetre sem. Az első,

különösen pedig a második derivált spektrumokban már annyi különbözőség található, hogy ezen az alapon, különösen többkomponensű elegyek analízisére programozott mikrokomputerrel ellátott spektrofotométer segítségével mindhárom komponens szimultán meghatározása elvégezhető. (ψ-efedrin-hidroklorid és klórfeniramin-maleát egymás melletti meghatározására hasonló elvek alapján már az első derivatív spektrum is elegendőnek bizonyult [40].) A második derivált spektrumnak összetett gyógyszerkészítmények hatóanyag-tartalmának meghatározására szolgáló sikeres alkalmazásai között említést érdemel SANTONI és munkatársai [73] módszere difenhidramin és nafazolin egymás melletti meghatározására, valamint TAN és KOLMONPUNPORN [84] módszere fenil-propanolamin és dextrometorfan egymás melletti mérésére. A magasabb derivált spektrumok felvétele egyre bonyolultabb feladatok megoldását teszi lehetővé. Így pl. DAVIDSON és ELSHEIKH [17] a negyedik derivált spektrumok alapján egyebek között megoldotta pszeudoefedrin meghatározását szirupkészítményekben kodein és triprolidin mellett (a megfelelő spektrumokat mint a derivatív spektrofotometria tipikus görbéit a módszert tárgyaló 4.5. fejezetben a 4/19. ábrán mutattuk be). Ugyancsak a negyedik derivált spektrum alapján határozható meg tranylcypromin trifluoperazin mellett [46].

A spektrum pH-függésére alapozott differencia-spektrofotometriás módszer lehetőségei fenil-alkil-aminok esetében viszonylag korlátozottak, mivel az aromás gyűrűtől izolált aminocsoport protonálódása és deprotonálódása csak csekély spektrumeltolódással jár. Érdekes megfigyelés, hogy ezek a csekély különbségek olyan mértékben felerősíthetők a derivatív technika segítségével, hogy a differencia-derivatív spektrofotometriás módszer alkalmasnak bizonyult triprolidin, pszeudoefedrin és dextrometorfan egymás melletti meghatározására gyógyszerkészítményekben (DAVIDSON és MKOJI [19]).

10.2.2. Kémiai reakciókra alapozott módszerek

Az ebben a fejezetben tárgyalt fenil-alkil-aminok valamennyien középerős, vízben rosszul oldódó bázisok, amelyeknek a gyógyászatban felhasznált sói viszont vízoldékonyak. A 7.8. fejezetben leírtak alapján ezeknek a származékoknak meghatározására kitűnő általános módszert szolgáltat extrakciójuk savas ionpárképző reagensekkel és a színes ionpár spektrofotometriás mérése a szerves fázisban. Néhány ilyen módszert a 10/1. táblázatban foglaltunk össze.

Itt említhető meg, hogy a klasszikus alkaloidreagens Reinecke-só fenil-alkil-aminokkal is oldhatatlan csapadékot képez. Ennek acetonos oldása majd 540 nm-nél végzett mérés képezte az alapját pl. difenhidramin meghatározásának [42].

Az ionpárképződésre alapozott módszereknél lényegesen kisebb a jelentőségük a fémkomplex képzésre alapozott eljárásoknak, amelyek közül megemlítjük adrenalin meghatározását vas(II)komplexe alakjában 530 nm-nél [88g], ill. a vas(III)-kloridpiridin reagenssel képzett komplexének 590 nm-nél végzett mérése alapján [90]. Réz(II)ionokkal és hidroxil-aminnal képződő, butanollal extrahálható komplexének 415 nm-nél végzett mérése alapján végezhető el fenilefrin meghatározására [20], szalbutamol-szulfátot, ill. fenilefrint pedig réz(II)komplex alakjában való méréshez

salétromossavval át kell alakítani a komplexképzésre alkalmas *o*-nitrozo-fenol-származékká [13, 21]. Az ismertetett, fenolos hidroxilcsoportok jelenlétét feltételező módszereken túlmenően megemlítjük az észtercsoportot tartalmazó meperidin meghatározását hidroxámsavvá való átalakítás után vas(III)komplexe alakjában (lásd 7.7. fejezet [38]).

Töltésátviteli komplexek képzésére alkalmas reagensek közül (lásd 7.9. fejezet) elsősorban klóranil került felhasználásra fenil-alkil-aminok körében pl. efedrin és fenilefrin [5], adrenalin és noradrenalin [96, 4], maprotilin [34] meghatározására.

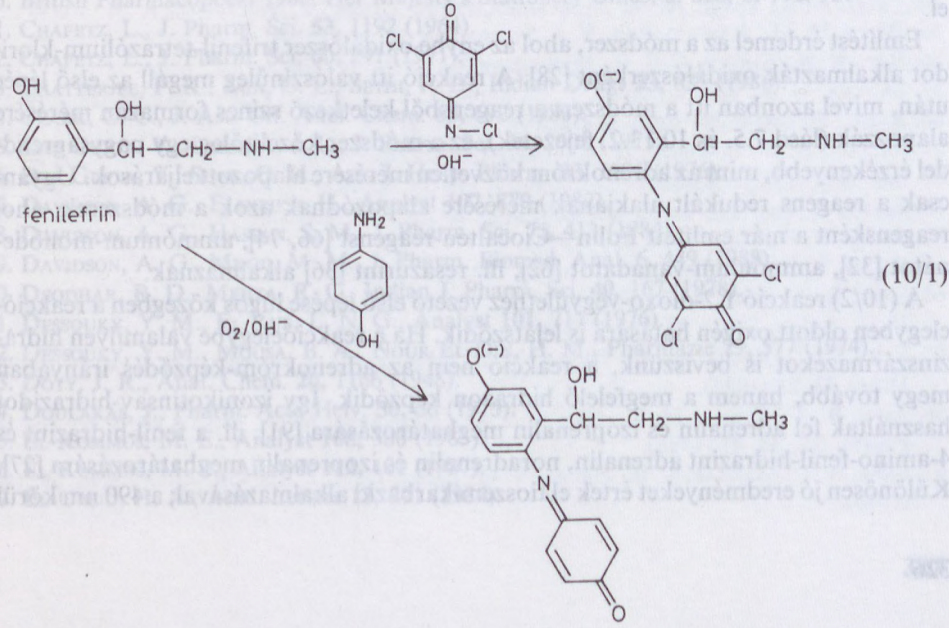
Mind az ionpár-extrakcióra, mind pedig a töltésátviteli komplex képzésére alapozott módszerek tulajdonképpen a fenil-alkil-aminok aminocsoportját mérik. Amennyiben ez az aminocsoport primer amin, akkor a 7.4. fejezetben leírtak szerint spektrofotometriásan aktív aldehid vagy keton reagensekkel végrehajtott Schiff-bázis képzés segítségével a meghatározás elvégezhető. Így amfetamin meghatározását szalicilaldehid [49] és aszkorbinsav [8] reagensekkel, noradrenalin meghatározását 4-dimetil-amino-fahéjaldehiddel [94], vanillinnel [61], ill. ánizsaldehiddel és benzaldehiddel [63] való reakció után írták le. Mivel ezt a reakciót természetesen a magasabb rendű aminok nem adják, a módszer alkalmas noradrenalin szelektív mérésére adrenalin mellett.

Ezeknek a módszereknek az a jelentőségük, hogy fenolos hidroxilcsoportot nem tartalmazó, tehát kémiai reakciók szempontjából kevesebb támadási pontot nyújtó származékok szelektív meghatározására nyújtanak lehetőséget. Ilyen módszerek még 2,4-dinitro-fluor-benzol reagens felhasználása fenfluramin, tranylcypromin, baklofen mérésére a hidrogén-fluorid kihasadása közben keletkező 2,4-dinitro-fenil-amino-származék 395 nm-nél történő mérése alapján [6, 80, 89] fenil-propanol-amin meghatározása 7-klór-nitro-benzo-furazannal kloroformos közegben lejátszódó kondenzáció és 455 nm-nél végrehajtott mérés alapján [81], difenhidramin mérése malonsav —ecetsavanhidrid reagenssel való kezelés után 334 nm-nél [43], amfetamin, ill. származékainak mérése Marquis-reagenssel (kénsavas formaldehid-oldat) való reakció után 460 nm-nél [3].

Külön említést érdemel az aromás gyűrű melletti szénatomon hidroxilcsoportot tartalmazó *β*-amino-származékok reakciója perjodátionnal, ami az ultraibolya tartományban jól mérhető benzaldehidhez, ill. a fenilgyűrű szubsztituensétől függő benzaldehid-származékhoz vezet. Ezt a klasszikus reakciót (lásd a (7/13) reakcióegyenlet a 7.5. fejezetben) számos előzmény után Chafetz [11, 12] vizsgálta meg részletesen. Megállapította, hogy a reakció akkor játszódik le, ha az aminocsoport nem tartalmaz elektronszívó szubsztituenseket, a fenilgyűrű pedig legfeljebb egy fenolos hidroxilcsoportot tartalmaz (dihidroxi-származékok esetében perjodát hatására nem hasadás, hanem a későbbiekben tárgyalandó adrenokróm képződés játszódik le). Így a módszer elsősorban efedrin és származékainak mérésére nyújt kitűnő, gyógyszerkönyvben is alkalmazott [88f] lehetőséget. A reakció szelektivitása lehetővé teszi meghatározását pl. az α-hidroxil-csoportot nem tartalmazó difenhidramin mellett [41]. A szelektivitás növelhető a differencia-spektrofotometriás módszer alkalmazásával: fenil-propanol-amint úgy lehetett mérni guaifenezin és dextrometorfan [85], ill. klórfeniramin és pirilamin [86] jelenlétében, hogy a perjodáttal oxidált oldatot mérték az oxidálatlan oldattal szemben. Érdekes a módszernek az a változata, ahol az oxidációt nátrium-perjodát-oldattal impregnált diatomaföldel töltött oszlopon végzik [14].

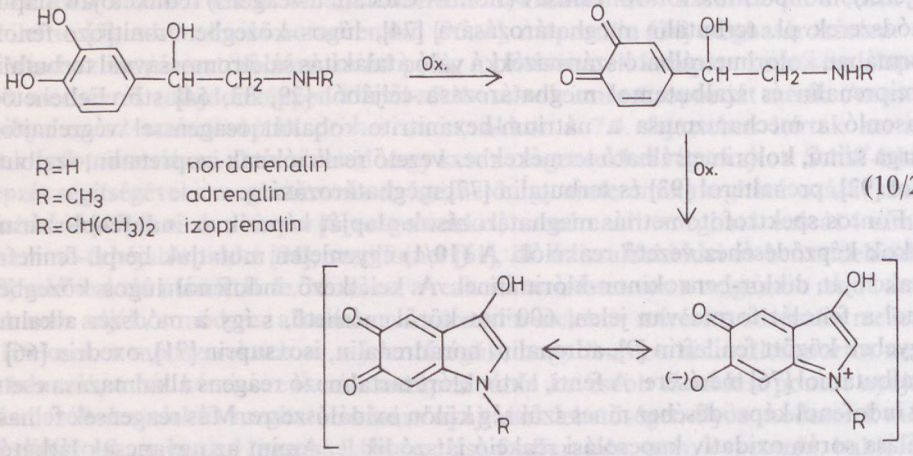
A fenolos hidroxilcsoportot, ill. csoportokat tartalmazó származékok analitikája természetesen sokkal gazdagabb többé-kevésbé szelektív spektrofotometriás módszerekben, mint az egyszerű fenilszármazékoké. Analitikájukban helyet kapnak a klasszikus fenolmeghatározási módszerek mint az azo-kapcsoláson alapuló módszer, ahol reagensként diazotált 4-nitro-anilint [44, 67, 78], szulfanilsavat [79], benzokaint [68] stb. alkalmaztak terbutalin, szalbutamol, isoxsuprin stb. meghatározására (lásd 7.4. fejezet), molibdo-foszfor-volfrámsav (Folin—Ciocalteu-reagens) redukcióján alapuló módszerek pl. terbutalin meghatározására [74], lúgos közegben *o*-nitrozo-fenolát formában kolorimetrálható származékká való átalakítás salétromossavval terbutalin, orciprenalin és szalbutamol meghatározása céljából [29, 33, 54] stb. Feltehetően hasonló a mechanizmusa a nátrium-hexanitrito-kobaltát reagenssel végrehajtott, sárga színű, kolorimetrálható termékekhez vezető reakcióknak izoprenalin, szalbutamol [92], prenalterol [93] és terbutalin [77] meghatározására.

Fontos spektrofotometriás meghatározások alapját képezik az indofenol-származékok képződéséhez vezető reakciók. A (10/1) egyenleten mutatjuk be pl. fenilefrin reakcióját diklór-benzokinon-klóriminnel. A keletkező indofenol lúgos közegben, ahol a fenolát forma van jelen, 600 nm körül mérhető, s így a módszer alkalmas egyebek között fenilefrin [9], adrenalin, noradrenalin, isoxsuprin [71], oxedrin [66] és szalbutamol [76] mérésére. A fenti, aktív klórt tartalmazó reagens alkalmazása esetén az indofenol képződéséhez nincs szükség külön oxidálószerre. Más reagensek felhasználása során oxidatív kapcsolási reakció játszódik le. Amint az ugyancsak látható a (10/1) reakcióegyenleten, 4-amino-fenol reagens alkalmazása esetén az oxidálószer szerepét a lúgos reakcióelegyben oldott oxigén tölti be. Ezt a módszert sikerrel alkalmazták fenilefrin [69], szalbutamol [70] és terbutalin [56] meghatározására. Az oxidatív kapcsolás reagenseként felhasználták még a 4-amino-antipirint is [39, 66]. Ez utóbbi reakcióval kapcsolatban érdemes megjegyezni, hogy azt kiterjesztették fenolos hidroxilt alapállapotban nem tartalmazó származékokra (pl. efedrin) is vas(III)ionok által katalizált előzetes hidrogén-peroxidos monohidroxilálás után [39].



(10/1)

A 3,4-difenol-származékok (adrenalin, noradrenalin, izoprenalin stb.) szelektív meghatározására kitűnő lehetőséget nyújt a difenolgyűrű könnyű oxidálhatósága. A fenti katecholaminok semleges vagy gyengén savas közegben a legkülönbözőbb oxidálószerek hatására első lépésben *orto*-kinonná oxidálódnak, majd ezek bonyolult oxidációs, gyűrűzárási és átrendeződési mechanizmus szerint átalakulnak vörös színű, spektrofotometriásan jól mérhető adrenokróm származékokká (10/2 egyenlet).



(10/2)

A reakciót a csupán egyetlen szabad fenolos hidroxilcsoportot tartalmazó, ill. 3,5-dihidroxi-származékok nem adják, hasonlóképpen nem adja a reakciót noradrenalin (R = H) sem, amennyiben oxidálószerként ezüst-oxidot használunk [30]. Más oxidálószerekkel mint hipobromit [24], bromát [51], szerves brómozó szerek [2] stb. ez utóbbi is meghatározható. A mérést általában semleges oldatban hajtják végre, ahol az abszorpciós maximum 485 nm körül van, és a moláris abszorpciós koefficiens néhány ezres érték; enyhén lúgos közegben a maximum 400 nm környékére tolódik el.

Említést érdemel az a módszer, ahol az enyhe oxidálószer trifenil-tetrazólium-kloridot alkalmazták oxidálószerként [28]. A reakció itt valószínűleg megáll az első lépés után, mivel azonban itt a módszert a reagensből keletkező színes formazán mérésére alapozzák (lásd 7.5. és 10.13.2. fejezetek), ez a módszer közelítőleg egy nagyságrenddel érzékenyebb, mint az adrenokróm közvetlen mérésére alapozott eljárások. Ugyancsak a reagens redukált alakjának mérésére alapozódnak azok a módszerek, ahol reagensként a már említett Folin—Ciocalteu-reagenst [66, 74], ammónium-molibdenátot [32], ammónium-vanadátot [62], ill. resazurint [36] alkalmaznak.

A (10/2) reakció 1,2-dioxo-vegyülethez vezető első lépése lúgos közegben a reakcióelegyben oldott oxigén hatására is lejátszódik. Ha a reakcióelegybe valamilyen hidrazinszármazékot is beviszünk, a reakció nem az adrenokróm-képződés irányában megy tovább, hanem a megfelelő hidrazon képződik. Így izonikotinsav-hidrazidot használtak fel adrenalin és izoprenalin meghatározására [91], ill. a fenil-hidrazint és 4-amino-fenil-hidrazint adrenalin, noradrenalin és izoprenalin meghatározására [27]. Különösen jó eredményeket értek el tioszemikarbazid alkalmazásával; a 490 nm körül

megjelenő abszorpciós sáv jó alapot nyújtott dobutamin érzékeny meghatározására ($\varepsilon = 17\,000$) [25], de felhasználták a módszert noradrenalin, adrenalin [60], valamint izoprenalin mérésére is [59].

Ugyancsak hidrazinszármazékkal való reakción alapulnak a 3-metil-benzotiazolin-2-on-hidrazon reagenst alkalmazó módszerek. Ezt a reagenst oxidálószerrel együtt adják a meghatározandó katecholaminhoz. Az oxidálószer szerepe nemcsak a fenol oxidációja, hanem a reagens átalakítása elektrofil szubsztitúcióra alkalmas ágenssé. Dobutamin meghatározása során, ahol az oxidálószer cerium(IV)-szulfát volt, a molekulában levő difenol- és monofenolgyűrű egyaránt reagál, ami érzékeny módszerhez vezet ($\varepsilon_{510\ nm} = 15\,000$) [26]. Terbutalin szulfát esetén vas(III)-kloridot alkalmaztak oxidálószerként ($\lambda_{max} = 478$ nm) [31]. Klóramin-T-t használva oxidálószerként és *N, N*-dimetil-*p*-fenilén-diamint reagensként isosuxprin esetében 620 nm-nél, terbutalin esetében pedig 500 nm-nél mérhető termékhez jutunk [72].

Irodalom

1. Abdel-Khalek, M. M., Abdel-Hamid, M. E., Mahrous, M. S., Abdel-Salam, M. A., Anal. Letters **18,** 781 (1985).
2. Abou Ouf, A., Walash, M. I., Salem, F. B., Analyst **106,** 949 (1981).
3. Agarwal, S. P., Chandrasekhara, N., Madu, A. U., Acta Pharm. Technolog. **27,** 181 (1981).
4. Al-Abachi, M. Q., Al-Ghabsha, T. S., Shahbaz, N. A., Microchem. J. **31,** 272 (1985).
5. Amer, M. M., Taha, A. M., El-Shabouri, S. R., Khashaba, P. Y., J. Ass. Off. Anal. Chem. **65,** 894 (1982).
6. Atmaca, S., Tosunoglu, S., Büyüktimkin, N., Sci. Pharm. **58,** 281 (1990).
7. Bedair, M. M., Korany, M. A., Issa, A. S., Analyst **133,** 1137 (1988).
8. Bhatkar, R. G., Nevrekar, V. N. S., Ind. Drugs. Pharm. Ind. **14,** 9 (1979).
9. Bhuee, G. S., Singh, J., Rastogi, S. N., J. Inst. Chem. (India) **55,** 229 (1983).
10. British Pharmacopoeia 1988, Her Majesty's Stationery Office, a. 828; b. 772, 926.
11. Chafetz, L., J. Pharm. Sci. **53,** 1192 (1964).
12. Chafetz, L., J. Pharm. Sci. **60,** 291 (1971).
13. Chatterjee, P. K., Jain, C. L., Sethi, P. D., Indian Drugs **23,** 635 (1986).
14. Clark, C. C., J. Ass. Off. Anal. Chem. **63,** 692 (1980).
15. Das Gupta, V., Lara, A. J. L., J. Pharm. Sci. **64,** 2001 (1975).
16. Das Gupta, V., Shek, O. H., Am. J. Hosp. Pharm. **33,** 1086 (1976).
17. Davidson, A. G., Elsheikh, H., Analyst **107,** 879 (1982).
18. Davidson, A. G., Hassan, S. M., J. Pharm. Sci. **73,** 413 (1984).
19. Davidson, A. G., Mkoji, M. M., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 449 (1988).
20. Deodhar, R. D., Mehta, R. C., Indian J. Pharm. Sci. **40,** 167 (1978).
21. Dessouky, Y. M., El Rub, L. N. G., Analyst **101,** 717 (1976).
22. Dessouky, Y. M., Mousa, B. A., Nour El-Din, H. M., Pharmazie **29,** 577 (1974).
23. Doty, J. R., Anal. Chem. **20,** 1166 (1948).
24. Doulakas, J., Pharm. Acta Helv. **50,** 66 (1975).
25. El-Kommos, M. E., Analyst **108,** 380 (1983).
26. El-Kommos, M. E., Analyst **112,** 101 (1987).
27. El-Obeid, H. A., Anal. Letters **17,** 771 (1984).

28. El-Rabbat, N. A., Omar, N. M., J. Pharm. Sci. **67,** 779 (1978).
29. El-Sadek, M. E., Abdel Latef, H. E., Aboul Kheir, A., J. Ass. Off. Anal. Chem. **70,** 568 (1987).
30. El-Shabouri, S. R., Hussein, S. A., Abdel-Alim, A.-A. M., J. Ass. Off. Anal. Chem. **71,** 764 (1988).
31. El-Yazbi, F. A., Abdel-Hay, M. H., Korany, M. A., Farmaco, Ed. Pr. **40,** 50 (1985).
32. Emmanuel, J., Mathew, R., East Pharm. **28,** 129 (1985).
33. Emmanuel, J., Shetty, A. R., Indian Drugs **21,** 402 (1984).
34. Ersoy, L., Alpertunga, B., Analyst **113,** 1745 (1988).
35. Farsam, H., Nadjari-Moghaddam, M. R., J. Pharm. Biomed. Anal. **2,** 543 (1984).
36. Fatma, B. S., J. Pharm. Belg. **41,** 35 (1986).
37. Fell, A. F., Scott, H. P., Gill, R., Moffat, A. C., J. Pharm. Pharmacol. **34,** (Suppl) 99 (1982).
38. Giridhar, R., Menon, S., Agrawal, Y. K., Indian J. Pharm. Sci. **49,** 32 (1987).
39. Halmekoski, J., Karki, A., Farm. Aikak **85,** 125 (1976).
40. Hoover, J. M., Soltero, R. A., Bansal, P. C., J. Pharm. Sci. **76,** 242 (1987).
41. Kagan, F. E., Mitchenko, F. A., Kirichenko, L. A., Koget, T. A., Farm. Zh. **1980,** 46.
42. Kar, A., Aniuha, G. I., J. Pharm. Sci. **70,** 690 (1981).
43. Kasture, A. V., Wadodkar, S. G., Bulbule, M. V., Tajne, M. R., Indian Drugs **22,** 42 (1984).
44. Kelly, C. A., Auerbach, M. E., J. Pharm. Sci. **50,** 490 (1961).
45. Korany, M. A., Bedair, M., El-Yazbi, F. A., Analyst **111,** 41 (1986).
46. Knochen, M., Altesor, C., Dol, I., Analyst **114,** 1303 (1989).
47. Lawrence, A. H., MacNeil, J. D., Anal. Chem. **54,** 2385 (1982).
48. Maghssoudi, R. H., Fawzi, A. B., Meerkalaiee, M., Aldeen, M., J. Ass. Off. Anal. Chem. **60,** 926 (1977).
49. McCoubrey, A., J. Pharm. Pharmacol. **8,** 442 (1956).
50. Milch, Gy., Szabó É., Analusis **16,** 59 (1988).
51. Mohamed, W. I., Salem, F. B., Anal. Letters **17,** 191 (1984).
52. Murtha, J. L., Julian, T. N., Radebaugh, G. W., J. Pharm. Sci. **77,** 715 (1988).
53. Ohno, N., Sakai, T., Bunseki Kagaku **30,** 398 (1981).
54. Patel, R. B., Patel, A. A., Pattani, U., Indian Drugs **24,** 298 (1987).
55. Popov, D. M., Raschetnova, V. I., Farmatsiya **28,** 33 (1979).
56. Rao, K. E., Sastry, C. S. P., Microchem. J. **32,** 293 (1985).
57. Sadana, G. S., Kunhipurayil, P. S., Sane, R. T., J. Indian Chem. Soc. **63,** 238 (1986).
58. Sakai, T., Ohno, N., Analyst **112,** 149 (1987).
59. Salama, R. B., El-Obeid, H. A., Analyst **101,** 136 (1976).
60. Salama, R. B., Wahba Khalil, S. K., J. Pharm. Sci. **63,** 1301 (1974).
61. Salem, F. B., Anal. Letters **18,** 1063 (1985).
62. Salem, F. B., Talanta **34,** 810 (1987).
63. Salem, F. B., Walash, M. I., Analyst **110,** 1125 (1985).
64. Sane, R. T., Joshi, S. K., Pandit, U. R., Doshi, V. J., Sawant, S. V., Jukar, S., Nayak, V. G., Indian Drugs **21,** 165 (1984).
65. Sane, R. T., Kubal, M. L., Nayak, V. G., Malkar, V. B., Banawalikar, V. J., Indian Drugs **22,** 25 (1984).
66. Sane, R. T., Kubal, M. L., Nayak, V. G., Nadkarni, A. D., Zarapkar, S. S., Ind. J. Pharm. Sci. **48,** 47 (1986).
67. Sane, R. T., Malkar, V. B., Nayak, V. G., Sapre, D. S., J. Ass. Off. Anal. Chem. **69,** 186 (1986).

68. Sane, R. T., Nayak, V. G., Malkar, V. B., Talanta **32,** 31 (1985).
69. Sane, R. T., Narkar, V. S., Indian Drugs **18,** 23 (1980).
70. Sane, R. T., Thombare, C. H., Ambardekar, A. B., Sathe, A. Y., Indian Drugs **19,** 195 (1982).
71. Sankar, D. G., Sastry, C. S. P., Reddy, M. N., Prasad, S. N. R., Ind. J. Pharm. Sci. **49,** 69 (1987).
72. Sankar, D. G., Sastry, C. S. P., Reddy, M. N., Singh, N. R. P., Indian Drugs **24,** 410 (1987).
73. Santoni, G., Mura, P., Pinzauti, S., Gratteri, P., La Porta, E., Internat. J. Pharm. **50,** 75 (1989).
74. Sethia, M. M., Ind. J. Pharm. Sci. **45,** 30 (1983).
75. Shamsa, F. A., Maghssoudi, R. H., J. Pharm. Sci. **65,** 761 (1976).
76. Shingbal, D. L., Naik, S. D., Can. J. Pharm. Sci. **16,** 65 (1981).
77. Shingbal, D. M., Agni, R. M., Indian Drugs **20,** 167 (1983).
78. Shingbal, D. M., Joshi, S. V., Indian Drugs **21,** 398 (1984).
79. Shingbal, D. M., Naik, R. R., Indian Drugs **22,** 273 (1985).
80. Shingbal, D. M., Rao, V. R., Indian Drugs **23,** 228 (1986).
81. Street, K. W., Abrenica, M. B., Anal. Letters **19,** 597 (1986).
82. Subert, J., Ceskosl. Farm. **34,** 116 (1985).
83. Sulkowska, J., Rynarzewska, G., Malecki, F., Pharmazie **44,** 862 (1989).
84. Tan, H. S. I., Kolmonpunpron, M., Anal. Chim. Acta **226,** 159 (1989).
85. Tan, H. S. I., Salvador, G. C., Anal. Chim. Acta **176,** 71 (1985).
86. Tan, H. S. I., Salvador, G. C., Anal. Chim. Acta **188,** 295 (1986).
87. The United States Pharmacopoeia XXI, USP Convention Inc., Rockville, Md., 1985, 605 old.
88. The United States Pharmacopoeia XXII, USP Convention Inc., Rockville Md., 1990. a. 85, 1530; b. 176; c. 188; d. 318; e. 366; f. 499; g. 504; h. 734; i. 744; j. 747; k. 804; l. 874; m. 888; n. 987; o. 1058; p. 1070; r. 1122, 1544; s. 1168; t. 1405.
89. Tosunoglu, S., Büyüktimkin, N., Arch. Pharm. **322,** 445 (1989).
90. Trublin, F., Robert, H., Guyot-Hermann, A. M., Bull. Soc. Pharm. Lille **32,** 161 (1976).
91. Vanaclocha, J., Sanchez, M., Thomas, J., Ars Pharm. **19,** 115 (1978).
92. Wahbi, A.-A.-M., Abdine, H., Korany, M., Abdel-Hay, M. H., J. Ass. Off. Anal. Chem. **61,** 1113 (1978).
93. Wahbi, A.-A. M., Mohamed, M. E., Gad Kariem, E. R. A., Aboul-Enein, H. Y., Analyst **108,** 886 (1983).
94. Walash, M. I., Abou, Ouf, A., Salem, F. B., J. Ass. Off Anal. Chem. **68,** 91 (1985).
95. Weclawska, K., Regosz, A., Pharmazie **42,** 483 (1987).
96. Zakhari, N. A., Salem, F. B., Rizk, M. S., Farmaco, Ed. Prat. **42,** 103 (1987).
97. Zivanov-Stakic, D., Solomun, L., Zivanovic, L., Acta Pharm. Hung. **60,** 179 (1990).

10.3. Szalicilsav és származékai

10.3.1. Meghatározás saját fényelnyelés alapján

A szalicilsavnak etanolban 205, 236 és 303 nm-nél van abszorpciós maximuma (lásd 94. oldal és 3/7. táblázat). Az utóbbi két hullámhossz alkalmas kvantitatív mérésekre. A módszert számos, szalicilsavat tartalmazó készítmény vizsgálatára használták.

Clayton és Thiers a szalicilsav-, szalicilamid-, koffein- és fenacetintartalmú tabletták és porok hatóanyagainak direkt spektrofotometriás meghatározását közlik [7]. Heise és Pfeiffer a szalicilsavat 308 nm-en amidopirin, fenazon, fenacetin és koffein mellett mérték [23]. Van de Vaart és munkatársai krémekből határoztak meg szalicilsavat és metil-szalicilátot tripelennamin hidroklorid, rezorcin és kliokinol mellett. Az egyes komponensek mérését 5 különböző oldószerben végezték [54]. Krzek a szalicilsavtartalmú készítményeket izopropanollal, majd 15%-os nátrium-hidroxiddal extrahálta és a szalicilsavat 298 nm-en mérte. Tejsav, benzoesav, vazelin, lanolin nem zavarta a meghatározást [32]. Zhou és Yang a nátrium-szalicilátot, fenazont és koffeint mérte egymás mellett, elválasztás nélkül 272, 302 és 326,8 nm-en [61].

Elsayed és munkatársai az első derivált spektrum felhasználásával határoztak meg nátrium-szalicilátot (232 és 236 nm) és teobromint (264 és 268 nm) 0,25 M-os nátrium-hidroxidban [15]. Tobiás tabletták paracetamol- és nátrium-szalicilát-tartalmát mérte az első derivált spektrum alapján [52] a „zero crossing" technikát [39] alkalmazva.

Az acetil-szalicilsav szabad szalicilsavtartalmának közvetlen UV spektrofotometriás meghatározása során 300—306 nm-en végzik a méréseket [21, 35, 41]. A különbség a mintaelőkészítésben van: vagy kioldást [41], vagy előzetes oszlopkromatográfiás elválasztást [21, 35] használnak. Day és munkatársai kloroformos extrakció után 308 nm-en a szalicilsavat, 278 nm-en az acetil-szalicilsavat mérték [9].

Mazzeo és munkatársai [36], valamint Kitamura és munkatársai [28, 29, 30] a második derivált spektrum alapján mérték az aszpirin szabad szalicilsavtartalmát minden előzetes elválasztás nélkül. Az acetil-szalicilsav spektrumát a 3/15. ábrán (91. oldal) mutattuk be. Gyógyszerkészítményekben való meghatározására a különböző oldószerekben 272—280 nm körül megjelenő sávot használják fel. Az USP XXII pl. — nyilvánvalóan a hidrolízis visszaszorítása céljából — 1 % ecetsavat tartalmazó kloroformot használ oldószerként és a mérést 280 nm-nél végezteti el [51b].

Érdekes megjegyezni, hogy aszpirin tabletta kioldódási vizsgálatai során, ahol a hidrolízis nem kerülhető el, ennek hatását úgy küszöbölik ki, hogy a mérést acetil-szalicilsav és szalicilsav izoabszorpciós pontján, 265 nm-nél végzik el [51b].

Néhány szerző az acetil-szalicilsavat hidrolízis után szalicilsav formájában határozta meg. Siedlanowska kodein és fenacetin mellett mérte úgy, hogy szalicilsavvá alakította [45]. Kúpokból Tatrai és Mühlemann 80%-os etanollal kioldotta a kodeint, fenacetint és aszpirint. Hidrolízis után 297,5 nm-en mértek [49]. Fogg és munkatársai az acetil-szalicilsavat 0,1 M-os nátrium-hidroxidban, 297 nm-en határozták meg paracetamol mellett [20]. Kirchhoefer és munkatársai gyomorsav-rezisztens bevonattal ellátott tabletták acetil-szalicilsav-tartalmát kloroformos extrakció után

280 nm-en mérték [27]. A 278—280 nm-es hullámhossz alkalmas a szalicilsav jelenlétében történő mérésre is. A szalicilsav kismértékű zavaró hatását vagy két hullámhosszon történő méréssel [9], vagy kioldással [25, 35, 38] szüntetik meg. Alkalmas erre a célra a spektrum második deriváltja is [4, 30].

A fontos antituberkulotikum 4-amino-szalicilsav (PAS) amerikai gyógyszerkönyv szerinti vizsgálatai során pH 7-es foszfátpufferben mérik az abszorbanciát a 265 és 299 nm körüli maximumokban; a két abszorbancia arányának 1,5 és 1,56 közötti értéknek kell lenni [51a]. Moussa a 4-amino-szalicilsavat pH = 3 borátpufferben, amino-fenol bomlásterméke jelenlétében mérte 300 nm-en [37]. A derivatív spektrofotometria kitűnő lehetőséget kínál PAS és a bomlástermék egymás melletti meghatározására gyógyszerkészítményekben is [58, 59].

A szalicilamidnak vízben, ill. etanolban 235—236 és 298—300 nm-en van abszorpciós sávja. Kluczykowska és Krowczynski papaverin és fenobarbital mellett, 0,1 M-os kénsavban 250 nm-en [31], Wahbi és Ebel klorokin-foszfát jelenlétében, ortogonális függvény segítségével 228—250 nm tartományban [60] mértek szalicilamidot. Soliman és Salaheldin analgetikumokból kloroformos kioldás után 308 nm-en [46], Elsayed és munkatársai paracetamol és kodein mellett 0,01 M-os nátrium-hidroxid-oldatban, 329 nm-en [16] határozták meg.

A spektrofotometriás módszer alkalmas szalicilsav észterszármazékainak meghatározására is. Az ilyen módszerek közül megemlítjük Erőss—Kiss és munkatársai módszerét [18] etilén-glikol-monoszalicilát meghatározására etil-nikotinát és kapszaicin mellett kenőcs készítményekben. A szalicilsav-származékok spektrumának pH-függése jó alapot kínál differencia-spektrofotometriás módszerek kidolgozására. Néhány ilyen módszert a 8. fejezetben a 8/1. táblázatban mutatunk be.

10.3.2. Kémiai reakciókra alapozott módszerek

A szalicilsav fenolos hidroxilcsoportjának vas(III)sókkal adott vörös színreakciója ($\lambda_{max} = 530$ nm körül) már a múlt században ismert volt. Ezt az alapreakciót ma is sokan használják a szalicilsav és származékai meghatározására. Az egyes szerzők által leírt módszerek közti különbségek a vas(III)só koncentrációjában, az anion minőségében, az oldat pH-jában és a mérés hullámhosszában vannak. A módszert az angol gyógyszerkönyv acetil-szalicilsav szabad szalicilsavtartalmának és a szalicilsavas tapasz hatóanyag-tartalmának meghatározására használja [5], de széles körben használják a módszert acetil-szalicilsavat tartalmazó készítmények stabilitásvizsgálatára [55] és egyéb szalicilsav-származékok, mint pl. az 5-(2,4-difluor-fenil) származék (diflunisal) meghatározására is [53]. A reakciót gyakran alkalmazzák a szalicilsav automatikus mérésére is [8, 33]. Guven és munkatársai az acetil-szalicilsav mesterséges gyomornedvben bekövetkező bomlásának vizsgálatára használták [22]. Amschler aszpirint mért a módszerrel hidrolízis után [1]. Ebben a formájában a módszer szalicilsav-észterek [6, 12] és szalicilamid [19, 62] mérésére is alkalmas. Érdekes alkalmazása ennek a mérési elvnek Khan módszere [26]. Itt alkil-szalicilátot úgy határoztak meg szelektíven fenil-szalicilát mellet, hogy az utóbbit szekunder aminokkal stabilis savamiddá alakították át.

Velasevic és munkatársai szalicilsavat és nátrium-amino-szalicilátot molibdén-(VI)ionokkal képződött komplexeik alapján [56] mértek. Belal és munkatársai nitrozálás után kobalt(II)- (400 nm) és réz(II)komplexei (520 nm) formájában határoztak meg szalicilamidot [3].

Shih és Teare szalicilsavat és szacharint metilénkékkel alkotott ionpárjaik révén mértek [44]. Elsayed és Nwangwu a kristályibolya—szalicilsav ionpár képződését használták mérésre [17].

Lacroix és munkatársai a 4-amino-szalicilátot triklór-ecetsavas főzéssel amino-fenollá dekarboxilezték, a képződött terméket 2,6-diklór-*p*-benzokinon-4-klóriminnel reagáltatták [34].

Deodhar és Mehta az amino-szalicilsavakat ugyancsak amino-fenollá történő átalakítás után a kálium-jodáttal keletkező intenzív vörös színű komplexek alapján mérték [10].

Verma és Jain aszpirinnel 4-amino-fenolt acetilezett, a képződő paracetamolt jodil-benzoátos oxidáció után mérte 430 nm-en. A módszer az acetil-szalicilsavra szelektív, szalicilsav, szalicilamid, oxifenbutazon és koffein nem zavar [57].

Szekeres és munkatársai szalicilamidot 3,3-diklór-*p*-benzokinon-klóriminnel reagáltatva kék indofenolszármazéka formájában mérték [24, 48]. Deodhar és munkatársai az acetil-szalicilsavat aceto-hidroxámsavvá alakították, majd vas(III)-kloriddal reagáltatták [11]. Shah és Raji vizes oldatban 5-nitro-furaldehiddel mérték a nátrium-amino-szalicilátot granulákban. [43]. Przyborowski és Smajkiewich szerint pH = 4 értéken az amino-szalicilsav reagál a 9-klór-akridinnel, s a reakció mérésre felhasználható [40]. Theimer és Ciurczak kinetikai módszerének reagense aszpirin meghatározására 3,3'-dimetoxi-benzidin volt [50].

Belal és munkatársai amino-szalicilsavakat diazotáltak és etil-acetoacetáttal kapcsoltak. A reakciót amino-benzoesav, benzokain és szulfacetamid mérésére is használták [2].

Sastry és munkatársai az amino-szalicilsavat a metol és jód savas oldatban lejátszódó reakciójában képződő *N*-metil-*p*-benzokinoniminnel mértek [42]. El Kheir és munkatársai szalicilamidot és paracetamolt mértek egymás mellett azon az alapon, hogy a paracetamol nitrózószármazékának spektruma savas és lúgos oldatban, valamint a szalicilamid ugyanezen származékának lúgos oldatban felvett spektruma 385 nm-en izobesztikus pontot ad [14]. Egy másik esetben [13] Meisenheimer-típusú komplexeket képeztek, és 355 nm-en mérték a szalicilamidot.

Megemlítjük még Sultan indirekt módszerét [47], ahol a mérés alapja acetil-szalicilsav kálium-dikromátos oxidációja erősen savas közegben, majd a keletkező króm(III) mérése 580 nm-nél.

Szalicilsav spektrofotometriás meghatározását biológiai mintákban (9.8. fejezet) elsősorban a vas(III)komplex alakjában vagy enzimatikus módszerekkel (7.11. fejezet) végzik.

Irodalom

1. Amschler, U., Pharm. Ztg. **125,** 555 (1980).
2. Belal, S. F., Elsayed, M. A., El-Nenaey, A., Soliman, S. A., Talanta **25,** 290 (1978).
3. Belal, S. F., Elsayed, M. A. H., Elwalily, A., Abdine, H., Analyst **104,** 919 (1979).
4. Bezakova, Z., Bachrata, M., Blesova, M., Knazko, L., Farm. Obz. **55,** 257 (1986).
5. British Pharmacopoeia 1988. Her Majesty's Stationery Office, London, 1988, 48, 649. old.
6. Cates, L. A., Brandino, T. F., Can. J. Hosp. Pharm. **32,** 169 (1979).
7. Clayton, A. W., Thiers, R. E., J. Pharm. Sci. **55,** 404 (1966).
8. Cullen, L. F., Peckman, D. L., Papariello, G. J., Ann. N. Y. Acad. Sci. **153,** 525 (1968).
9. Day, M. D., Harper, J. F., Olliff, C. J., Pharm. J. **199,** 63 (1967).
10. Deodhar, R. D., Mehta, R. C., Indian J. Pharm. Sci. **38,** 131 (1976).
11. Deodhar, R. D., Shastri, M. R., Mehta, R. C., Indian J. Pharm. Sci. **38,** 18 (1976).
12. Dutt, M. C., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **49,** 854 (1966).
13. El Kheir, A. A., Belal, S. F., El Sadek, M., El Shanwani, A., Analyst **111,** 319 (1986).
14. El Kheir, A. A., Belal, S. F., El Shanwani, A., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **68,** 1048 (1985).
15. Elsayed, M. A.-H., Abdine, H., Elsayed, Y. M., Acta Pharm. Jugosl. **27,** 161 (1977).
16. Elsayed, M. A.-H., Belal, S. F., Elwalily, A.-F. M., Abdine, H., Analyst **104,** 620 (1979).
17. Elsayed, M. A.-H., Nwangwu, C., Sci. Pharm. **49,** 290 (1981).
18. Erőss-Kiss, K., Hanák-Fehér, G., Balogh, S., Acta Chim. Hung. **127,** 519 (1990).
19. Fink, D. W., Anal. Chim. Acta **131,** 281 (1981).
20. Fogg, A. G., Sausins, P. J., Smithson, J. R., Anal. Chim. Acta **49,** 342 (1970).
21. Guttman, D. E., Salomon, G. W., J. Pharm. Sci. **58,** 120 (1969).
22. Guven, K. C., Altinkurt, T., Araman, A., Eczacilik Bul. **22,** 13 (1980).
23. Heise, D., Pfeiffer, S., Dtsch. Apot.-Ztg. **115,** 2024 (1975).
24. Joy, J., Szekeres, L., Microchim. Acta **II,** 125 (1975).
25. Juhl, W. E., Kirchoefer, R. D., J. Pharm. Sci. **69,** 544 (1980).
26. Khan, M. N., J. Pharm. Biomed. Anal. **5,** 515 (1987).
27. Kirchhoefer, R. D., Jefferson, E., Flinn, P. E., J. Pharm. Sci. **71,** 1049 (1982).
28. Kitamura, K., Mabuchi, M., Fukui, T., Hozumi, K., Chem. Pharm. Bull. **35,** 3914 (1987).
29. Kitamura, K., Majima, R., Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **17,** 785 (1978).
30. Kitamura, K., Takagi, M., Hozumi, K., Chem. Pharm. Bull. **32,** 1484 (1984).
31. Kluczykowska, B., Krowczynski, L., Dissnes Pharm. Pharmac. **24,** 507 (1972).
32. Krzek, J., Pharm. Pol. **36,** 281 (1980).
33. Kubin, H., Gaenshirt, H., Pharm. Ind. Berl. **38,** 224 (1976).
34. Lacroix, R., Guidollet, J., Zigliara, J., Ann. Pharm. Fr. **23,** 513 (1965).
35. Luber, J. R., Visalli, A. J., Patel, D. M., J. Pharm. Sci. **68,** 780 (1979).
36. Mazzeo, P., Quaglia, M. G., Segnalini, F., J. Pharm. Pharmacol. **34,** 470 (1982).
37. Moussa, A.-F. A., Pharmazie **33,** 460 (1978).
38. Oeydvin, K., Sapiraa, D. E., Meddr. Norsk. Farm. Selsk **37,** 115 (1975).
39. O'Haver, T. C., Clin. Chem. **25,** 1548 (1979).
40. Przyborowski, L., Smajkiewicz, A., Farm. Pol. **32,** 43 (1976).
41. Reed, R. C., Davis, W. W., J. Pharm. Sci. **54,** 1533 (1965).
42. Sastry, C. S. P., Reddy, B. S., Rao, B. G., Indian J. Pharm. Sci. **43,** 118 (1981).
43. Shah, P. R., Raji, R. R., Indian J. Pharm. Sci. **38,** 52 (1976).
44. Shih, I. K., Teare, F. W., Can. J. Pharm. Sci. **1,** 32 (1966).
45. Siedlanowska, H., Acta Pol. Pharm. **22,** 93 (1965).
46. Soliman, S. A., Salaheldin, A., J. Pharm. Sci. **65,** 1627 (1976).

47. Sultan, S. M., Analyst **112,** 1331 (1987).
48. Szekeres, L., Harmon, R. E., Gupta, S. K., Microchem. J. **18,** 101 (1973).
49. Tatrai, O., Mühlemann, H., Pharm. Acta Helv. **43,** 465 (1968).
50. Theimer, E. E., Ciurczak, E. W., J. Pharm. Sci. **66,** 139 (1977).
51. The United States Pharmacopeia XXII. USP Convention Inc., Rockville, 1990, a. 71; b. 112—113.
52. Tobias, D. Y., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **66,** 1450 (1983).
53. Vachek, J., Svátek, E., Ceskoslov. Farm. **35,** 227 (1986).
54. Van de Vaart, F. J., Hulshoff, A., Indemans, A. W. M., Pharm. Weekbl., Sci. ed. **2,** 1687 (1980).
55. Varga, P., Farkas Mohay, J., Gyógyszerészet **35,** 87 (1991).
56. Velasevic, K., Dukanovic, A., Radovic, Z., Arh. Farm. **27,** 163 (1977).
57. Verma, K. K., Jain, A., Anal. Chem. **58,** 821 (1986).
58. Vetuschi, C., Ragno, G., Pharm. Acta Helv. **63,** 290 (1988).
59. Vetuschi, C., Ragno, G., Mazzeo, P., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 383 (1988).
60. Wahbi, A. M., Ebel, S., J. Pharm. Pharmacol. **26,** 317 (1974).
61. Zhou, Y., Yang, S., Yiyao Gongye **17,** 35 (1986).
62. Zoltainé Matolcsy, E., Acta Pharm. Hung. **37,** 74 (1967).

10.4. Szulfonamidok

10.4.1. Meghatározás saját fényelnyelés alapján

Szubsztituált benzolszármazékok spektrumaival többen is foglalkoztak, ezek közül kiemeljük Doub és Vandenbelt munkásságát [25]. A szulfonamidok spektrumairól Kracmar és munkatársai révén [40, 41] áttekintő ismertetést is találunk az irodalomban.

Diszubsztituált benzolszármazékok spektrumával a 3.9. fejezetben foglalkozunk. A benzolszulfonamid ultraibolya abszorpciós spektrumában metanolos oldatban jól észlelhető a *K,* valamint az α-sáv vibrációs szerkezete [16, 36]. Alkilszubsztituensek hatására, így a 4-metil-benzolszulfonamid spektrumában mindkét benzolsáv jelentős batokrom és hiperkrom eltolódása következik be, ugyanakkor az α-sáv vibrációs szerkezete csökken. A szulfanilamid, amely e vegyületcsoport alapvegyületének tekinthető, metanolos oldatban jelentős *K*-sávval rendelkezik, az α-sáv abszorpciója elhúzódik, jól észlelhető mindkét sáv batokrom és hiperkrom eltolódása. Ehhez viszonyítva a szulfaguanidin és a szulfacetamid metanolos oldatának spektrumában a *K*-sáv számottevő batokrom és hiperkrom eltolódása figyelhető meg. A szulfatiazol spektrumában a *K*-sáv két abszorpciós maximumot mutat. Számos egyéb szulfonamid (szulfametoxipiridazin, szulfametin, szulfadimetoxin, szulfadoxin, szulfadimidin, szulfisomidin) esetében jól észlelhető az auxokrom csoportok befolyása; ennek során a metilcsoport a *K*-sáv jelentősebb batokrom és hiperkrom eltolódását okozza, mint a metoxicsoport. A tiadiazol-származék szulfaetidol és szulfametizol spektrumában a *K*-sáv jelentős intenzitásnövekedése figyelhető meg. A szulfapirimidin-származékok spektrumában a *K*-sáv jelentős batokrom eltolódása következik be. A szulfaetidol és

a szulfametizol metanolos oldatának spektruma hasonlít a szulfatiazoléhoz. A szalazoszulfapiridin nem csupán az ultraibolya, hanem a látható spektrumtartományban is jelentős fényabszorpcióval rendelkezik; ez a jelenség a szalicil-azo-csoporthoz rendelhető. Az ultraibolya abszorpciós spektrumok ismertetése NAPOLI [58], BANES [7], GARRATT [33], BRADFORD és BRACKETT [14], DÁVID és munkatársai [21], LÁNG [44], BELLOMONTE és munkatársai [11], BRAUN és VAN KERCHOVE [15], WAGNER és WANDER [77], MODY és NAIK [55], VIGNOLI és munkatársai [75], RAMANUJAM és munkatársai [61], valamint SZABOLCSNÉ [72] nevéhez fűződik.

A szulfonamidok spektrumainak jellege, metanolos, etanolos és vizes közegben általában eléggé hasonló. pH-változás hatására ez a helyzet változik; savas oldatban jelentős spektrumeltolódások következnek be. Így pl. a szulfisomidin esetében kationképződés révén a *K*-sáv hipszokrom és hipokrom eltolódása következik be, és a sáv kettéválik, az α-sáv elhúzódása pedig kifejezettebbé válik. Lúgos oldatban a *K*-sáv hipokrom eltolódása mutatkozik, amint arra ROBINSON és PEKRUL [65], SHARMA és munkatársai [69], CHAUDHARI és TIPNIS [19] munkáikban rámutatnak.

A szulfonamidokat a gyógyászatban elsősorban tabletta alakjában alkalmazzák, de ismert szilárd adagolási formája, a sebhintőpor is. Folyékony adagolási alakja az injekció és a szemcsepp, félszilárd adagolási formája a kenőcs. A szilárd adagolási formák általában stabilisak, a nem szilárd adagolási formák esetében azonban inkább előtérbe kerül a készítmény stabilitásának kérdése. Bár az utóbbi időben ilyen feladatok megoldására elsősorban vékonyréteg- és nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszereket alkalmaznak, többen is eredményesen foglalkoztak a szulfacetamid-nátrium vizes oldataiban (ez a gyógyszerészeti gyakorlatban főként szemcsepp alakjában fordul elő) mutatkozó fotokémiai bomlás spektrofotometriás kimutathatóságával, kinetikájával. Amint arra PANDULA és munkatársai rámutattak [59], a kinetikailag nulladrendű bomlás során az azo-benzol-4,4′-diszulfonamid és azoxibenzol-4,4′-diszulfonamid képződik. Hasonló jellegű munkásságot ismertetnek SCHLEIDER és munkatársai [68], DAVIES és munkatársai [22], valamint PAWLACZYK és munkatársai [60].

Minthogy az előnyösebb terápiás hatás elérése érdekében előtérbe kerültek a szulfonamid kombinációk, amelyekben egyrészt szulfonamidokat egymással, másrészt szulfonamidot egyéb kemoterápiás hatású szerrel kombináltak, az említett oldószerhatások gyakorlati jelentősége is nőtt, mert elősegítették a kombinációk alkotórészeinek spektrofotometriás meghatározását előzetes elválasztás nélkül.

DIBBERN spektrumgyűjteménye [23] számos szulfonamid-származék 0,1 n sósavban, 0,1 n nátrium-hidroxidban és metanolban felvett UV abszorpciós spektrumait tartalmazza.

A szulfonamidok különböző oldószerekben mutatkozó spektrumainak eltérő voltát több szerző is felhasználta szulfonamid-elegyek, kombinált készítmények alkotórészeinek meghatározására. Ehhez többnyire több hullámhosszon való spektrofotometriás mérést alkalmaztak. Így MATSUNO és munkatársai [51], MARZYS [50], MILCH [52, 53, 54], WAHBI és munkatársai [78], DOMBROWSKI és munkatársai [24], MADSEN és munkatársai [46, 47]. ALBASINI és munkatársai [5], ZAJAC [80], ZHANG és munkatársai [81], LIU [45], CHATTERJI és munkatársai [18], WU és LUO [79]. YAO és YI [85] és BEZAKOVA [13] differencia-spektrofotometriás módszert alkalmazott szulfonamidok

meghatározására egyéb fényelnyelő sajátságú anyagok jelenlétében. Az előzetes elválasztás nélkül meghatározott szulfonamid-kombinációk: szulfadiazin-szulfamerazin-szulfametazin; szulfadimetilpirimidin-szulfatiokarbamid-szulfametiltiazol; szulfadimetilpirimidin-szulfatiokarbamid-szulfametoxipiridazin; szulfametoxazol-trimetoprim; szulfametoxidiazin-szulfadiazin-szulfametoxazol-trimetoprim; marfanil-szulfatiokarbamid; marfanil-szulfatiokarbamid-szulfamerazin.

Az előzetes vékonyréteg-kromatográfiás elválasztáson és elúció utáni spektrofotometriás mérésen alapuló módszerek közül megemlítjük Vámos és munkatársai módszerét Sumetrolim tabletta szulfametoxazol és trimetoprim tartalmának meghatározására [74].

A 4.4 fejezetben leírt számítógépes módszerek természetesen kitűnő lehetőséget nyújtanak szulfonamid-elegyek spektrofotometriás elemzésének meggyorsítására, megbízhatóságának növelésére [48].

A derivatív spektrofotometriás módszer is számos gyakorlati feladat megoldását teszi lehetővé szulfonamid-készítmények analitikájában. Megemlítjük Shen és munkatársai módszerét [70] szulfadimoxin meghatározására, Abdellatef és munkatársai módszerét [1] szulfacetamid, szulfadimidin és szulfatiokarbamid meghatározására bomlástermékeik jelenlétében első derivált spektrumuk alapján, valamint Berzas Nevado és munkatársai módszerét [12] szulfanilamid és szulfatiazol egymás melletti mérésére harmadik és negyedik derivált spektrumaik segítségével. Ez utóbbi módszert részletesen bemutatjuk a 162. oldalon.

A saját fényelnyelésen alapuló spektrofotometriás módszerek viszonylag szerény szerephez jutnak szulfonamidok és készítményeik gyógyszerkönyvi analízisében. Az USP XXII számos szulfonamid tabletta kioldódási vizsgálatát spektrofotometriás módszerrel méreti, mint pl. a szulfadiazin tablettát 254 nm-nél [73a], a szulfamerazint 243 nm-nél [73b], a szulfametazolt pedig 267 nm-nél [73c]. A hatóanyag-tartalom meghatározását a már említett hosszúhullámú elnyelési sávval rendelkező szulfaszalazin esetében végzik spektrofotometriás módszerrel: lúgos extrakció után ecetsavas közegben 359 nm-nél [73d].

10.4.2. Kémiai reakciókra alapozott módszerek

Szulfonamidok kémiai reakción alapuló spektrofotometriás analízisében a primer aromás amincsoportnak van döntő jelentősége. A nagyszámú alkalmazott módszer közül a diazóniumsó képzésen, majd ennek valamely alkalmas ágenssel azofestékké való átalakításán alapuló klasszikus módszernek van a legnagyobb jelentősége: mind a mai napig is széles körben alkalmazzák különböző gyógyszer-analitikai és klinikai-analitikai feladatok megoldására [10, 26, 29, 31, 32, 38, 42, 49, 62, 66, 67, 82, 83, 84]. A módszer részleteit a 7.4. fejezetben tárgyaljuk (lásd a 7/9 reakciósémát a 233. oldalon). A kapcsoló reagens általában *N*-(1-naftil)-etilén-diamin (Bratton—Marshall-reagens). Ezt használják a többi között szulfacetamid szemészeti oldat és szulfizoxazol szemkenőcs gyógyszerkönyvi analízisénél [73e]. Vékonyréteg-kromatográfiás elválasztás és elúció után is széles körben használják a módszert szulfamid elegyek meghatározására [73f]. Említést érdemel Halse és Wold [34] módszere, amelyben

nem kerül sor azofesték képzésére: a meghatározást a Bratton—Marshall-módszer köztitermékének, a diazóniumsónak spektrofotometriás mérésére alapozzák a nitrit felesleg elvétele után.

A Bratton—Marshall-reagensen kívül használt egyéb kapcsoló reagensek közül figyelmet érdemel az acetecetsav-etil-észter [9] és a barbitursav, amellyel BELAL és munkatársai [10] kitűnő érzékenységet értek el: $\varepsilon_{380-386\,nm} = 32\,200—44\,600$.

Az eredeti Bratton—Marshall-módszer új alkalmazásai közül figyelmet érdemelnek az áramlásos injektálásos (FIA) módszerek (lásd 9.10. fejezet). A klinikai minták, valamint szulfonamid-készítmények kioldódási és egyéb analitikai sorozatvizsgálatára kiválóan alkalmas módszerek közül megemlítjük KOUPPARIS és ANAGNOSTOPOULOU [39], valamint ESTEVE ROMERO és munkatársai módszerét [29]. Ez utóbbi érdekessége, hogy nátrium-dodecil-szulfátnak a reakcióelegyhez való hozzáadásával jelentősen növelni lehetett a kapcsolási reakció sebességét és javítani az azofesték oldékonyságát.

A Bratton—Marshall-módszer reakciótermékének derivatív spektrofotometriás analízisét SALINAS és munkatársai [66] írták le. A különböző rendű derivált spektrumok megfelelő amplitúdóinak mérése ($^1D_{507,581}$, $^2D_{545,610}$, $^3D_{580,621}$, $^4D_{545,604}$) olyan kényes feladatok megoldását is lehetővé teszi, mint szulfonamidok direkt meghatározása vizeletből.

A diazolált szulfonamidok és 1-naftol közti reakcióra alapozva MARQUEZ és munkatársai [49] kinetikus módszert dolgoztak ki (lásd 7.10. fejezet) és azt sikerrel alkalmazták számos szulfonamid-készítmény hatóanyag-tartalmának mérésére.

Külön figyelmet érdemelnek azok a közlemények, amelyek a fotometriás módszer teljesítőképességét hasonlítják össze korszerű, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszerekkel [8, 38, 64].

A szulfonamidok meghatározására leírt számos egyéb reakció jelentősége messze elmarad az azo-kapcsolásos reakció jelentőségétől. Ezért ezekkel csak röviden foglalkozunk. Ugyancsak a primer aromás amincsoport a támadási pontja az aromás aldehid reagenseknek, amelyek Schiff-bázist képeznek szulfonamidokkal. Leírták egyebek között vanillin és szalicilaldehid [20], glutakonaldehid [43] és 2-hidroxi-naftilaldehid [17] felhasználását.

Érdekes az analitikai célokra jól hasznosítható kromogénképzési reakció szulfonamidok és fenotiazin [2, 57], ill. prometazin [4] között.

Az aromás aminok reagensei közül leírták még 1,2-naftokinon-4-szulfonsav [30], 9-klór-akridin [71], *o*-diacetil-benzol [37], valamint az indofenol reakció [28] felhasználását.

Töltésátviteli komplexek képzésére is több módszert alapoztak. Ezek reagensei tetraciano-etilén [63], 7,7,8,8-tetraciano-kinodimetán [35, 56], *p*-klóranil [35], *o*-klóranil [78], *p*-brómanil [35]. Fémkomplexképzésre is alapoztak spektrofotometriás módszereket, pl. réz(II)- [6] és palládium(II)-ionokkal [3]. Az újabban bevezetett reagensek közül említést érdemel 3-metil-benzotiazolin-2-on-hidrazon [27].

Irodalom

1. Abdellatef, H. E., Elbalkiny, M. N., Aboulkheir, A., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 571 (1989).
2. Abdine, H., Korany, M. A., Wahbi, A. M., El-Yazbi, F., Talanta **26,** 1046 (1979).
3. Agatonovic Kustrin, S., Zivanovic, L. J., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 1559 (1989).
4. Al Albachi, M. Q., Salih, E. S., Salem, M. S., Z. Anal. Chem. **337,** 408 (1990).
5. Albasini, A., Rastelli, A., De Benedetti, P. G., Mavi, G., Boll. Chim. Farmac. **28,** 941 (1973).
6. Askal, H., Saleh, G. A., J. Pharm. Biomed. Anal. **9,** 297 (1991).
7. Banes, D., J. Assoc. Off. Agric. Chem. **31,** 653 (1948).
8. Basci, N. E., Bozkurt, A., Kayaalp, S. O., Isimer, A., J. Chromatogr. Biomed. Appl. **527,** 174 (1990).
9. Belal, S., El-Sayed, M. A., El Nanaey, A., Soliman, S. A. Talanta **25,** 290 (1978).
10. Belal, S., Soliman, A. S., Bedair, M., J. Drug Res. **14,** 195 (1983).
11. Bellomonte, G., Calo, A., Cardini, C., Sci. Pharm. **28,** 44 (1960).
12. Berzas Nevado, J. J., Salinas, F., De Orbe Paya, I., Capitan-Vallvey, L. F., J. Pharm. Biomed Anal. **9,** 117 (1991).
13. Bezakova, Z., Farm. Obz. **50,** 153 (1981).
14. Bradford, L. W., Brackett, J. W., Mikrochim. Acta 353 (1958).
15. Braun, J., Van Kerchove, C., Sci. Pharm. **28,** 53 (1960).
16. Burawoy, A., Ber. **63,** 3155 (1930); J. Chem. Soc. (London) 1177 (1939) és 20 (1941).
17. Chaban, I., Belal, S., Zbl. Pharm. **116,** 919 (1977).
18. Chatterji, P. K., Jain, C. L., Sethi, P. D., Indian Drugs **24,** 351 (1987).
19. Chaudhari, G. N., Tipnis, H. P., Indian Drugs **19,** 446 (1982).
20. Colaizzi, J. L., Boenigk, J. W., Martin, A. N., Knevel, A. M., J. Pharm. Sci. **54,** 564 (1965).
21. Dávid Á., Hernádi J., Horváth G., Illényi A.-né, Gyógyszerészet **7,** 137 (1963).
22. Davies, D. S. G., Meakin, B. J., Mass, S. H., J. Pharm. Pharmac. **22,** Suppl. 43 S (1970).
23. Dibbern, H.-W., UV- und IR-Spektren wichtiger pharmazeutischer Wirkstoffe. Editio Cantor Aulendorf, Vol. I—II—III. 1978—1983.
24. Dombrowski, L. J., Browning, R. S., Pratt, E. L., J. Pharm. Sci. **66,** 1413 (1977).
25. Doub, L., Vandenbelt, J. M., J. Am. Chem. Soc. **69,** 2714 (1947) és **71,** 2414 (1949).
26. Dux, J. P., Rosenblum, C., Anal. Chem. **21,** 1524 (1949).
27. El-Kommos, M. E. Emara, K. M., Analyst **113,** 133 (1988).
28. Ellock, C. T. H., Fogg, A. G., Lab. Pract. **24,** 555 (1974).
29. Esteve Romero, J. S., Ramis Ramos, G., Forteza Coll, R., Cerdá Martin, V., Anal. Chim. Acta **242,** 143 (1991).
30. Filipeva, S. A., Strelets, L. N., Petrenko, V. V., Burjak, V. P., Farmatsiya **36,** 39 (1987).
31. Fogg, A. G., Fayad, N. M., Anal. Chim. Acta **106,** 365 (1979).
32. Funk, K. F., Pharmazie **22,** 241 (1967).
33. Garratt, D. C.: The quantitative analysis of drugs. 2nd Edition, 1955. Philosophical Library Publ., 589. old.
34. Halse, M., Wold, K., Medd. Norsk. Farm. Selskap **13,** 103 (1951).
35. Hussein, S. A., Mohamed, A.-M. I., Abdel-Alim, A.-A. M., Analyst **114,** 1129 (1989).
36. Jaffé, H. H., Orchin, M.: Theory and Applications of Ultraviolet Spectroscopy. J. Willey and Sons, Inc., New York—London 1964. 243. old.
37. Kagawa, M., Jap. Analyst **16,** 671 (1967).

38. KLIMOWICZ, A., Europ. J. Drug Metab. Pharmacokin. **14,** 181 (1989).
39. KOUPPARIS, M. A., ANAGNOSTOPOULOU, P. I., Anal. Chim. Acta **204,** 271 (1988).
40. KRACMAR, J., ALVAREZ, M. S., LASTOVKOVA, M., KRACMAROVA, J., Pharmazie **30,** 447 (1975).
41. KRACMAR, J., LASTOVKOVA, M., KRACMAROVA, J., Ceskoslov. Farm. **24,** 166 (1975).
42. KRISHNA, R. R., SASTRY, C. S. P., Indian Chem. J. **13,** 27 (1978).
43. KUNOVITS, G., Mikrochim. Acta 717 (1974).
44. LÁNG, L. (ed.): Absorption spectra in the ultraviolet and visible region. Vol. 5. Akadémiai Kiadó, Budapest.
45. LIU, C., Yaowu Fenxi Zazhi **6,** 213 (1986).
46. MADSEN, B. W., HERBISON-EVANS, D., ROBERTSON, J. S., J. Pharm. Pharmac. **26,** 629 (1974).
47. MADSEN, B. W., ROBERTSON, J. S., J. Pharm. Pharmac. **26,** 682 (1974).
48. MALKKI, L., TAMMILEHTO, S., Acta Pharm. Fenn. **98,** 141 (1989).
49. MARQUEZ, M., SILVA, S., PEREZ BENDITO, D., Anal. Chim. Acta **237,** 353 (1990).
50. MARZYS, A. E. O., Analyst **86,** 460 (1961).
51. MATSUNO, M., MISHIMURA, M., Yakugaku Kenkyu **29,** 178 (1957).
52. MILCH, GY., Acta Pharm. Hung. **32,** 206 (1962).
53. MILCH, GY., Acta Pharm. Hung. **33,** 257 (1963).
54. MILCH, GY., BORSAI, M., MOGÁCS, I., Acta Pharm. Hung. **37,** 6 (1967).
55. MODY, S. M., NAIK, R. N., J. Pharm. Sci. **52,** 201 (1963).
56. MOHAMED, A.-A. I., J. Ass. Off. Anal. Chem. **72,** 885 (1989).
57. MOHAMED, F. A., MOHAMED, A. I., EL-SHABOURI, S. R., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 175 (1988).
58. NAPOLI, I., Boll. Chim. Farm. **97,** 544 (1958).
59. PANDULA, E., RÁCZ, I., PAJOR, Z., Pharmazie **24,** 155 (1969).
60. PAWLACZYK, J., TUROESKA, W., NOWICKA, K., Acta Polon. Pharm. **32,** 53 (1975).
61. RAMANUJAM, V. M. S., GODWA, N. M. M., TRIEFF, N. M., LEGATOR, M. S., Microchem. J. **25,** 295 (1980).
62. RAMIS RAMOS, G., ESTEVE ROMERO, J. S., ALVAREZ COQUE, M. C. G., Anal. Chim. Acta **223,** 327 (1989).
63. RAO, G. R., MURTY, S. S. N., RAO, P. J., RAJU, I. R. K., Indian J. Pharm. Sci. **50,** 138 (1988).
64. REVETT, S. D., TENNESON, M. E., Anal. Proc. **21,** 248 (1984).
65. ROBINSON, E. J., PEKRUL, L. F., J. Am. Chem. Soc. **67,** 1186 (1945).
66. SALINAS, F., ESPINOSA MANSILA, A., BERZAS NEVADO, J. J., Anal. Chim. Acta **233,** 289 (1990).
67. SANE, R. T., NAYAK, V. G., Indian Drugs **19,** 206 (1982).
68. SCHLEIDER, E., ENO, D. M., FELDMAN, S. A., GALINSKY, A. M., J. Pharm. Sci. **58,** 1258 (1969).
69. SHARMA, S. C., DAS, S., TALWAR, S. K., Indian Drugs **22,** 314 (1985).
70. SHEN, K., HAN, Y., Yiyao Gongye, **17,** 30 (1986).
71. STEWART, J. T., RAY, A. B., FACKLER, A. N. B., J. Pharm. Sci. **58,** 1261 (1969).
72. SZABOLCS L.-NÉ, Gyógyszerészet **28,** 455 (1984).
73. The United States Pharmacopoeia XXII, USP Convention, Inc., Rockville, Md, 1990; a. 1286; b. 1288; c. 1290; d. 1296; e. 1283; f. 1545.
74. VÁMOS, J., KÓCZIÁN-FÖLDVÁRI, K., SZÁSZ, GY., Acta Pharm. Hung. **56,** 217 (1986).
75. VIGNOLI, L., CRISTAU, B., DEFRETIN, J.-P., Ann. Pharm. Franc. **21,** 477 (1963).
76. WACHSMUTH, H., VAN KOECHHOVEN, L., J. Pharm. Belg. **18,** 375 (1963).
77. WAGNER, G., WANDEL, J., Pharmazie **21,** 105 (1966).
78. WAHBI, A.-A., ABDINE, K., KORANY, M., EL-YAZBI, F., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **62,** 67 (1979).
79. WU, Q., LUO, G., Yaowu Fenxi Zazhi **6,** 10 (1986).

80. Zajac, M., Farm. Polska **27**, 11 (1971).
81. Zhang, J., Yang, Q., Yu, R., Yaoxue Xuebuo **19**, 367 (1984).
82. Zöllner, E., Vastagh, G., Pharm. Zhalle **96**, 99 (1957).
83. Zöllner, E., Vastagh, G., Pharm. Zhalle **97**, 219 (1958).
84. Xenakis, A. G., Anal. Chim. Acta **159**, 343 (1984).
85. Yao, G., Yi, Y., Yaowu Fenxi Zazhi **5**, 153 (1985).

10.5. Egyéb fenol- és anilinszármazékok

10.5.1. Bevezetés

Ebben a fejezetben aromás hidroxi- és alkoxiszármazékok, valamint amino- (acil-amino-, alkil-amino-) csoportot tartalmazó származékok spektrofotometriás meghatározásának lehetőségeit mutatjuk be. Ez a kétféle funkciós csoport vagy külön, vagy együtt jelenik meg az aromás gyűrűn, ill. kombinálódhatnak más funkciós csoportokkal is. Ezek közül elsősorban a karboxilcsoportot említjük meg (*p*-hidroxi-benzoesav-észterek, *p*-amino-benzoesav-származékok, difenil-amin-karbonsav-származékok), kiemelt jelentőségük miatt azonban az *o*-hidroxi-benzoesav-(szalicilsav) származékokat külön fejezetben (10.3.) tárgyaljuk. Megjegyezzük továbbá, hogy néhány fontos fenolszármazékot (adrenalin stb.) a fenil-alkil-aminok között, a 10.2. fejezetben tárgyalunk. Az aromás aminok közül ugyancsak külön fejezetben tárgyaljuk a szulfonamidokat (10.4.).

Az auxokróm csoportokat tartalmazó aromás vegyületek spektrumai (amint azt a 3.7., 3.9. és 3.10. fejezetben bemutattuk) megfelelően intenzívek ahhoz, hogy azokra kielégítően érzékeny spektrofometriás méréseket lehessen alapozni, a mérések szelektivitását pedig a szabad fenolos hidroxil-, ill. aminocsoportok jelenléte esetében jelentkező spektrum pH-függése alapján (3.17. fejezet), ill. az erre alapozott differencia-spektrofotometriás mérés segítségével lehet fokozni (8.2. fejezet).

A fejezetben tárgyalt vegyületek mindkét funkciós csoportja, a szabad fenolos hidroxil- és az aromás aminocsoport számos kémiai reakción alapuló módszer alapját képezheti, amint azt a 7. fejezetben több példán bemutattuk.

10.5.2. Paracetamol (acetaminofen) és fenacetin

A gyógyászatilag fontos 4-amino-fenol-származékok közül a paracetamol (acetaminofen) esetében az amincsoport acetilezve, a fenolos hidroxil pedig szabad állapotban van jelen. Ennek megfelelően spektrumában a 248 nm-nél megjelenő intenzív sáv ($\varepsilon = 12\,900$) lúgos közegben batokróm eltolódást szenved ($\lambda_{max/0,1\ M\ NaOH} = 256$ nm). A spektrum 280 nm körül levő α-sávja csak vállként jelenik meg. A semleges közegben való mérésre alapozza a mérést az USP XXII paracetamol alapanyag tartalmi meghatározása [106a], valamint a tabletta készítmény kioldódásának vizsgálata során

[106b], a lúgos közegben való mérést viszont a BP-88 használja a tabletta tartalmi meghatározására [14a].

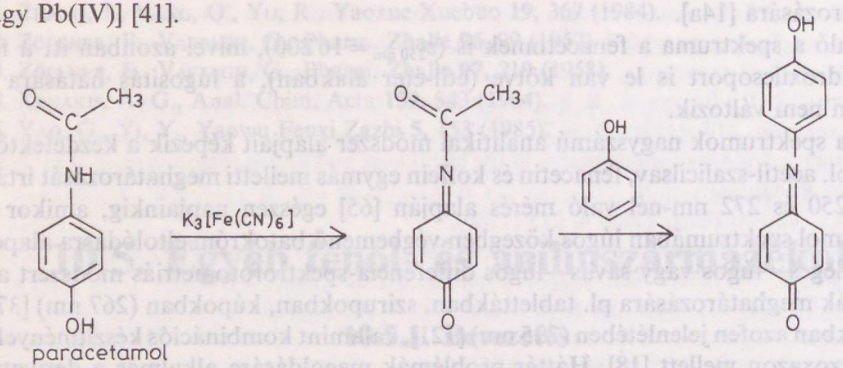
Hasonló a spektruma a fenacetinnek is ($\varepsilon_{250\,nm} = 16\,200$), mivel azonban itt a fenolos hidroxilcsoport is le van kötve (etil-éter alakban), a lúgosítás hatására a spektrum nem változik.

Ezek a spektrumok nagyszámú analitikai módszer alapjait képezik a kezdetektől, amikor pl. acetil-szalicilsav, fenacetin és koffein egymás melletti meghatározását írták le 226, 250 és 272 nm-nél való mérés alapján [65] egészen napjainkig, amikor a paracetamol spektrumában lúgos közegben végbemenő batokróm eltolódásra alapozott semleges—lúgos vagy savas—lúgos differencia-spektrofotometriás módszert alkalmazták meghatározására pl. tablettákban, szirupokban, kúpokban (267 nm) [37], injekciókban azofen jelenlétében (295 nm) [121], valamint kombinációs készítményekben klórzoxazon mellett [18]. Háttér problémák megoldására alkalmas a derivatív spektrofotometriás módszer is (4.5. fejezet); a második derivált módszer segítségével pl. paracetamol készítmények hatóanyag-tartalmának szelektív mérése a bomlástermékként jelenlevő 4-amino-fenol jelenlétében is megoldható [50], de sikerrel alkalmazták ezt a módszert meghatározására gyógyszerkombinációkban [56], sőt paracetamol szérumszintjének mérésére is [25]. A bomlástermékek jelenlétében való szelektív mérést az ortogonális polinomok módszere is lehetővé teszi [38].

A kémiai reakciókra alapozott módszerek közül elsőként a vegyületek (ill. hidrolízistermékeik) oxidálhatóságára alapozott módszereket ismertetjük. Sultan és munkatársai [103], valamint Quershi és Saeed [79] paracetamol meghatározását végezték el gyógyszerkészítményekben 10 M kénsavas—cérium(IV)-szulfátos, ill. cerium(IV)-nitrátos kezelés után a hidrolízis és oxidáció során keletkező *p*-benzokinon 410 nm-nél, ill. 355 nm-nél történő mérése alapján. Ugyancsak benzokinon, ill. annak acetil-imin-származéka a reakciótermék, ha az oxidációt 2-jodil-benzoáttal végezzük el [109]. Ezeknek a módszereknek meglehetősen szerény az érzékenységük. A savas hidrolízist követő oxidáció az alapja Morelli [70] indirekt módszerének is, ahol a reagens kénsavas ammónium-molibdát, a mérés alapját pedig a reagens redukált formájának, a molibdénkéknek 670 nm-nél végrehajtott mérése képezi. Ennek a módszernek érzékenysége ($\varepsilon = 26\,000$) több mint harmincszorosa a *p*-benzokinon közvetlen mérésére alapozottnak.

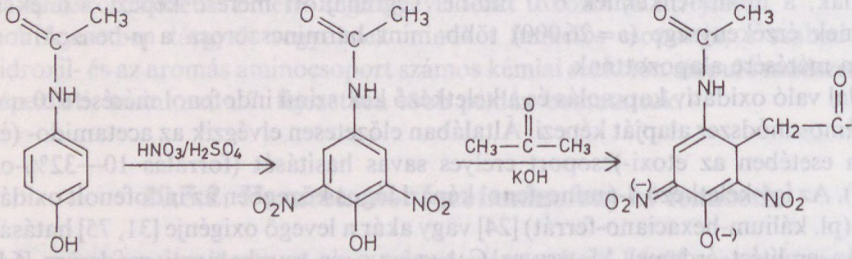
Fenollal való oxidatív kapcsolás és a keletkező kék színű indofenol mérése 620 nm körül számos módszer alapját képezi. Általában előzetesen elvégzik az acetamido- (és fenacetin esetében az etoxi-)csoport erélyes savas hasítását (forralás 10—32%-os sósavval). Az így keletkező 4-amino-fenol képezi lúgos közegben az indofenolt oxidálószerek (pl. kálium-hexaciano-ferrát) [24] vagy akár a levegő oxigénje [31, 75] hatására. Külön említést érdemel Martinez Calatayud és munkatársai módszere [64] paracetamol meghatározására tablettákban FIA módszer alkalmazásával (lásd 9.10. fejezet). Itt — amint az a (10/3) reakcióegyenleten látható — a savas hasítás elmarad: az oxidáció hatására keletkező *N*-acetil-*p*-benzokinon-imin is képes reagálni a reagensként alkalmazott fenollal. Leírták a módszernek olyan változatát is, ahol az oxidációt ioncserélő oszlopon megkötött kálium-hexaciano-ferráttal végzik [17]. Egy másik FIA módszer alapját paracetamol (ill. számos más szubsztituált fenol típusú

gyógyszer) oxidatív kondenzációja képezi 1-nitrozo-2-naftollal [oxidálószer Ce(IV) vagy Pb(IV)] [41].



(10/3)

Tágabb értelemben ezekhez a módszerekhez sorolhatók azok az eljárások is, amelyek a szubsztituenseknek köszönhetően könnyen és irányítottan nitrálható, ill. nitrozálható aromás gyűrű mérésére alapozódnak. Paracetamol salétromossavval könnyen alakítható *o*-nitrozo-fenol-származékká, amely lúgos közegben 430 nm körül mérhető [12]. A mérés szelektivitása a differencia-spektrofotometriás mérési elv alkalmazásával (a lúgos oldat mérése semleges oldattal szemben) növelhető [28], a módszerek érzékenysége azonban meglehetősen csekély. Nem sokkal érzékenyebbek a nitrálásra alapozott módszerek sem, amelyek számos változata közül itt kettőt emelünk ki: Inoue és munkatársai módszerét [44], ahol a nitrálás és az azt követő lúgos hidrolízis majd kloroformos kirázás után acetaminofen 2-nitro-*p*-fenetidin alakban 435 nm-nél mérhető, valamint El Kheir és munkatársai módszerét [27], ahol az erélyes körülmények között végrehajtott nitrálás során keletkező dinitroszármazékot lúgos közegben acetonnal reagáltatják, és a 355 nm-nél végrehajtott mérés alapját a keletkező Meisenheimer-komplex képezi (lásd 10/4 reakcióséma). A módszer egy másik változatában, amelyet El Sadek írt le [33], a nitrált származékot dimedon—trietil-amin reagenssel reagáltatják ($\lambda_{max} = 435$ nm).



(10/4)

A primer aromás aminocsoport különféle aromás aldehidekkel végbemenő Schiff-bázis képzése (lásd 7.4. fejezet) szintén számos módszer alapját képezi. Reagensként egyebek között vanillint [77, 108], 4-nitro-benzaldehidet, ill. 2,4-dinitro-benzaldehidet [52], 2-hidroxi-5-fenil-benzaldehidet [66], 4-(dimetil-amino)-cinnamaldehidet [45] alkalmaztak. Ezekkel a reagensekkel közvetlenül természetesen csak a paracetamol bomlástermékeként jelenlevő 4-amino-fenol reagál, erélyes savas hidrolízis után azon-

ban, amikor is az acetamino-csoport aminná hasad, lehetőség nyílik paracetamol indirekt meghatározására is. A mérési hullámhossz természetesen függ az alkalmazott reagenstől (385—520 nm); a módszerek érzékenysége közepes.

Mivel mind a paracetamol, mind pedig a fenacetin tartalmaz aromás amin és fenol funkciót is, természetesen széles körű alkalmazási lehetősége van az azokapcsoláson alapuló módszereknek is. Kétféle lehetőség nyílik a módszer alkalmazására:

a) A meghatározandó vegyületek átalakítása diazóniumsókká és ezek kapcsolása fenolokkal. Mivel az aromás aminocsoport mindkét származék esetében acetilezett formában van jelen, az acetilcsoportot ez esetben is — akárcsak az előzőekben tárgyalt, Schiff-bázis képzésre alapozott módszerek esetében — el kell távolítani erélyes savas hidrolízissel. Kapcsoló reagensként egyebek mellett pl. *β*-naftolt alkalmaztak fenacetin meghatározására [8, 74], ill. *N*-(1-naftil)-etilén-diamint paracetamol gyógyszerkönyvi meghatározásánál szirup készítményben [106b].

b) Diazotizált 2-nitro-anilint használva reagensként, majd acetaminofent használva fenol komponensként a kapcsolási reakcióban, az utóbbi meghatározása is elvégezhető előzetes savas kezelés nélkül is [83]. Erre a mérési elvre alapozva Belal és munkatársai három különböző mérési megoldást is leírtak [10]. A keletkező azofestéket lúgos közegben 426 nm-nél mérve közvetlenül lehet a meghatározást elvégezni, az azofesték réz(II)komplexe savas közegből kloroformmal extrahálható és 400 nm-nél mérhető, végül az utóbbi komplexből a réz(II)tartalom dietil-ditio-karbamát alakban kivonható és 442 nm-nél mérhető. Ez utóbbi indirekt módszer a legszelektívebb és legérzékenyebb a három közül.

Az acetamino-csoport képezi az alapját az indirekt meghatározási módszerek egy másik csoportjának. Lúgos közegben hirdoxil-aminnal végrehajtott reakciója során keletkező acetohidroxámsav vas(III)komplexe alakjában mérhető [21, 46], lásd. 7.7. fejezet.

Számos más reagens mellett sikerrel alkalmazták fenacetin és paracetamol meghatározására 4-nitrozo-antipirint [47], valamint nitroprusszid-nátriumot is [91]. Leírták paracetamol meghatározását rodamin-B festékkel képezett ionpárjának extrakciója [72], valamint kloranilos töltésátviteli komplexe alapján is [5]. Két összefoglaló közleményben [32, 39] számos, itt nem ismertetett fotometriás módszer is található. Paracetamol biológiai mintákban való meghatározására a 9.8. fejezetben is találhatók adatok.

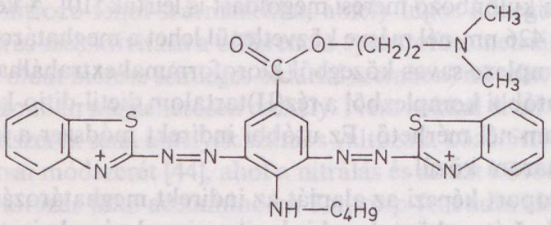
10.5.3. Anilin alapú helyi érzéstelenítők és rokon vegyületek

A 4-amino-benzoesav alapú helyi érzéstelenítők legtipikusabb képviselőjének, a prokainnak 290 nm-nél van intenzív, analitikai meghatározását lehetővé tevő abszorpciós maximuma ($\varepsilon = 16\,100$). Ennek a sávnak mérésére alapozza módszerét az USP XXII prokainnak injekciós készítményből való meghatározására [106c]. A meghatározást lúgos közegből történő kloroformos extrakció után kloroformos közegben végzik, amikor is a maximum 280 nm-ig tolódik el. A módszer alkalmas fenilefrin melletti meghatározásra is [106d]. Erősen savas közegben az aromás aminocsoport protonálódása miatt már csak benzoesav-típusú spektrumot kapunk

($\varepsilon_{228\,nm} = 10\,600$, $\varepsilon_{279\,nm} = 1400$). A savanyítás hatására végbemenő abszorbanciacsökkenés szelektív meghatározás (pl. mérés adrenalin és fenilefrin mellett [55]) elvégzését teszi lehetővé. Szelektív meghatározásra (pl. mérés szabad 4-amino-benzoesav mellett) [114] nyújt lehetőséget az ortogonális polinom módszer (lásd a 4.3.3. fejezetet) is.

A kémiai reakciókra alapozott módszerek közül a primer aromás aminocsoportot tartalmazó származékok mérésére (prokain, norkain, metoklopramid stb.) a diazotáláson és különböző kapcsoló ágensekkel való reakción alapuló módszer terjedt el a legjobban. Ennek a klasszikus módszernek (lásd 7.4. fejezet) néhány új alkalmazása során a többi között 2-naftolt [78], 1-naftil-amint [54, 85], timolt [53], naftil-etilén-diamint [98], 3-amino-fenolt [85], rezorcint [85], 2-tio-barbitursavat [85], rodanint [51] és acetecetsav-etilésztert [9] alkalmaztak.

Helyi érzéstelenítők széles körének meghatározását írta le El-Kommos és Emara [29] 3-metil-benzotiazolin-2-on-hidrazonnal való oxidatív kapcsolás felhasználásával [oxidálószer vas(III)]. A kék színű reakciótermék szerkezete pl. tetrakain esetében a következő volt ($\varepsilon_{615\,nm} = 55\,000$):



Említést érdemel még az észtercsoport hidroxil-aminos hidroxámsav képzésén, valamint ennek vas(III)-komplexének mérésén alapuló módszer prokain mérésére [71]. A felhasznált számos más reagens közül megemlítjük az 1,2-naftokinon-4-szulfonsavat [40], az ammónium-reineckátot [13], kálium-jodát-foszforsavat [58], jóddal oxidált katechint [90], 4-dimetil-amino-benzaldehidet [120], 4-dimetil-amino-cinnamaldehidet [30]. Végül megemlítjük a réz(II)komplex képzésen alapuló módszert helyi érzéstelenítők széles körére [20], valamint prokainamidra [116].

10.5.4. További anilinszármazékok

Kvaternerezett aminocsoportjával a neosztigmin bromid, ill. metil-szulfát kitűnően meghatározható ionpár-extrakciós módszerrel (lásd 7.8. fejezet). Brómtimolkék reagenst alkalmazva az ionpárképzésre és kloroformot az extrakcióra, Kulikov és munkatársai 8,3 és 10-es pH közötti oldatot extrahálnak és a mérést 415 nm-nél végzik el [61], míg Belal és munkatársai 7,8-as pH-n végzik az extrakciót és 416 nm-nél a spektrofotometriás mérést, vagy a kloroformos extraktumot 0,01 M nátrium-hidroxid-oldattal visszarázzák és a vizes-lúgos oldatot mérik 615 nm-nél [11].

Ugyancsak ionpár-extrakción alapul Cacho Palomar és munkatársai módszere brómhexin meghatározására: a kloroformos extrakciót tetrarodanáto-kobalt(II) reagenssel való reakció után végzik el és 625 nm-nél mérnek [15]. Ennél a módszernél a

meghatározás alapját nem a gyengén bázisos aromás aminocsoport képezte, hanem a molekulában levő másik, szekunder aminocsoport. Ezzel szemben az aromás aminocsoport lép reakcióba a salétromossavas diazotáláson, majd naftil-etilén-diaminnal való kapcsoláson alapuló módszerek [89, 99], valamint a 4-dimetil-amino-benzaldehides Schiff-bázis képzésre alapozott módszer [16] esetében.

Klórhexidin intenzív spektruma lehetővé teszi meghatározását különböző kiszerelt készítményekben [105], az erős bázis biguanidino-csoport jelenléte pedig lehetővé teszi az ionpár-extrakciós módszer alkalmazását. Pinzauti és munkatársai [76] számos szulfon-ftalein-típusú festék kipróbálása után metilnaranccsal kapta a legnagyobb érzékenységet (pH 6, extrakció kloroformmal, mérés 425 nm-nél). Andermann és munkatársai pH 5,7-nél kloroformmal extrahálják a brómkrezolzöldes ionpárt és 410 nm-nél mérnek [6]. Martinez Calatayud és Campins Falco [63] is brómkrezolzöldet használ festékkomponensként pH 5-nél, de a meghatározást detergens (Triton X-100) jelenlétében extrakció nélkül végzi el 630 nm-nél. A fenti szerzők leírták a módszer FIA változatát is (lásd 9.10. fejezet).

Említést érdemel még thiambutosin meghatározása 2,3-diklór-1,4-naftokinonnal való reakció után 540 nm-nél [23].

A szélesebb értelemben véve ugyancsak anilinszármazéknak tekinthető difenil--amin-karbonsav-származékok közül mind a mefenamsav, mind pedig a flufenamsav intenzív spektrummal rendelkezik az ultraibolya tartományban. Különösen a híg savban 350 nm körül észlelhető intenzív abszorpciós sávjuk alkalmas kvantitatív meghatározásukra, hiszen a viszonylag hosszú hullámú sáv szelektív mérések elvégzését teszi lehetővé, s ezt ki is használták pl. mefenamsav paracetamol melletti szelektív meghatározására [19]. A mérés szelektivitása az ortogonális polinomok módszerével (lásd 4.3.2. fejezet), ill. a spektrumoknak a karboxilcsoport disszociációja miatt bekövetkező pH-függését kihasználva a savas-lúgos differencia-spektrofotometria módszerével (lásd 8.2. fejezet) növelhető [42]. Az amino és karboxil funkció egyidejű jelenléte a molekulákban kitűnő komplexképzési képességet biztosít ezeknek a származékoknak, s ezt ki is használták pl. vas(III)komplex alakban történő meghatározásukra [34, 119], ill. réz(II)komplex alakban való extrakciójukra, amelyet követően a meghatározandó származékokkal ekvivalens réz(II)ionok dietil-ditio-karbamátjuk alakjában mérhetők [2]. Kvantitatív analitikai célokra alkalmas színreakcióik közül elsőként ionpár-extrakciós meghatározásukat említjük meg; a vegyületek erősebben savas karaktere miatt ez esetben bázikus ionpárképző festékeket alkalmaznak [113]. A redoxireakciók közül a ferricianidos oxidáción alapuló módszert nemcsak a már említett két származék meghatározására alkalmazták [62], hanem diclofenac mérésére is [88]. Ez utóbbi mérésére szolgál a 3-metil-benzotiazolin-2-on—hidrazon—Ce(IV) reagenssel végzett, 600 nm-nél intenzív maximummal rendelkező származékhoz vezető reakció [93]. További két módszer diclofenac mérésére [4]: metilénkékkel képezett ionpárjának extrakciója pH 6,8-nál kloroformmal és mérés 640 nm-nél, ill. oxidáció vas(III)-kloriddal és a keletkező vas(II) mérése α, α'-dipiridillel.

Végül aromás aminok meghatározására szolgáló négy, ritkábban használt módszert mutatunk be. Krishna, Sastry és munkatársaik [59, 92] módszereiben a reagens kálium-dikromáttal oxidált metol (4-metil-amino-fenol), ill. jóddal oxidált katechin volt; ezek kondenzációja a primer aromás aminocsoporttal hozza létre az 500—520

nm körüli maximummal rendelkező reakcióterméket. VERMA és STEWART [110] FIA módszere ugyancsak a metol—kálium-dikromát reakció termékével (1,4-benzokinon-metilimin) való reakción alapul. WITZEL és PINDUR [117] teljesen újszerű módszerének reagense ortohangyasav-trietilészter; ennek és a Lewis-sav katalizátornak hatására a tercier aromás aminszármazékok 3 molekulája kondenzálódik színes triaril-metil kationná.

10.5.5. β-Receptor blokkolók

Fenolos hidroxil, ill. fenol-éter funkciós csoportjaikkal a β-receptor blokkolók molekulaszerkezete megfelelő lehetőséget biztosít közepes érzékenységű és szelektivitású meghatározásukra. A gyógyszerkönyvi analízisben ezt felhasználják pl. propranolol tabletta kioldódási vizsgálatára 289 nm-en végzett mérés segítségével [106e], ill. injekciós készítmény tartalmi meghatározását 290 nm-nél [14b]. A módszer szelektivitása a derivatív spektrofotometria alkalmazásával javítható [112].

A szabad fenolos hidroxilcsoportot tartalmazó származékok spektruma lúgos közegben batokróm és hiperkróm eltolódást szenved. Ez jó lehetőséget teremt differencia-spektrofotometriás meghatározásukra (lásd 8.2. fejezet). Labetalol esetében pl. a differenciaspektrum maximuma 332 nm-nél van ($\Delta A_{1\,\mathrm{cm}}^{1\%} = 136{,}4$), ami lehetővé teszi a háttér kiküszöbölését tablettából történő meghatározásánál [68]. Hasonló elv alapján végezhető el 305 nm-nél prenalterol meghatározása [115].

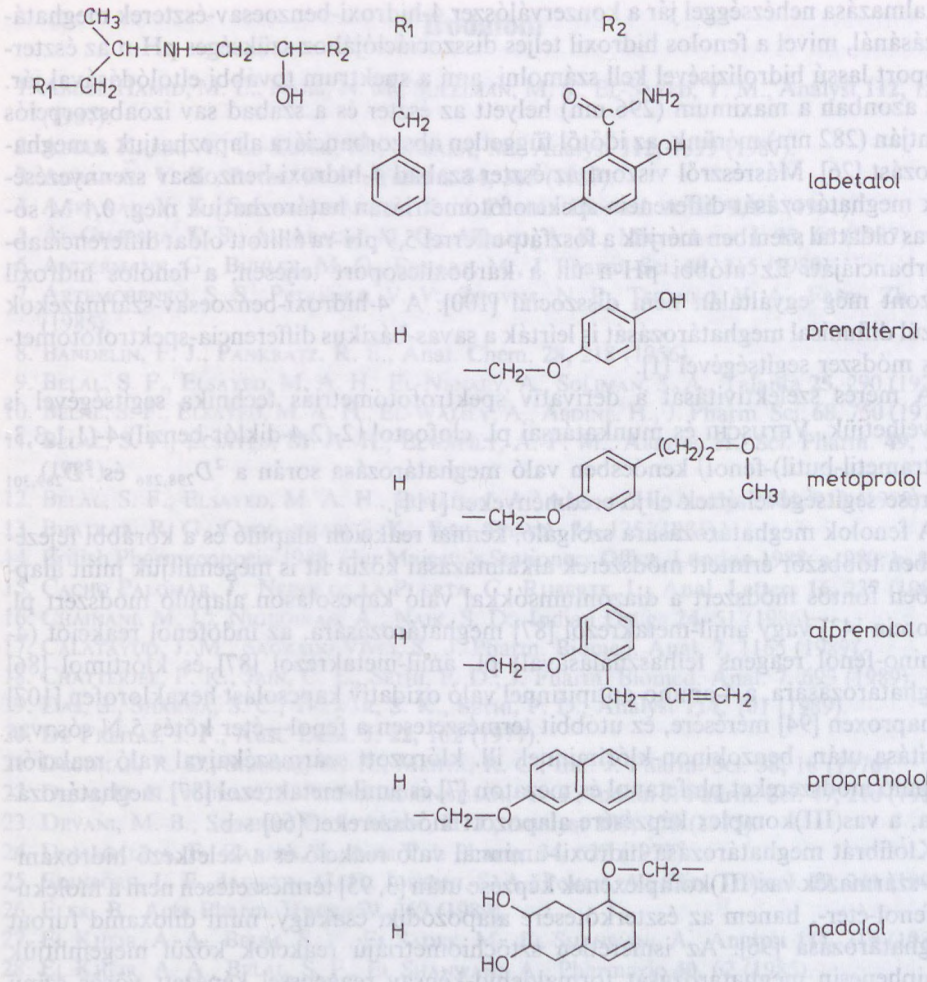
A valamennyi származékban jelenlevő középerős bázis szekunder amin funkció lehetővé teszi meghatározásukat ionpár-extrakciós módszerrel (lásd 7.8. fejezet). ÖZDEN és GÜMÜS pl. nadolol meghatározását írja le brómtimolkék reagenssel pH 3,2-nél végzett ionpárképzés, kloroformos extrakció és 412 nm-nél végzett mérés alapján [73]. Hasonló módon végezték el alprenolol [49] és propranolol [80] meghatározását is.

Ugyancsak a szekunder amin funkciós csoport képezi az alapját SHINGBAL és BANGLE módszerének [97], amelyben a reagens 1-fluor-2,4-dinitro-benzol és a mérési hullámhossz metoprololnak tablettában való meghatározásánál 380 nm.

RADULOVIC és munkatársai írták le oxprenolol [81], propranolol [118] és penbutolol [82] meghatározását vas(III)- és rodanidionokkal képzett vegyes komplexeik kloroformos extrakciója és 477 nm körül végrehajtott mérése alapján.

A szabad fenolos hidroxilcsoportot tartalmazó származékok meghatározását redukáló sajátságaik alapján is el lehet végezni. Így pl. MOHAMED és munkatársai [69] prenalterolt határoztak meg vas(III)ionok redukciója és a keletkező vas(II)ionoknak, 1,10-fenantrolin-komplex alakjában 511 nm-nél való mérése alapján, de felhasználták (labetalol mérésére) a Folin—Ciocalteu-reagenst, valamint a 2,6-diklór-kinon-imint is [57, 84].

Erélyes oxidálószerek hatására a szabad fenolos hidroxilcsoportot nem tartalmazó származékok is oxidálódnak (feltehetően a szekunder hidroxilcsoporton). Erre alapozódik SULTAN módszere propranolol meghatározására [101], ahol az oxidálószer kálium-dikromát volt és a mérést a reagens redukált formájának (króm(III)ionok) mérésére alapozták. Ugyanez a szerző dolgozta ki a meghatározás cérium(IV)-szulfá-



tos oxidációra alapozott kinetikus változatát (lásd 7.10. fejezet) [102]. Érdekes Ivashkiv igen szelektív módszere nadolol meghatározására [48]. Itt a ciklohexángyűrűn elhelyezkedő vicinális diolt alakítják át perjódsavas gyűrűfelnyitással dialdehiddé, s a mérést az aldehidcsoportok 2,4-dinitro-fenil-hidrazonná való átalakítása és kloroformos extrakció után 352 nm-nél végzik el.

10.5.6. Néhány további fenolszármazék

Amint azt már kifejtettük, fenolok saját fényelnyelése jó lehetőségeket teremt számos készítményben való meghatározásukra. Különösen kedvező a lúgos közegben végbemenő batokróm és hiperkróm eltolódás kihasználása kvantitatív analitikai célokra, amivel jelentősen növelhető a mérés szelektivitása [67]. Ennek a módszernek

alkalmazása nehézséggel jár a konzerválószer 4-hidroxi-benzoesav-észterek meghatározásánál, mivel a fenolos hidroxil teljes disszociációjához szükséges pH-n az észtercsoport lassú hidrolízisével kell számolni, ami a spektrum további eltolódásával jár. Ha azonban a maximum (296 nm) helyett az észter és a szabad sav izoabszorpciós pontján (282 nm) mérünk, az időtől független abszorbanciára alapozhatjuk a meghatározást [26]. Másrészről viszont az észter szabad 4-hidroxi-benzoesav szennyezésének meghatározását differencia-spektrofotometriásan határozhatjuk meg: 0,1 M sósavas oldattal szemben mérjük a foszfátpufferrel 5,9 pH-ra állított oldat differenciaabszorbanciáját. Ez utóbbi pH-n ui. a karboxilcsoport teljesen, a fenolos hidroxil viszont még egyáltalán nem disszociál [100]. A 4-hidroxi-benzoesav-származékok közül diflunisal meghatározását is leírták a savas-bázikus differencia-spektrofotometriás módszer segítségével [1].

A mérés szelektivitását a derivatív spektrofotometriás technika segítségével is növelhetjük. Vetuşchi és munkatársai pl. clofoctol (2-(2,4-diklór-benzil)-4-(1,1,3,3-tetrametil-butil)-fenol) kenőcsben való meghatározása során a $^2D_{298,286}$ és $^2D_{289,301}$ mérése segítségével értek el jó eredményeket [111].

A fenolok meghatározására szolgáló, kémiai reakción alapuló és a korábbi fejezetekben többször érintett módszerek alkalmazásai közül itt is megemlítjük mint alapvetően fontos módszert a diazóniumsókkal való kapcsoláson alapuló módszert pl. rezorcin [43] vagy amil-metakrezol [87] meghatározására, az indofenol reakciót (4-amino-fenol reagens felhasználásával) pl. amil-metakrezol [87] és klórtimol [86] meghatározására, a 4-amino-antipirinnel való oxidatív kapcsolást hexaklorofen [107] és naproxen [94] mérésére, ez utóbbit természetesen a fenol—éter kötés 5 N sósavas hasítása után, benzokinon-klóriminnel, ill. klórozott származékaival való reakción alapuló módszereket pl. fetanol és mezaton [7] és amil-metakrezol [87] meghatározására, a vas(III)komplex képzésére alapozott módszereket [60] stb.

Klofibrát meghatározása hidroxil-aminnal való reakció és a keletkező hidroxámsav-származék vas(III)komplexének képzése után [3, 95] természetesen nem a molekula fenol-éter-, hanem az észterkötésére alapozódik, csakúgy, mint diloxanid furoát meghatározása [96]. Az ismeretlen sztöchiometriájú reakciók közül megemlítjük guaiphenesin meghatározását formaldehid-kénsav reagenssel képezett vörös színű reakcióterméke segítségével [22].

Végezetül megemlítjük, hogy még az olyan, spektrofotometriásan könnyen meghatározható vegyület, mint a lúgos közegben intenzív lila színt mutató fenolftalein analitikai irodalmában is számos kémiai reakción alapuló módszer szerepel, mint pl. a nitrozoszármazék formájában való mérése nátrium-nitrit—ecetsav—kobalt(II)-nitrát reagenssel való kezelés után [35]. Említést érdemel, hogy a lila színű lúgos forma közvetlen mérése is gondos optimalizálást igényel: Suzuki és munkatársai [104] szerint 0,1 M karbonátpufferben pH 10,6-nél lehet optimális eredményeket elérni. Aloin és fenolftalein egymás melletti meghatározását semleges metanolos közegben két hullámhosszas (230 és 295 nm) módszerrel írták le [36].

Irodalom

1. Abdel-Hamid, M. E., Najib, N. M., Suleiman, M. S., El-Sayed, Y. M., Analyst **112,** 1527 (1987).
2. Aboul Kheir, A., El-Sadek, M., Baraka, M., Analyst **112,** 1399 (1987).
3. Agrawal, Y. K., Patel, D. R., Talanta **34,** 365 (1987).
4. Agrawal, Y. K., Shivramchandra, K., J. Pharm. Biomed. Anal. **9,** 97 (1991).
5. Al-Ghabsha, T. S., Al-Abachi, M. Q., Ahmad, A. K., Microchem. J. **35,** 66 (1987).
6. Andermann, G., Buhler, M. O., Erhart, M., J. Pharm. Sci. **69,** 215 (1980).
7. Artemchenko, S. S., Petrenko, V. V., Zhovna, N. P., Tsilinko, V. A., Farm. Zh. 744 (1985).
8. Bandelin, F. J., Pankratz, R. E., Anal. Chem. **28,** 218 (1956).
9. Belal, S. F., Elsayed, M. A. H., El-Nenaey, A., Soliman, S. A., Talanta **25,** 290 (1978).
10. Belal, S. F., Elsayed, M. A. H., El-Walily, A., Abdine, H., J. Pharm. Sci. **68,** 750 (1979).
11. Belal, S. F., Elsayed, M. A. H., Elwalily, A.-F. M., Abdine, H., Sci. Pharm. **49,** 397 (1981).
12. Belal, S. F., Elsayed, M. A. H., Elwalily, A., Abdine, H., Analyst **104,** 919 (1979).
13. Bhatkar, R. G., Chodankar, S. K., East. Pharm. **24,** 125 (1981).
14. British Pharmacopoeia 1988, Her Majesty's Stationery Office, London 1988; a. 980; b. 843.
15. Cacho Palomar, J., Nerin de la Puerta, C., Ruberte, L., Anal. Letters **16,** 237 (1983).
16. Chainani, M. L., Nighojkar, A., Naik, S. D., Indian Drugs **24,** 51 (1986).
17. Calatayud, J. M., Sagrado Vives, S., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 1165 (1989).
18. Chatterjee, P. K., Jain, C. L., Sethi, P. D., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 693 (1989).
19. Das, S., Sharma, S. C., Talwar, S. K., Sethi, P. D., Analyst **114,** 101 (1989).
20. De Freitas, J. F., Aust. Dent. J. **22,** 182 (1977).
21. Deodhar, R. D., Shastri, M. R., Mehta, R. C., Ind. J. Pharm. Sci. **38,** 18 (1976).
22. Desai, D. K., Kurani, S. P., Seshadrinathan, A. G., Indian J. Pharm. Sci. **47,** 210 (1985).
23. Devani, M. B., Shishoo, C. J., Mody, H. J., Analyst **100,** 178 (1975).
24. Domagalina, E., Zareba, S., Acta Pol. Pharm. **34,** 627 (1977).
25. Edinboro, L. E., Jackson, G. F., Jortani, S. A., Poklis, A., Clin. Toxicol. **29,** 241 (1991).
26. Elek, B., Acta Pharm. Hung. **59,** 269 (1989).
27. El Kheir, A. A., Belal, S. F., El Sadek, M., El Shanwani, A., Analyst **111,** 319 (1986).
28. El Kheir, A. A., Belal, S. F., El Shanwani, A., Pharmazie **40,** 62 (1985).
29. El-Kommos, M. E., Emara, K. M., Analyst **112,** 1253 (1987).
30. El-Kommos, M. E., Sidhom, M. B., Arch. Pharm. Chemi. Sci. Ed. **10,** 57 (1982).
31. Ellcock, C. T. H., Fogg, A. G., Analyst **100,** 16 (1975).
32. El-Obeid, A., Al-Badr, A., in, Analytical Profiles of Drug Substances. K. Florey (ed.), Academic Press, Orlando 1985, 551—596. old.
33. El Sadek, M., Anal. Letters **19,** 479 (1986).
34. El Sadek, M., Baraka, M., Aboul Kheir, A., Indian J. Pharm. Sci. **49,** 97 (1987).
35. El-Sayed, L., Ellaithy, M. M., Bebawy, L., Farmaco, Ed. Prat. **40,** 273 (1985).
36. El-Sayed, L., Ellaithy, M. M., Bebawy, L., Amer, M. M., Sci. Pharm. **54,** 95 (1986).
37. Elsayed, M. A. H., Belal, S., El-Walily, A. F. M., Abdine, H., J. Ass. Off. Anal. Chem. **62,** 549 (1979).
38. Elsayed, M. A. H., Korany, M. A., Bedair, M. M., Mahgoub, H., Korany, E. A., Drug Dev. Ind. Pharm. **16,** 1011 (1990).
39. Fairbrother, J. E., in, Analytical Profiles of Drug Substances. K. Florey (ed.), Academic Press, Orlando 1972, 2—109. old.

40. Filipyeva, S. O., Strilets, L. M., Petrenko, V. V., Buryak, V. P., Farm. Zh. 73 (1988).
41. Georgiou, C. A., Koupparis, M. A., Analyst **115,** 309 (1990).
42. Hassan, S. M., Shaaban, S. A. M., Pharmazie **39,** 691 (1984).
43. Horváth Rusvai M., Sperlágh J., Végh M., Gyógyszerészet **31,** 121 (1987).
44. Inoue, T., Tatsuzawa, M., Hashiba, S., Eisei Kagaku **20,** 217 (1974).
45. Inoue, T., Tatsuzawa, W., Lee, S. C., Ishii, T., Eisei Kagaku **21,** 313 (1975).
46. Iovchev, I., Dryanovska, L., Lazova, O., Farmatsiya (Sofia) **26,** 12 (1976).
47. Issa, A. S., Beltagy, Y. A., Kassem, M. G., Daabees, H. G., Talanta **32,** 209 (1985).
48. Ivashkiv, E., J. Pharm. Sci. **67,** 1024 (1978).
49. Jovanovic, M. S., Radulovic, D., Zivanovic, L., Acta Pol. Pharm. **44,** 322 (1987).
50. Korany, M. A., Bedair, M., Mahgoub, H., Elsayed, M. A. H., J. Ass. Off. Anal. Chem. **69,** 608 (1986).
51. Kvach, A. S., Aleksandrova, V. Y., Khim.-Farm. Zh. **21,** 110 (1987).
52. Kalatzis, E., Zarbi, I., J. Pharm. Sci. **65,** 71 (1976).
53. Kamalapurkar, O. S., Chudasama, J. J., Indian Drugs **20,** 298 (1983).
54. Kamalapurkar, O. S., Priolkar, S. R. S., Indian Drugs **20,** 108 (1982).
55. Kannan, K., Manavalan, R., Kelkar, A. K., Indian J. Pharm. Sci. **49,** 120 (1987).
56. Kir, S., Safak, C., Tureli, A., Temizer, A., Z. Anal. Chem. **339,** 264 (1991).
57. Korany, M. A., Abdel-Hay, M. H., Galal, S. M., Elsayed, M. A. H., J. Pharm. Belg. **40,** 178 (1984).
58. Kovalchuk, T. V., Kagan, F. E., Koget, T. O., Arzyaeva, O. A., Farm. Zh. 61 (1985).
59. Krishna, R. R., Sastry, C. S. P., Talanta **26,** 861 (1979).
60. Krzek, J., Janczenko, Z., Chem. Anal. **30,** 465 (1985).
61. Kulikov, S. I., Bokovikova, T. N. Karpova, L. K., Chichiro, V. E., Farmatsiya **36,** 43 (1987).
62. Mahrous, M. S., Badel-Khalek, M. M., Abdel-Hamid, M. E., Talanta **32,** 561 (1985).
63. Martinez Calatayud, J., Campins Falco, P., Anal. Chim. Acta **189,** 323 (1986).
64. Martinez Calatayud, J., Pascual Marti, M. C., Sagrado Vives, S., Anal. Lett. **19,** 2023 (1986).
65. Mattocks, A. M., Hernandez, H. R., Bull. Natl. Form. Comm. **18,** 113 (1950).
66. Mayadeo, M. S., Banavali, R. K., Ind. J. Chem., Sect. A. **25,** 789 (1986).
67. Milch, Gy., Aninger, L., Acta Pharm. Hung. **46,** 78, 102 (1976); **47,** 125 (1977).
68. Mohamed, M. E., Pharmazie **38,** 784 (1983).
69. Mohamed, M. E., Wahbi, A.-A. M., Gad Kariem, E. A., Anal. Letters **16,** 1545 (1983).
70. Morelli, B., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 577 (1989).
71. Novakovic, J., Boll. Chim. Farm. **128,** 370 (1989).
72. Onur, F., Acar, N., J. Fac. Pharm. Gazi **7,** 25 (1990).
73. Özden, S., Gümüs, F., Arch. Pharm. **321,** 565 (1988).
74. Pankratz, R. E., Bandelin, F. J., J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed. **45,** 364 (1956).
75. Patel, H. V., Morton, D. J., J. Clin. Pharm. Therap. **13,** 233 (1988).
76. Pinzauti, S., La Porta, E., Casini, M., Betti, C., Pharm. Acta Helv. **57,** 334 (1982).
77. Plakogiannis, F. M., Saad, A. M., J. Pharm. Sci. **64,** 1547 (1975).
78. Popov, D. M., Litvin, A. A., Khim.-Farm. Zh. **14,** 108 (1980).
79. Qureshi, S. Z., Saeed, A., Ann. Chim. **80,** 203 (1990).
80. Radulovic, D., Jovanovic, M. S., Zivanovic, L., Pharmazie **41,** 434 (1986).
81. Radulovic, D., Pecenac, D., Zivanovic, L., Agatonovic-Kustrin, S., Farmaco **45,** 447 (1990).
82. Radulovic, D., Pecanac, D., Zivanovic, L., Agatonovic-Kustrin, S., J. Pharm. Biomed. Anal. **8,** 739 (1990).

83. Rana, N. G., Chauhan, H. V., Indian Drugs **14,** 184 (1977).
84. Sane, R. T., Chandrashekhar, T. G., Nayak, V. G., Ind. J. Pharm. Sci. **48,** 113 (1986).
85. Sane, R. T., Dhamankar, A. Y., Indian Drugs **19,** 74 (1981).
86. Sane, R. T., Karkhanis, P. P., Sathe, A. Y., Indian Drugs **18,** 149 (1981).
87. Sane, R. T., Kubal, M. L., Nayak, V. G., Indian Drugs **23,** 466 (1986).
88. Sane, R. T., Samant, R. S., Nayak, V. G., Indian drugs **24,** 161 (1986).
89. Santoro, M. I. R. M., Dos Santos, M. M., Magalhaes, J. F., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **67,** 532 (1984).
90. Sastry, C. S. P., Mangala, D. S., Rao, B. G., J. Inst. Chem. **56,** 182 (1984).
91. Sastry, C. S. P., Murthy, K. V. S. S., Indian Drugs **19,** 158 (1982).
92. Sastry, C. S. P., Rao, B. G., Murthy, K. V. S. S., J. Indian Chem. Soc. **59,** 1107 (1982).
93. Sastry, C. S. P., Rao, A. R. M., Prasad, T. N. V., Anal. Letters **20,** 349 (1987).
94. Sastry, C. S. P., Rao, A. R. M., Vijaya, D., Indian Drugs **24,** 111 (1986).
95. Shah, G. S., Mehta, R. C., Ganatra, J. P., Indian J. Pharm. Sci. **47,** 206 (1985).
96. Shah, P. P., Mehta, R. C., Indian J. Pharm. Sci. **43,** 147 (1981).
97. Shingbal, D. M., Bhangle, S. R., Indian Drugs **24,** 270 (1987).
98. Shingbal, D. M., Sawant, K. V., Indian Drugs **19,** 239 (1982).
99. Shingbal, D. M., Rao, V. R., Indian Drugs **22,** 275 (1985).
100. Skakun, N. M., Kazarinov, M. O., Farm. Zh. 47 (1986).
101. Sultan, S. M., Analyst **113,** 149 (1988).
102. Sultan, S. M., Altamrah, S. A., Alrahman, A. M. A., Alzamil, I. Z., Karrar, M. O., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 279 (1989).
103. Sultan, S. M., Alzamil, I. Z., Alrahman, A. M. A., Altamrah, S. A., Asha, Y., Analyst **111,** 919 (1986).
104. Suzuki, M., Kanbe, K., Asabe, Y., Takitani, S., Bunseki Kagaku **27,** 525 (1978).
105. Szabolcs-Sándor, E., Acta Pharm. Hung. **47,** 174 (1977).
106. The United States Pharmacopoeia XXII. USP Convention Inc., Rockville, Md., 1990; a. 12; b. 16; c. 1147; d. 1148; e. 1177.
107. Van Kerchove, C., Thielemens-Bosmans, M., Van Geert-Verkest, I., J. Pharm. Belg. **34,** 13 (1979).
108. Vaughn, J. B., J. Pharm. Sci. **58,** 469 (1969).
109. Verma, K. K., Gulati, A. K., Palod, S., Tyagi, P., Analyst **109,** 735 (1984).
110. Verma, K. K., Stewart, K. K., Anal. Chim. Acta **214,** 207 (1988).
111. Vetuschi, C., Ragno, G., Losacco, V., Boll. Chim. Farm. **127,** 193 (1988).
112. Vetuschi, C., Ragno, G., Mazzeo, P., Mazzeo-Farina, A., Farmaco, Ed. Prat. **40,** 215 (1985).
113. Vinnikova, A. V., Farm. Zh. 74 (1979).
114. Wahbi, A.-A. M., Belal, S., Bedair, M., Abdine, H., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **64,** 1179 (1981).
115. Wahbi, A.-A. M., Mohamed, M. E., Gad Kariem, E. A., Aboul-Enein, H. Y., Analyst **108,** 886 (1983).
116. Whitaker, J. E., Hoyt, A. M., J. Pharm. Sci. **73,** 1184 (1984).
117. Witzel, H., Pindur, U., Pharm. Acta Helv. **63,** 164 (1988).
118. Zivanovic, L., Radulovic, D., Jovanovic, M., Pharm. Acta Helv. **63,** 350 (1988).
119. Zommer-Urbanska, S., Bojarowicz, H., J. Pharm. Biomed. Anal. **4,** 475 (1986).
120. Xia, G., Liu, S., Yaoxue Tongbao **21,** 25 (1986).
121. Yan, Z., Liu, Y., Yaowu Fenxi Zazhi **7,** 120 (1987).

10.6. Alkaloidok és rokon vegyületek

10.6.1. Meghatározás saját fényelnyelés alapján

A növényvilág erős fiziológiai hatással rendelkező, általában heterociklusos bázisai, az alkaloidok valamennyien spektrofotometriásan aktív anyagok, az aktivitás mértéke azonban igen erősen függ az alkaloidot jellemző váztól és/vagy a hozzá csatlakozó funkciós csoport(ok)tól. Erre vonatkozóan a 10/2. táblázatban gyűjtöttük össze a gyógyászati, ill. toxikológiai szempontból legfontosabb alkaloidok adatait.

A táblázat adataiból látható, hogy a színes berberintől és az igen strukturált és intenzív spektrummal rendelkező rubán- és izokinolinvázas vegyületektől, ahol a spektrofotometriás meghatározás lehetőségei igen jók, egészen a tropánvázas alkaloidokig, ahol a váz inaktív, csupán az észterező savkomponens izolált fenilcsoportjai jelentenek közvetlen mérésre alig alkalmas csekély spektrofotometriás aktivitást, valamint a csupán igen rövid hullámoknál elnyelő imidazolvázas alkaloidokig, a spektrofotometriás aktivitás legkülönbözőbb fokozataival találkozunk.

Igen korlátozottak a lehetőségei a spektrumok pH-függésére alapozott módszereknek, mivel az esetek nagy részében a váz bázikus centruma kívül esik a kromofor rendszeren (morfinán-, tropánszármazékok), vagy a kromofor váz tartalmaz ugyan nitrogént, nem ez azonban a bázikus centrum, hanem azt egy a kromofor rendszertől távoli, második nitrogén képezi (indolalkaloidok különböző típusai, mint pl. az ergolin- és eburnánvázas vegyületek, valamint a kinolin- és izokinolinvázas alkaloidok). Így enyhébb savanyítás hatására csak a purinvázas vegyületeknél és pl. a berberinnél, lúgosítás hatására pedig a szabad fenolos hidroxilt tartalmazó morfinánszármazékoknál következik be analitikai célokra hasznosítható spektrum eltolódás.

Alkaloidok intenzív fényelnyelését a különböző gyógyszerkönyvek széleskörűen felhasználják elsősorban alkaloid készítmények kvantitatív spektrofotometriás meghatározására, de található néhány ilyen példa gyógyszer-alapanyagok vizsgálatánál is, pl. vinblasztin [11a], ill. vinkrisztin [11b] alapanyagok tartalmi meghatározása 267, ill. 297 nm-nél. Gyógyszer-alapanyagok direkt spektrofotometriás módszerrel végzett tisztaságvizsgálatának meglehetősen ritka esetére példa a konjugált kettős kötést tartalmazó apoatropin szennyezés limitálása az izolált benzolgyűrűt tartalmazó atropinban, 245 nm-en végzett mérés segítségével [11c].

Alkaloidtartalmú gyógyszerkészítmények saját fényelnyelésre alapozott gyógyszerkönyvi spektrofotometriás vizsgálati módszerei közül megemlítjük vinblasztin és vinkrisztin-szulfát injekciós készítmény vizsgálatát [11d, 106a], morfin injekció mérését 284 nm-nél [11e], teofillin retard kapszula meghatározását 271 nm-nél [106c], kinin-szulfát kapszula „content uniformity" vizsgálatát 345 nm-nél [106b], ill. a tablettakészítmény kioldódási vizsgálatát 348 nm-nél [11f], pilokarpin-hidroklorid szemészeti készítmény meghatározását a szokatlanul rövid 215 nm-es hullámhosszon [106d]. A felsorolt esetekben különösebb mintaelőkészítésre nincs szükség; papaverin-hidroklorid injekció esetében azonban lúgos közegből kloroformmal extrahálják a bázist, majd az extraktum bepárlása után 0,1 M sósavban oldva mérik 251 nm-nél

[106e]. Ez az extrakciós módszer lehetővé teszi koffein szelektív meghatározását koffein—acetil-szalicilsav kombinációban 273 nm-es mérés alapján [11g].

Széles körűek a további lehetőségek is alkaloidok szelektív spektrofotometriás meghatározására növényi kivonatokban társalkaloidok és más komponensek mellett, ill. kombinált gyógyszerkészítményekben 1-2 további hatóanyag jelenlétében. Az ilyen módszereket leíró hatalmas irodalomból csak néhányat emelünk ki.

Salama és Belal [93] sztrichnin és johimbin egymás melletti meghatározását írták le tabletta és injekciós készítményekben közvetlen extrakció, ill. hígítás után 0,1 M kénsavas közegben 255 és 272 nm-en végrehajtott mérés és kétismeretlenes egyenlet megoldása alapján. A gyógyszer-analitika gyakran felmerülő problémái közül sztrichnin és brucin egymás melletti meghatározása is elvégezhető két hullámhosszas méréssel 262 és 300 nm-en. El-Masry és Wahbi [22] módszerében a mérést megelőzően egyéb zavaró komponensek eltávolítása céljából a két alkaloid elegyét metilnaranccsal pH 5-nél kloroformmal extrahálják, majd a kloroformos oldatot 0,1 M kénsavval visszaextrahálják a festékkomplex elbontása közben. További példák a két hullámhosszas mérésre teobromin és papaverin egymás melletti meghatározása 0,1 M sósavban 269 és 311 nm-nél [111], koffein és szalicilsavamid meghatározása metanolos közegben 273 és 304 nm-nél [113], papaverin és koffein egymás melletti mérése fenobarbitál jelenlétében az előbbiek enyhén lúgos közegből végzett kloroformos extrakciója, majd 328 és 276 nm-en történő mérés után [53] stb. Az utóbbihoz hasonló összetételű papaverin-teofillin-fenobarbitál tabletta analízise elválasztás nélkül is elvégezhető két különböző pH-n való 3 hullámhosszas mérés alapján, kihasználva papaverin szelektív abszorpcióját 309 nm-nél [68]. Milch és munkatársai [60] koffein meghatározását írták le nátrium-szalicilát, nátrium-benzoát, ill. prokain mellett kéthullámhosszas mérési módszer segítségével.

Az előbbi példához hasonlóan kedvező esetekben egy-egy komponens még három komponensű készítményekben is szelektíven meghatározható, amennyiben található olyan hullámhossz, ahol csupán a meghatározandó komponens rendelkezik fényelnyeléssel. Így pl. kinin spektrumának hosszúhullámú maximumán (lásd 10/2. táblázat) minden elválasztás nélkül mérhető acetil-szalicilsav és aszkorbinsav [77], valamint koffein és amidazofen [112] mellett. Háromismeretlenes egyenletrendszer segítségével természetesen többé-kevésbé átfedő spektrumokkal rendelkező komponensek, mint pl. koffein, piridoxin és meklozin, egymás melletti meghatározása is elvégezhető [99].

Megjegyzendő, hogy alkaloidokat tartalmazó készítmények spektrumaiban nem mindig érvényesül a komponensek fényelnyelésének additivitása; a komponensek közötti komplexképződés torzíthatja a spektrumokat [17]. Ilyen hatással különösen abban az esetben kell számolni, amikor az egyik komponens nagy feleslegben van jelen a másikhoz képest. Így pl. egy tablettakészítményben a 100-szoros mennyiségben jelenlevő koffein meghatározása maximumának hullámhosszán minden nehézség nélkül elvégezhető: a mérést a másik komponens ergotamin-tartarát nem zavarja. Ez utóbbi mérésénél azonban a komplexképződés következtében előálló spektrumtorzulás miatt célszerű olyan izoabszorpciós hullámhosszon mérni (312 nm), ahol az ergotamin elnyelése független a koffein koncentrációjától [36].

10/2. táblázat. Néhány gyógyászatilag, ill. toxikológiailag fontos alkaloid spektrumadatai [15, 98, 104]

Alkaloid	Váz/heterociklus	Kromofor*	λ_{max}, nm	ε	Oldószer
Akonitin	pirrolidin	benzoil-oxi	234	12 800	0,5 M H_2SO_4
			275	1 150	
Apomorfin	izokinolin	dihidroxi--difenil	272	19 800	0,1 M H_2SO_4
Atropin	tropán	fenil	257	230	0,5 M H_2SO_4
Benztropin	tropán	fenil (2)	259	370	0,1 M H_2SO_4
Berberin	fenil-izokinolin	fenil-dimetoxi--izokinolin	228	20 400	0,1 M H_2SO_4
			264	19 600	
			345	17 650	
Brucin	indol	dimetoxi-*N*--acil-anilin	267	14 100	EtOH
			301	10 000	
Cinkonin	rubán	kinolin	235	33 400	0,1 M H_2SO_4
			315	6 390	
Dihidroergotamin	ergolin	indol	279	6 250	0,1 M HCl
Dihidrokodeinon	morfinán	fenol-éter	280	1 110	0,1 M H_2SO_4
Emetin	izokinolin	fenol-éter (2)	228	12 500	1 M H_2SO_4
			282	5 390	
Ergometrin	ergolin	dehidro-indol	312	8 120	0,1 M H_2SO_4
Ergotamin	ergolin	dehidro-indol	240	25 000	0,5 M H_2SO_4
			315	7 850	
Etilmorfin	morfinán	fenol-éter	285	1 530	0,2 M H_2SO_4
Fizosztigmin	ezerin	amino-fenol--észter	246	10 740	0,2 M HCl
			302	2 640	
Heroin	morfinán	fenol-észter	278	1 440	0,1 M HCl
Hidrasztin	izokinolin	di-(OCH_3)-fenil karbonsavészter + fenol-éter	295	5 360	EtOH—H_2O 1 : 1
Hioszciamin	tropán	fenil	258	260	0,5 M H_2SO_4
Homatropin-metilbromid	tropán	fenil	258	210	0,1 M H_2SO_4
Johimbin	johimbán	indol	220	37 700	0,1 M H_2SO_4
			272	7 400	
			287	5 400	
Kaneszcin	indol	indol + trimetoxi-benzoil	272	17 400	EtOH
Kinidin	rubán	metoxi-kinolin	236	36 000	EtOH
			278	4 300	
			332	5 280	
Kinin	rubán	metoxi-kinolin	236	36 000	EtOH
			278	4 300	
			332	5 280	
Kodein	morfinán	fenol-éter	285	1 740	0,5 M H_2SO_4
Koffein	purin	purin	272	9 100	0,1 M HCl
Kokain	tropán	benzoil-oxi	233	14 200	0,1 M H_2SO_4
			275	1 150	
Kolchicin	tropolon	trimetoxi-fenil--ciklohepta-trienolon	243	29 200	EtOH
			350	16 800	

10/2. táblázat. Folytatása

Alkaloid	Váz/heterociklus	Kromofor*	λ_{max}, nm	ε	Oldószer
Levallorfán	morfinán	fenol	226	4 670	0,1 M HCl
			278	2 090	
			240	8 830	0,1 M NaOH
			299	3 030	
Lizergsavdietilamid (LSD)	ergolin	dehidro-indol	310	7 100	0,1 M HCl
Meszkalin	fenil-etil-amin	trimetoxi-fenil	269	1 580	EtOH
Morfin	morfinán	fenol	284	1 570	0,5 M H_2SO_4
			250	7 270	0,1 M NaOH
			296	3 300	
Nikotin	piridin-pirrolidin	piridin	260	7 940	0,1 M H_2SO_4
Noszkapin	izokinolin	dimetoxi--benzoil + fenol-éter	290	4 000	MeOH
			310	4 750	
Papaverin	izokinolin	dimetoxi--izokinolin +	251	62 000	1 M HCl
			284	6 540	
		dimetoxi-fenil	310	8 600	
Pilokarpin	imidazol	imidazol	215	5 200	0,2 M H_2SO_4
Reszcinnamin	johimbán	metoxi-indol +	228	49 200	borát/H_2O
		trimetoxi--cinnamoil	301	24 100	
Reszeprin	johimbán	metoxi-indol + trimetoxi-benzoil	266	16 700	EtOH
			294	10 200	
Szkopolamin	tropán	fenil	258	270	0,5 M H_2SO_4
Sztrichnin	indol	*N*-acil-anilin	255	12 600	EtOH
Teobromin	purin	purin	270	10 200	0,5 M H_2SO_4
Teofillin	purin	purin	270	9 700	0,1 M HCl
Vinblasztin	bisz-indol	indol + metoxi--anilin	267	18 300	MeOH
Vinkamin	eburnán	indol	228	32 500	EtOH
			271	8 200	
Vinpocetin	eburnán	dehidro-indol	229	31 400	EtOH
			273	12 000	
			314	6 500	

* A spektrumot alapvetően meghatározó kromoforok. Amennyiben a spektrumot két egymástól izolált kromofor közösen hozza létre, ezeket + jellel választottuk el.

Összetett készítmények alkaloid komponensének szelektív meghatározására sajátságos megoldás a zavaró fényelnyeléssel rendelkező másik komponens spektrumának eliminálása a kérdéses spektrumtartományban kémiai módszer segítségével. Így pl. papaverin szelektív meghatározását novamidazofen jelenlétében ez utóbbi spektrumának jódos oxidációval történő hipszokróm eltolása útján lehet elvégezni [69].

10/3. táblázat. Néhány ionpár-extrakciós — spektrofotometriás módszer alkaloidok meghatározására

Alkaloid	Ionpárképző reagens	pH	Extraháló oldószer	λ, nm	Irodalom
Atropin, szkopolamin	brómtimolkék	7,5	$CHCl_3$	430	[35]
Szkopolamin-butilbromid	eriokróm-fekete-T	5,6	$CHCl_3$	520	[6]
Tropán-alkaloidok	metilnarancs	5,4	$CHCl_3$	428—430	[9]
Tropán-alkaloidok	brómkrezolbíbor	3—4	$CHCl_3$	405—410	[12]
Szkopolamin-butilbromid	brómkrezolbíbor	5,3	$CHCl_3$	410	[73]
Tropán, kinin alkaloidok, sztrichnin, brucin	2,6-diklór-fenol-indofenol	híg NH_3	$CHCl_3$	580—603	[2]
Berberin	2,6-diklór-fenol-indofenol	8,5	nitro-benzol	650	[90]
Berberin	pikrinsav	11,5	1,2-diklór-etán	360	[101]
Berberin	pikrinsav	8	1,2-diklór-etán	360	[84]
Berberin	brómkrezolbíbor	7,2	$CHCl_3$	590*	[21]
Berberin	brómkrezol-bíbor + kinin	7	1,2-diklór-etán	593	[92]
Berberin	brómfenolkék + kinin	6,7	1,2-diklór-etán	610	[85]
Berberin	tetrabróm-fenol-ftalein-etilészter	8,5	1,2-diklór-etán	610	[86, 87]
Morfin, kodein, tebain	tropeolin-00	2—4,6 (M) 2—2,8 (K, T)	$CHCl_3$	552	[78]
Morfin	tropeolin-00	3,5	$CHCl_3$	543	[64]
Morfin (acetilezés után)	metilnarancs	4	$CHCl_3$	420	[14]
Kodein, tebain, noszkapin, papaverin	Solochrome Green V-150	6 (K), 3,6 (T), 2 (N), 2 (P)	$CHCl_3$	520	[83]
Kodein	brómkrezolzöld	3,8	$CHCl_3$	418	[30]
Kodein, noszkapin	Orange II.	0,5—2	$CHCl_3$	485	[10]
Kodein	metilnarancs	3,5	$CHCl_3$	418	[26]
Etilmorfin	brómtimolkék	7,6	$CHCl_3$	597*	[79]
Kinin, papaverin, sztrichnin	chromazurol-S	4,1	$CHCl_3$	450—455	[72]
Kinin	krezolvörös	5	$CHCl_3$	410	[102]
Kinin	eozin/polivinil-alkohol	2,7	extr. nélkül	540	[115]
Kinin	brómfenolkék, brómkrezolzöld	6,5 7,2	$CHCl_3$, 1,2—diklór-etán	590 550	[71]
Kinin	tropeolin 00	4,35	CH_2Cl_2	543**	[59]

10/3. táblázat. Folytatása

Alkaloid	Ionpárképző reagens	pH	Extraháló oldószer	λ, nm	Irodalom
Kinin, stb.	Orange II.	2	$CHCl_3$	485	[57]
Kinin	metilnarancs	3,5	$CHCl_3$	464*	[49]
Kinin, emetin, efedrin	tetrabrómfenol-ftalein-etilészter	8,5	1,2-diklór-etán	555, 570, 555	[89]
Brucin, sztrichnin	Solochrome Green V-150	3	$CHCl_3$	520	[81, 82]
Emetin	metilnarancs	5	$CHCl_3$	460*	[94]
Lobelin	metilnarancs	5	$CHCl_3$	510**	[56]
Nikotin	tropeolin-00	4,35	CH_2Cl_2	408 530**	[58]
Papaverin	erikrómfekete-T	2	CH_2Cl_2	518	[103]
Reszerpin	hexajodobizmutát	1 M H_2SO_4	$CHCl_3$	475	[19]
Szolaszodin	metilnarancs	4,7	$CHCl_3$	525	[16]
Tubokurarin	metilnarancs	7,8	$CHCl_3$	490**	[54]
Veratrin	brómfenolkék	2	$CHCl_3$	410	[62]

* Spektrofotometriás mérés lúgos közegben a komplex elbontása után.

** Spektrofotometriás mérés savas közegben a komplex elbontása után.

A sok hullámhosszon végrehajtott spektrofotometriás mérés és az eredmények algebrai feldolgozása is számos alkaloid-analitikai feladat megoldását teszi lehetővé. Az ortogonális polinomok módszerével pl. (lásd 4.3.3. fejezet) 324 és 344 nm között 4 nm-enként mérve megoldották kinin meghatározását novamidazofen mellett [3], hasonló sűrűséggel felvett mérési pontok alapján a 266 és 286 nm közti tartományban pedig teofillin meghatározását fenobarbitál mellett [24]. 0,5 nm-enként elvégezve a mérést, és az így kapott nagyszámú egyenlet számítógépes feldolgozásával olyan kényes analitikai feladatok is megoldhatók voltak, mint atropin (240—250 nm) és bomlástermékei: tropasav (245—266 nm) és apoatropin, ill. atropasav (255—271 nm) egymás melletti meghatározása [80].

A derivatív spektroszkópia jelentősége alkaloidok körében elsősorban a tropánvázas alkaloidoknál nagy: az igen gyenge kromofor izolált fenilcsoport alig teszi lehetővé vizsgálatukat egyszerű spektrofotometriával, a spektrum finomszerkezet viszont kiváló lehetőséget nyújt a derivatív spektrofotometriás méréshez. Knochen és munkatársai [52] a második derivált spektrumot használták homatropin-metil-bromid meghatározására gyógyszerkészítményekben. Igen érdekes Hassan és Davidson [38] módszere, ahol nem magának a tropánalkaloidnak veszik fel a második deriváltját, hanem tetrafenil-borátjuknak (a reagens feleslegétől pH 6-nál történő 1,2-diklór-etános extrakció után). Ennek a módszernek nemcsak az az előnye, hogy az extrakciós lépés következtében a meghatározás szelektivitása nő, hanem az is, hogy a reagenssel bevitt négy fenilcsoport maga is hozzájárul a derivatív spektrum amplitúdójához, ill. meghatározza azt, jelentősen növelve ezzel a mérés érzékenységét.

A derivatív spektrofotometriás módszer természetesen a spektrofotometriásan aktívabb alkaloidok körében is alkalmazható különböző háttérproblémák megoldá-

sára. Így pl. felhasználták koffein meghatározására prokain [1], ill. nátrium-benzoát [110] mellett, valamint teában, kávéban és üdítőitalokban [1], kinin és kinidin összegének mérésére cinchona extraktumokban [28], berberin meghatározására tablettakészítményben [117], kodein meghatározására tablettakészítményben tízszeres mennyiségű paracetamol jelenlétében [108], morfin és heroin egymás melletti meghatározására [55], fizosztigmin meghatározására oxidatív bomlástermékei jelenlétében [8], teofillin meghatározására szorbinsav mellett [63] stb.

Amint azt már említettük, alkaloidok körében viszonylag szerény spektrumváltozásokat figyelhetünk meg a pH változtatása hatására: ezek elsősorban a szabad fenolos hidroxilt tartalmazó morfinra és származékaira, valamint a purinvázas vegyületekre korlátozódnak. Így elsősorban ezek határozhatók meg pH változtatásra alapozott differencia-spektrofotometriás módszerrel. Néhány ilyen példát a 266. oldalon található 8/1. táblázatban mutattunk be.

A saját fényelnyelésre alapozott spektrofotometriás analízis lehetőségeit természetesen az alkaloidok körében is nagymértékben kiszélesíti a spektrofotometriás mérésnek előzetes kromatográfiás elválasztással való kombinálása. Az ilyen jellegű, rendkívül nagyszámú közleménynek még csak vázlatos bemutatására sem vállalkozhatunk összeállításunk keretei között; ehelyett egy-egy jellegzetes példa bemutatására korlátozódunk. Az oszlopkromatográfia alkalmazására példa De Fabrizio [18] módszere: egy szirupkészítmény teofillin és 7-(2-hidroxi-etil)-teofillin tartalmát hidroxil formában levő Amberlite CG-400 ioncserélőn választották el. Utóbbi vizes elúció után, majd ezt követően teofillin 1 M sósavas elúció után spektrofotometriásan mérhető.

Sokkal kiterjedtebben alkalmazzák kvantitatív analitikai célokra is a vékonyrétegkromatográfiát. Agnihotri és munkatársai [5] módszere pl. tebain meghatározására 40—55% tebaint tartalmazó nyerstermékekben szilikagél rétegen való kromatografálás és a főfolt jódgőzös előhívása után végzett tipikus elúciós-spektrofotometriás módszer. A meghatározandó anyag főfoltját és a mellé felvitt tebain standard foltját 0,1 M sósavval extrahálták, és a mérést 285 nm-nél végezték el. Összehasonlító oldat a tebain R_f-értékével egy magasságban kivágott üres szilikagél extraktuma volt. Hasonló módszert alkalmaztak egyebek között a szintetikus purinanalóg 6-merkaptopurin meghatározására bomlástermékeinek jelenlétében [75].

Ugyancsak széles körben elterjedt alkaloidok analitikájában az elúció nélküli *in situ* módszer (lásd 5.5. fejezet). Jellegzetes példa reszerpin és reszcinnamin egymás melletti meghatározása növényi kivonatokban, ill. gyógyszerkészítményekben. Az elválasztást szilikagél rétegen szén-tetraklorid—metanol 24 : 1 elegyével végezték, a denzitometrálás hullámhossza pedig 295 nm, reszerpin spektrumának hosszúhullámú maximumhelye volt [37].

10.6.2. Kémiai reakciókra alapozott módszerek

Alkaloidok kémiai reakciókra alapozott kvantitatív spektrofotometriás meghatározási módszerei közül kétségkívül a savas ionpárképző reagensekkel végrehajtott reakciókon, majd az esetek túlnyomó részében a színes ionpár extrakcióján, majd mérésén alapuló módszerek jelentősége a legnagyobb. A módszer elméleti és gyakor-

lati alapjait illetően könyvünk 7.8. fejezetére, alkaloidokra való alkalmazásainak korai irodalmára vonatkozóan pedig HIGUCHI és BROCHMANN-HANSSEN monográfiájára [39] utalunk. Ha az ott a 414—415. oldalon közölt táblázatot összehasonlítjuk a 10/3. táblázattal, ahol az utolsó 15 évben közölt néhány módszer adatait foglaltuk össze, megállapíthatjuk, hogy sem az alkalmazott reagensek, sem pedig a meghatározások módszertana tekintetében nem következtek be számottevő változások az elmúlt 30—40 évben, viszont a módszer mind a mai napig az alkaloidanalitika egyik legfontosabb módszere. Az esetek döntő többségében az optimált pH-n kloroformmal extrahálják a hagyományos reagensekkel képzett komplexet, és a szerves fázist mérik spektrofotometriásan. Az időről időre bevezetett új reagensekkel esetenként igen jó érzékenység érhető el, pl. a brucin — Solochrome Green V-150 komplexre 60 800-as moláris abszorpciós koefficienst írtak le [81]. Időnként alkalmazzák még azt a korábban gyakrabban használt megoldást, hogy az extrahált komplexet lúgos elbontással visszarázzák a vizes közegbe, ahol az alkaloid indirekt meghatározását a vele ekvivalens festékanion mérésére vezetik vissza [21, 49, 54, 79]. Egy másik megoldás a komplex erős savas elbontása és a disszociálatlan festék mérése. Ha a bontást a szerves fázissal elegyedő metanolos sósavval hajtják végre, akkor újabb extrakció nélkül lehet a mérést elvégezni [56, 58, 59].

Külön figyelmet érdemel az ionpár-extrakciós módszer alkalmazása a FIA analizátorokra (lásd 9.10. fejezet), mint pl. SAKAI dolgozatában [88], ahol a szerző berberin meghatározását írta le tetrabróm-fenolftalein ionpárképző és 1,2-diklór-etán extrahálószer alkalmazásával pH 11-nél.

A szerves festékkel való ionpárképzésen alapuló módszereknél ma már kisebb a jelentősége a különböző fémkomplex reagensekkel végrehajtott, színes termékekhez vezető reakciók alkalmazásának. Az alkaloid-analitika klasszikus módszerei között kitüntetett szerepe volt a diamino-tetrarodanato-króm(III) reagenssel (Reinecke-reagens) való reakciónak. Ez a komplex anion ui. savas közegben színes csapadékot képez a protonált alkaloid kationok széles körével. Mivel a spektrofotometriás mérés (520 nm körül) a csapadék kiszűrését, majd oldását (általában acetonban) igényli, a módszert ma már ritkábban alkalmazzák (pl. az USP XXII módszere homatropin-metilbromid tabletta meghatározására) [106f].

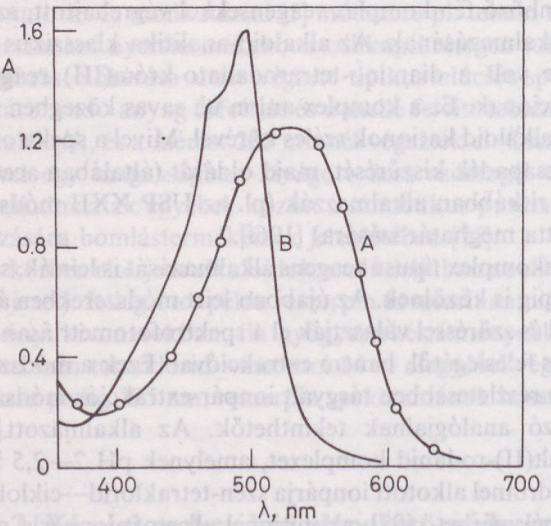
Számos más fémkomplex típusú reagens alkalmazását is leírták, sőt ilyen módszereket mind a mai napig is közölnek. Az újabban leírt módszerekben általában már nem csapadékképzéssel és szűréssel választják el a spektrofotometriásan mérendő reakcióterméket a reagens feleslegétől, hanem extrakcióval. Ezek a módszerek tulajdonképpen az előzőekben részletesebben tárgyalt ionpár-extrakciós módszerek fémkomplex reagenst alkalmazó analógjainak tekinthetők. Az alkalmazott reagensek közül megemlítjük kobalt(II)-rodanid komplexet, amelynek pH 2—2,5 között papaverinnel, kininnel és efedrinnel alkotott ionpárja szén-tetraklorid—ciklohexanonos extrakció után 625 nm-nél mérhető [97], akonitinnel alkotott ionpárja pedig kloroformos extrakció után 320 nm-nél [48]. Amino-pentaciano-vas(III), ill. nitrozil-pentaciano-vas(III) reagens alkalmazása esetén (pl. merkaptopurin meghatározására) extrakcióra sincs szükség a 455, ill. 650 nm-nél végrehajtott mérés előtt [41].

A fémkomplexképzésre alapozott módszerek közül érzékenységükkel messze kiemelkednek a japán szerzők által bevezetett, terner komplexképzésre alapozott mód-

szerek, ahol különböző fémionokat és xantén, ill. rokon származékokat alkalmaznak reagensként a terner komplex kialakítására. A mérés alapját képező komplexet vagy extrakcióval különítik el az ugyancsak színes reagenstől, vagy még inkább különböző szolubilizáló-szerekkel vagy alkalmas oldószerrel oldatban tartják a vízben rosszul oldódó terner komplexet. Az alkaloiddal való kölcsönhatás során bekövetkező batokróm eltolódás ui. — amint azt a 10/2. ábrán az urán(VI) — *o*-hidroxi-hidrokinon-ftalein—reszerpin komplex példáján bemutatjuk — elégséges mértékű ahhoz, hogy a spektrofotometriás mérést a reagens feleslegének jelenlétében is el lehessen végezni.

Néhány ilyen módszer főbb jellemzőit a 10/4. táblázatban foglaltuk össze.

A 7.9. fejezetben ismertetett töltésátviteli komplex képzés is jutott bizonyos szerephez alkaloidok spektrofotometriás analízisében. Tulajdonképpen a halogénekkel (elsősorban jóddal) való kölcsönhatáson alapuló klasszikus módszerek is ebbe a kategóriába tartoznak [39]. A régi módszer új alkalmazásai közül megemlítjük emetin és lobelin meghatározását kloroformos jódoldattal való reakció és a komplex 292 nm-nél való mérése alapján [27], papaverin, efedrin, reszerpin, homatropin-metil-bromid stb. meghatározását 1,2-diklór-etános közegben 295 nm-nél [105], valamint reszerpin szelektív meghatározását hidroklorotiazid mellett ugyanilyen módon 294 nm-nél [4]. Hioszciamin meghatározása során szén-tetrakloridot használva oldószerként a meghatározás kétféle módon is kivitelezhető volt: a komplex a szén-tetrakloridos jódoldattal mint reagens összehasonlító oldattal szemben 390 nm-nél mérhető vagy (ugyancsak a klasszikus alkaloidanalitikai mérési elv feleleventésével) a mért és



10/2. ábra. Spektrumok reszerpin meghatározásához urán(VI)-*o*-hidroxi-hidrokinon-ftalein terner komplex alakban. Oldószer: víz; pH 4,6. *A)* Reszerpin: $5 \cdot 10^{-6}$ M; urán(VI): $2{,}5 \cdot 10^{-5}$ M; *o*-hidroxi-hidrokinon-ftalein: $5 \cdot 10^{-5}$ M; metilcellulóz: 0,075%. *B)* Összehasonlító oldat (reszerpin nélkül) vízzel szemben.

(Y. Fujita, I. Mori, S. Kitano, Bunseki Kagaku **33**, E195 (1984) [35])

10/4. táblázat. Néhány alkaloid meghatározása terner komplexképzés alapján

Alkaloid	Reagens		pH	Extraháló oldószer	Szolubilizáló szer	λ_{max}, nm	$\varepsilon \cdot 10^{-4}$	Irodalom
	Fémion	Komplexképző						
Reszerpin	U(VI)	*o*-hidroxi-hidrokinonftalein	4,6	—	metilcellulóz	535	6,8	[31]
Papaverin	U(VI)	*o*-hidroxi-hidrokinonftalein	5,2	—	metilcellulóz	550	4,6	[67]
Kinin	U(VI)	*o*-hidroxi-hidrokinonftalein	5,5	—	metilcellulóz	555	4,1	[66]
Berberin	Zr(IV)	*o*-hidroxi-hidrokinonftalein + fluorid	1,8	—	Na-dodecil-szulfát	515	4,2	[33]
Papaverin	Pd(II)	tetraklór-fluoreszcein	4,0	membrán szűrő + DMSO	poli(vinil-alkohol)	540	8,0	[65]
Adenin	Ag(I)	eozin	5,0		poli(vinil-pirrolidon)	560	11,0	[34]
Pilokarpin	Cu(II)	tetrabróm-fenolftalein	9,0	1,2-diklór-etán	—	528	1,8	[91]
Atropin	V(IV)	katechin	3—4	kloroform	—	620	1,4	[100]
Tubokurarin	Zr(IV)	*o*-hidroxi-hidrokinonftalein + fluorid	2,3	—	Na-dodecil-szulfát	515	3,0	[32]

mérendő oldat megcserélése után 520 nm-nél is elvégezhető a mérés, amikor is a meghatározást a jód elszíntelenítésére alapozzuk [23]. Savas vizes közegben kálium-jodidos jódoldattal végezve a reakciót, citizin meghatározását végezték el növényi extraktumból 830 nm-nél végzett mérés alapján [116].

Atropin, pilokarpin és sztrichnin meghatározása során a reagens dioxános klóranilsav volt, és a mérést 530 nm-nél hajtották végre [25]. Ugyanezen a hullámhosszon lehet papaverin meghatározását is elvégezni cink/sósavas redukció, majd fluoranilos komplex képzés alapján [45].

Az eddig tárgyalt, többé-kevésbé általánosnak tekinthető alkaloidanalitikai módszereken túlmenően számos, az egyes alkaloidcsoportokra jellemző módszert is használtak és bizonyos esetekben ma is használnak spektrofotometriás analízisükben. A klasszikus módszerek újabb alkalmazásai közül első helyen a szabad fenolos hidroxilcsoportot tartalmazó vagy savas hasítással azzá alakítható [40] alkaloidok, mint a morfin [11k], tebain [40], kapszaicin [7] salétromossavas kezelésén és a kapott *o*-nitrozo-származék lúgos közegben 430—510 nm hullámhossz tartományban történő mérésén alapuló módszereket említjük meg, amelyek még gyógyszerkönyvi alkalmazásra is kerültek kodein [11l] és dihidrokodein [11m], morfin, ill. dihidromorfin szennyezésének mérésénél. Az ilyen származékok természetesen mérhetők azo-kapcsolási reakcióval is pl. diazotált szulfanilsavval való reakció után 520 nm-nél [29], de leírták anyarozs-alkaloidok mérését is diazotált 4-nitro-anilin reagenssel [114]. Itt említhető meg kapszaicin mérése 600 nm-nél diklór-*p*-benzokinon-klórimines reakció után [74], morfin mérése kálium-jodátos oxidáció után 450 nm-nél [96], valamint anyarozs-alkaloidok, ill. emetin perjodátos oxidációja 410, ill. 420 nm-en mérhető termékekké. Ezt a reakciót FIA analízisre (lásd 9.10.) is felhasználták [13].

Észter- vagy laktoncsoportot tartalmazó alkaloidok mérésére még ma is alkalmazzák a 7.7. fejezetben tárgyalt vas(III)-hidroxámsavas módszert (pl. reszerpin [20, 47], pilokarpin [50], hidroxikinuklidin észterek [61] meghatározására). Érdekes megjegyezni, hogy nikkel(II)ionok katalitikus hatására savamidok is átalakulnak hidroxilaminnal hidroxámsavvá, s ezt fel is használták szintetikus alkaloidanalógok (pirazinamid, morfazinamid) meghatározására [76].

Indolalkaloidok spektrofotometriás meghatározásának fontos, a legutóbbi időkig is széles körben alkalmazott klasszikus reagense a 4-dimetil-amino-benzaldehid. Ezt a van Urk-reakciót a 7.5. fejezetben részletesen tárgyaltuk; mechanizmusát a (7/12) egyenleten mutattuk be. A módszer gyógyszerkönyvi alkalmazásai közül megemlítjük dihidroergotamin-mezilát alapanyag [106g] és injekció [106h] mérését 585 nm-nél, ergometrin-maleát alapanyag [106i] és injekció [11h], ergotamin-tartarát tabletta [11i] és injekció [11j, 106j] stb. mérését. A módszert AutoAnalyzer típusú automata elemzőre is adaptálták [51]. Ugyancsak régi felismerés, hogy igen erősen savas közegben más alkaloidok is reagálnak 4-dimetil-amino-benzaldehiddel; kék szín helyett azonban ez esetben 550 nm-nél mérhető vörös színű termékhez jutunk, amit pl. tropánalkaloidok növényi extraktumokban való meghatározására is felhasználnak [42]. Az alkaloidanalitikai célokra kipróbált számos más aromás aldehid reagens közül megemlítjük 4-dimetil-amino-fehéjaldehid felhasználását brucin meghatározására [70], valamint azt, hogy előzetes acetil-acetonos kezelés után koffein is meghatározható a 4-dimetil-amino-benzaldehid reagenssel [109].

A kininalkaloidok brómos oxidációján (thalleiochin reakció) alapuló klasszikus színreakciót is alkalmassá tették kvantitatív analitikai célokra [44]. Kinin, kodein és papaverin meghatározására klóramin T reagenst [55], purinvázas alkaloidok mérésére sósavas kálium-bromátot [46], tercier amincsoportot tartalmazó alkaloidok (pilokarpin, emetin, noszkapin) mérésére pedig malonsav—ecetsavanhidrid reagenst [107] ajánlottak. Kolchicin meghatározását acetil-amino-csoportjának lítium-bór-hidrides redukciója, majd a keletkező szekunder aminocsoportnak réz(II)-ditiokarbamáttá való átalakítása útján végzik el [43].

Irodalom

1. Abdel Moety, E. M., Mostafa, A. A., Medd. Nor. Farm. Selsk. **48,** 75 (1986).
2. Abdel Salam, M., Mahrous, M. S., Issa, A. S., J. Pharm. Belg. **41,** 226 (1986).
3. Abdine, H., Elsayed, M. A.-H., Abdel-Hamed, M., Acta Pharm. Jugosl. **28,** 75 (1978).
4. Abdine, H., Elsayed, M. A.-H., Elsayed, Y. M., Analyst **103,** 354 (1978).
5. Agnihotri, A., Chandra Tewari, S., Khatod, P., Banerjee, S., Balasubramanian, Analyst **109,** 1413 (1984).
6. Altinkurt, T., Eczacilik Bul. **24,** 9 (1982).
7. Ayad, M. M., Khayyal, S. E., Farag, N. M., Anal. Letters **18,** 793 (1985).
8. Barary, M., El Sayed, M., Amin, E. A., Acta Pharm. Jugosl. **39,** 73 (1989).
9. Belikov, V. G., Karpenko, V. A., Stepanyuk, S. N., Farmatsiya **33,** 76 (1984).
10. Bosch Serrat, F., Font Perez, Y. G., An. Real Acad. Farm. **52,** 279, 637 (1986).
11. British Pharmacopoeia 1988, Her Majesty's Stationery Office, London, 1988. a. 594; b. 595; c. 51; d. 864; e. 785; f. 1000; g. 903; h. 788; i. 940; j. 789; k. 738; l. 153; m. 196.
12. Bubon, N. T., Senov, P. L., Farmatsiya **26,** 34 (1977).
13. Calatayud, J. M., Vives, S. S., Pharmazie **44,** 616 (1989).
14. Chichuev, Yu. A., Farmatsiya **33,** 70 (1984).
15. Clarke, E. G. C., Isolation and Identification of Drugs. The Pharmaceutical Press, London 1969.
16. Crabbe, P. G., Fryer, C., J. Pharm. Sci. **71,** 1356 (1982).
17. Davidson, A. G., J. Pharm. Pharmacol. **28,** 794 (1976).
18. De Fabrizio, F., J. Pharm. Sci. **67,** 572 (1978).
19. Dembinski, B., Acta Polon. Pharm. **37,** 435 (1980).
20. Dryanovska, L., Iovchev, I., Pharmazie **31,** 130 (1976).
21. El-Masry, S., Korany, M. A., Abou-Donia, A. H. A., J. Pharm. Sci. **69,** 597 (1980).
22. El-Masry, S., Wahbi, A.-A., M., J. Ass. Off. Anal. Chem. **61,** 65 (1978).
23. Elsayed, M. A.-H., Pharmazie **34,** 115 (1979).
24. Elsayed, M. A.-H., Abdine, H., Elsayed, Y. M., J. Pharm. Sci. **68,** 9 (1979).
25. Elsayed, M. A.-H., Agarwal, S. P., Talanta **29,** 535 (1982).
26. Elsayed, M. A.-H., Belal, S. F., Elwalily, A.-F. M., Abdine, H., Analyst **104,** 620 (1979).
27. Elsayed, M. A.-H., Salam, M. A. A., Salam, N. A. A., Mohammed, Y. A., Planta Med. **34,** 430 (1978).
28. El-Sebakhy, N. A., Seif El-Din, A. A., Korany, M. A., J. Pharm. Belg. **41,** 222 (1986).
29. Emmanuel, J., Viera, A. J., Indian Drugs **24,** 56 (1986).
30. Farsam, H., Yahya-Saeb, H. H., Fawzi, A., Int. J. Pharm. **7,** 343 (1981).
31. Fujita, Y., Mori, I., Kitano, S., Bunseki Kagaku **33,** E195 (1984).
32. Fujita, Y., Mori, I., Kitano, S., Kamada, Y., Bunseki Kagaku **32,** E375 (1983).

33. Fujita, Y., Mori, I., Kitano, S., Kamada, Y., Bunseki Kagaku **33,** E445 (1984).
34. Fujita, Y., Mori, I., Kitano, S., Kawabe, H., Kamada, Y., Bull. Chem. Soc. Japan **57,** 1828 (1984).
35. Grishina, M. S., Dyukova, V. V., Kovalenko, L. I., Popov, D. M., Farmatsiya **35,** 24 (1986).
36. Halim, A. F., Pharmazie **36,** 157 (1981).
37. Hartmann, V., Schnabel, G., Pharm. Ind. **37,** 451 (1975).
38. Hassan, S. M., Davidson, A. G., J. Pharm. Pharmacol. **36,** 7 (1984).
39. Higuchi, T., Bodin, J. I., „Alkaloids and Other Basic Nitrogenous Compounds", in Higuchi, T., Brochmann-Hanssen, E. (ed.), Pharmaceutical Analysis. Interscience, New York, London 1961, 313—543. old.
40. Ikonomovski, K., J. Pharm. Sci. **70,** 102 (1981).
41. Jaksevac-Miksa, M., Hankonyi, V., Karas-Gasparec, V., Acta Pharm. Jugosl. **29,** 139 (1979).
42. Karawya, M. S., Abdel-Wahab, S. M., Hifnawy, M. S., Ghourab, M. G., J. Ass. Off. Anal. Chem. **58,** 884 (1975).
43. Karawya, M. S., Diab, A. M., J. Ass. Off. Anal. Chem. **58,** 1173 (1975).
44. Karawya, M. S., Diab, A. M., J. Pharm. Sci. **66,** 1317 (1977).
45. Karawya, M. S., Diab, A. M., Swelem, N. Z., Anal. Lett. **17,** 69 (1984).
46. Karawya, M. S., Diab, A. M., Swelem, N. Z., Anal. Letters **17,** 77 (1984).
47. Karawya, M. S., Sharaf, A.-A. A., Diab, A. M., J. Ass. Off. Anal. Chem. **59,** 795 (1976).
48. Karawya, M. S., Sharaf, A.-A. A., Diab, A. M., J. Ass. Off. Anal. Chem. **59,** 799 (1976).
49. Kartashov, V. A., Knaub, V. A., Kudrikova, L. E., Kuzmina, E. Yu., Farmatsiya **33,** 37 (1984).
50. Kashkina, A., Cakste, Z., Latv. PSR. Zinat. Akad. Vestis, Kim. Ser. 582 (1986).
51. Kirchhoefer, R. D., Wells, C. E., J. Ass. Off. Anal. Chem. **58,** 879 (1975).
52. Knochen, M., Bardanca, M., Piaggio, P., Boll. Chim. Farm. **126,** 294 (1987).
53. Kostennikova, Z. P., Fetkhulinna, G. A., Grigoreva, T. V., Raschetnova, V. I., Farmatsiya **29,** 34 (1980).
54. Kuzmitskaya, A. E., Kramarenko, V. F., Farmatsiya **36,** 68 (1987).
55. Lawrence, A. H., Kovar, J., Anal. Chem. **56,** 1731 (1984).
56. Mahmoud, Z. F., El-Masry, S., Sci. Pharm. **48,** 365 (1980).
57. Manes Vinuesa, J., Bosch Serrat, F., An. Real Acad. Farm. **48,** 525 (1982).
58. Matsuoka, T. Mitsui, T., Bunseki Kagaku **31,** 377 (1982).
59. Matsuoka, T., Mitsui, T., Fujimura, Y., Eisei Kagaku **28,** 274 (1984).
60. Milch, Gy., Csontos, A., Borsai, M., Vadon, E., Mogács, I., Acta Pharm. Hung. **36,** 200 (1966).
61. Minka, A. F., Shkadova, A. I., Kalashnikov, A. A., Ogurtsov, V. V., Farm. Zh. 45 (1988).
62. Mironova, T., Farmatsiya **32,** 48 (1983).
63. Mitra, A. K., Berge, S. M., Pharm. Res. **6,** S133 (1989).
64. Mitsui, T., Fujimura, Y., Eisei Kagaku **29,** 292 (1983).
65. Mori, I., Fujita, Y., Kawabe, H., Fujita, K., Chem. Pharm. Bull. **34,** 902 (1986).
66. Mori, I., Fujita, Y., Kitano, S., Bunseki Kagaku **31,** 475 (1982).
67. Mori, I., Fujita, Y., Sakaguchi, G., Bunseki Kagaku **31,** E77 (1982).
68. Moussa, A.-F. A., Pharmazie **33,** 296 (1978).
69. Moussa, A.-F. A., Pharmazie **33,** 460 (1978).
70. Nabi, S. A.—Siddiqi, A. R., Ahmad, N., Chem. Anal. **25,** 643 (1980).
71. Ohno, N., Sakai, T., Bunseki Kagaku **34,** 695 (1985).
72. Ottis, M., Malát, M., Cesk. Farm. **29,** 131 (1980).

73. Pan, S. K., Gupta, P. N., Chib, S. K., Thomas, K. M., Ind. J. Pharm. Sci. **48,** 116 (1986).
74. Pankar, D. S., Magar, N. G., J. Chromat. 144, 149 (1977).
75. Pawelczyk, E., Majewski, W., Wezyk, E., Farm. Polska **43,** 336 (1987).
76. Pawelczyk, E., Smilowski, B., Acta Polon. Pharm. **43,** 340 (1986).
77. Peterdi, B., Sperlágh, J., Végh, M., Acta Pharm. Hung. **56,** 115 (1986).
78. Peterkova, M., Matuosova, O., Kakac, B., Cesk. Farm. **30,** 217 (1981).
79. Postrigan, I. G., Petrenko, V. V., Lutsko, P. P., Samko, A. V., Mikhno, V. V., Farm. Zh. 64 (1987).
80. Puech, A., Kister, G., Monleaud-Dupy, J., Annls. Pharm. Fr. **33,** 189 (1975).
81. Rao, N. V. R., Tandon, S. N., Chem. Anal. **22,** 965 (1977).
82. Rao, N. V. R., Tandon, S. N., Z. Anal. Chem. **286,** 256 (1977).
83. Rao, N. V. R., Tandon, S. N., Ind. J. Chem., Sect. A. **16,** 1000 (1978).
84. Sakai, T., Bunseki Kagaku **27,** 444 (1978).
85. Sakai, T., Bunseki Kagaku 493 (1982).
86. Sakai, T., Bunseki Kagaku **24,** 135 (1975).
87. Sakai, T., J. Pharm. Sci. **68,** 857 (1979).
88. Sakai, T., Analyst **116,** 187 (1991).
89. Sakai, T., Hara, I., Tsubouchi, M., Chem. Pharm. Bull. **24,** 1254 (1976).
90. Sakai, T., Hara, I., Tsubouchi, M., Chem. Pharm. Bull. **25,** 2451 (1977).
91. Sakai, T., Ohno, N., Higashi, T., Tanaka, M., Anal. Sci. **1,** 275 (1985).
92. Sakai, T., Ojima, S., Saeki, E., Tanaka, M., Bunseki Kagaku **35,** 177 (1986).
93. Salama, O., Belal, F., Analyst **111,** 581 (1986).
94. Saleh, M. R. I., El-Masry, S., El-Shaer, N., J. Ass. Off. Anal. Chem. **62,** 1113 (1979).
95. Salmeron, J. A., Bosch Serrat, F., An. Real Acad. Farm. **52,** 65 (1986).
96. Sarwar, M., Aman, T., Microchem. J. **30,** 304 (1984).
97. Shahine, S., Khamis, S., Microchem. J. **28,** 26 (1983).
98. Sharkey, M. F., Andres, C. N., Snow, S. W., Major, A., Kram, T., Warner, V., Alexander, T. G., J. Ass. Off. Anal. Chem. **51,** 1124 (1968).
99. Sharma, S. C., Sharma, S. C., Saxena, R. C., Talwar, S. K., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 321 (1989).
100. Shesterova, I. P., Talipov, S. T., Karibyan, E. E., Yakubova, M., Zh. Anal. Chim. **35,** 141 (1980).
101. Shi, J., Gu, G., Zhongcaoyao **15,** 105 (1984).
102. Soucek, J., Halámek, E., Kysilka, R., Cesk. Farm. **35,** 388 (1986).
103. Sulkowska, J., Szumska, B., Staroscik, R., Acta Polon. Pharm. **45,** 132 (1988).
104. Sunshine, I., Handbook of Spectrophotometric Data of Drugs. CRC Press, Boca Raton 1981.
105. Taha, A. M., Gomaa, C. S., J. Pharm. Sci. **65,** 986 (1976).
106. The United States Pharmacopoeia XXII. USP Convention Inc., Rockville, Md., 1990. a. 1448; b. 1205; c. 1349; d. 1083; e. 1013; f. 643; g. 440; h. 441; i. 512; j. 515.
107. Thomas, A. D., J. Pharm. Pharmac. **28,** 838 (1976).
108. Ueda, H., Pereira-Rosario, R., Riley, C. M., Perrin, J. H., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 309 (1989).
109. Vachek, J., Kakac, B., Cesl. Farm. **23,** 280 (1974).
110. Vergiechik, E. N., Saushkina, A. S., Likhota, T. T., Raimova, L. S., Farmatsiya **35,** 43 (1986).
111. Zajac, M., Farm. Polska **30,** 43 (1974).
112. Zajac, M., Baranczyk, A., Molenda, A., Acta Polon. Pharm. **42,** 30 (1985).
113. Zajac, M., Ksiezniakiewicz, B., Farm. Polska **28,** 959 (1972).

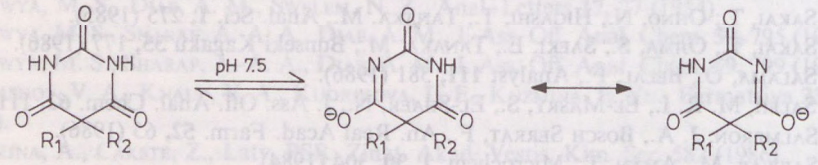
114. Zakhari, N. A., Hassan, S. M., El-Shabrawy, Y., Anal. Lett. **22,** 3011 (1989).
115. Zhebentyaev, A. I., Duksina, S. G., Farmatsiya **35,** 16 (1986).
116. Zschiedrich, H., Kickuth, R., Z. Anal. Chem. **319,** 434 (1984).
117. Yang, Q., Zhu, S., Yu, R., Nanjing Yaoxueyuan Xuebao **16,** 50 (1985).

10.7. Barbiturátok, tiobarbiturátok és hidantoinok

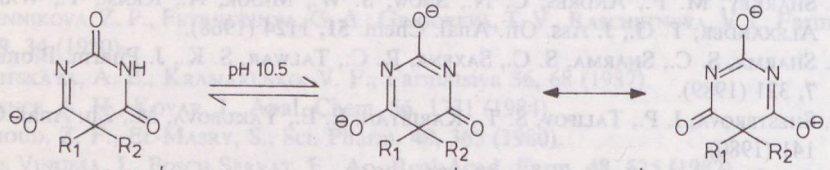
10.7.1. Meghatározás saját fényelnyelés alapján

A barbiturátok 5,5-diszubsztituált hexahidro-pirimidin-2,4,6-trion származékok. Tiobarbiturátok esetében a 2-karbonil-csoport helyén tiokarbonil-csoport található.

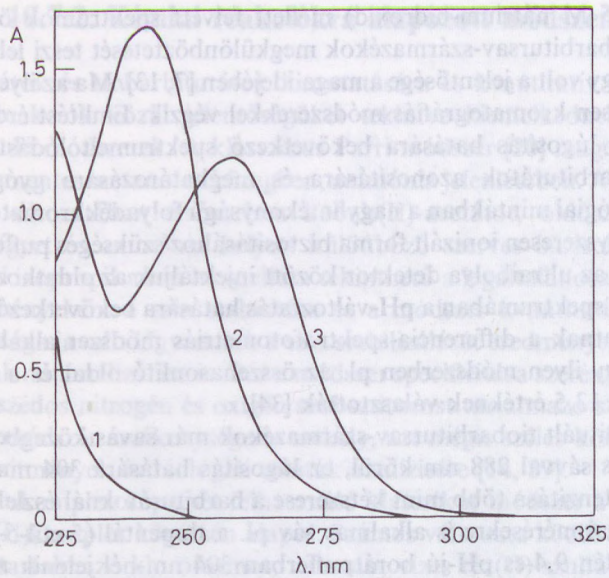
A barbiturátok spektrumait a rájuk jellemző tautoméria, ill. a kétlépcsős disszociáció határozza meg (lásd 3.12. fejezet) [28]. Az egyensúlyokat a (10/5) reakciósémán tüntettük fel.



(10/5)



A háromféle ionizációs állapothoz tartozó spektrumokat a 10/3. ábrán mutatjuk be. A nagyszámú barbiturát közül kiválasztott vegyület a proxibarbal, ahol az 5-ös szénatom két szubsztituense allil- és 2-hidroxi-propil-csoport. Látható, hogy a konjugált kötéseket nem tartalmazó nem disszociált alak, ami pH 3 alatt van jelen, csupán egy analitikai mérést lehetővé nem tevő leszálló és 250 nm-nél már levágó spektrummal jellemezhető. Az egyszeresen ionizált alak kialakulása pH 3 felett kezdődik és kb. pH 9,5-nél válik teljessé. (Az első savi disszociációs állandót Milch [15] éppen a spektrum pH-függése alapján — lásd 3.17.4. fejezet — $pK_1 = 7{,}72$-nek találta.) A 240 nm-nél megjelenő abszorpciós maximum intenzitása változatos analitikai feladatok megoldását teszi lehetővé. Az 5-szubsztituensek hatása a maximum helyére csekély: a legkülönbözőbb származékok (barbitál, fenobarbitál, butobarbitál stb.) maximuma 239—240 nm-nél jelenik meg. A moláris abszorpciós koefficiensek általában 8500 és 10 000 között vannak. Lényegében hasonló a helyzet az 1,5,5-triszubsztituált származékokkal is: itt a maximum kb. 243 nm-nél jelenik meg.



10/3. ábra. Proxibarbal spektrumai különböző pH mellett. Oldószer: víz.
1. pH 1; *2.* pH 10; *3.* pH 13. (Milch Gy., Acta Pharm. Hung. **54,** 230 (1984) [15])

A második savi disszociációs állandó ($pK_2 = 12{,}75$ [15]) 5 nagyságrenddel kisebb érték. Ez azt eredményezi, hogy az egyszeresen disszociált forma széles pH tartományban kizárólagosan van jelen, s így a kvantitatív analitikai vizsgálatoknál a pontos pH beállításnak nincs különösebb jelentősége: általában 9,5—10-es pH-jú pufferben végzik el a mérést.

Amint az a 10/3. ábrán látható, a második disszociáció 256 nm körül megjelenő maximumot eredményez. Az 1,5,5-triszubsztituált származékok (hexobarbitál, metilfenobarbitál) esetében a második disszociációra nincs lehetőség, ezért ez a batokróm eltolódás elmarad.

A második disszociáció által eredményezett enyhe batokróm eltolódásnak kvantitatív analitikai célokra való kihasználása az diszubsztituált barbitursav-származékok esetében is meglehetősen problematikus. Az igen alacsony disszociációs állandónak megfelelően teljes disszociáció csak igen erősen lúgos közegben (1 mólosnál nagyobb nátrium-hidroxid-koncentráció) következik be. Ilyen erősen lúgos közegben már számolni kell a pirimidingyűrű hidrolitikus felnyílásával, ami a sáv eltűnésével jár. A bomlás sebessége a szubsztituensek függvényében erősen különbözik [3, 8, 9, 25].

A leírtaknak megfelelően kvantitatív analitikai célokra elsősorban a 240 nm körül megjelenő sávot használják enyhén bázikus közegben. Így az USP XXII ilyen módszerrel végezteti el (pH 9,6-os borátpufferben) amobarbitál [30a], fenobarbitál [30b] és butobarbitál [30c] alapanyag, tabletta és kapszula tartalmi meghatározását, ill. „content uniformity" vizsgálatát, ill. injekció tartalmi meghatározását.

Megfelelő elválasztás után a spektrofotometriás módszer alkalmas biológiai-toxikológiai minták barbituráttartalmának meghatározására is [27], a kétféle bázicitás

(pH 9,9 és 0,45 M nátrium-hidroxid) mellett felvett spektrumok összehasonlítása pedig az egyes barbitursav-származékok megkülönböztetését teszi lehetővé; ennek a módszernek nagy volt a jelentősége a maga idejében [7, 13]. Ma az ilyen vizsgálatokat már természetesen kromatográfiás módszerekkel végzik. Említést érdemel azonban, hogy az enyhe lúgosítás hatására bekövetkező spektrumeltolódást széles körben kihasználják barbiturátok azonosítására és meghatározására gyógyszerkészítményekben és biológiai mintákban a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás vizsgálat során. Az egyszeresen ionizált forma biztosításához szükséges puffert a kromatográfiás oszlop és az ultraibolya detektor között injektáljuk az oldathoz [4, 16, 22, 35].

Barbiturátok spektrumában a pH-változtatás hatására bekövetkező eltolódások jó alapot szolgáltatnak a differencia-spektrofotometriás módszer alkalmazására (lásd 8.2. fejezet). Egy ilyen módszerben pl. az összehasonlító oldat és a mérendő oldat pH-ját 10,5, ill. 13,5 értéknek választották [34].

5,5-Diszubsztituált tiobarbitursav-származékok már savas közegben is rendelkeznek abszorpciós sávval 288 nm körül, ez lúgosítás hatására 304 nm körüli értékig tolódik el, és intenzitása több mint kétszerese a barbiturátoknál észlelteknek [24]. Ez utóbbi, analitikai mérésekre is alkalmas sáv pl. a tiopentál (5-etil-5-(1-metil-butil)-származék) esetén 9,4-es pH-jú borátpufferban 304 nm-nél jelenik meg; $\varepsilon = 22\,500$. Ennek mérésére alapozza módszerét az USP XXII tiopentál-nátrium alapanyag és injekció hatóanyag-tartalmának mérésére [30d].

A gyógyászatban alkalmazott hidantionszármazékok közül pl. az allantoin semleges és savas közegben természetesen nem rendelkezik számottevő fényelnyeléssel. Erősen lúgos közegben (pH 11—13) azonban a barbiturátoknál bemutatotthoz hasonló tautoméria és ionizáció következtében megjelenik spektrumában egy analitikai mérésekre alkalmas sáv 226 nm-nél [12], s ezt fel is használták meghatározására gyógyszerkészítményekben [11].

Hasonló jelenség a nagy jelentőségű 5,5-difenil-hidantoin esetében is megfigyelhető, a 235 nm-nél megjelenő sáv eléréséhez azonban a barbiturátoknál észlelthez viszonyítva több mint egy nagyságrenddel kisebb savi disszociációs állandó miatt erősen lúgos közegre van szükség, ezért ez a lehetőség nem talált széles körű gyakorlati alkalmazásra. Semleges, ill. savas közegben a két izolált fenilgyűrű következtében 257 nm-nél megjelenik egy igen kis intenzitású, finomszerkezettel rendelkező sáv, aminek mérése kisebb igényű analitikai feladatok megoldását teszi lehetővé, mint pl. fenitoin kapszula „content uniformity" vizsgálata [30e]. Figyelmet érdemel a fenitoin meghatározására szolgáló spektrofotometriás és nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszerek teljesítőképességének összehasonlításával foglalkozó közlemény [23].

A már említett aromás finomszerkezet fenitoin spektrumában kitűnő lehetőséget hordoz a derivatív spektrofotometria (4.5. fejezet) alkalmazására. Mind az első [31], mint pedig a második derivált [19] spektrum alapján való mérés jelentősen növeli a meghatározás szelektivitását és érzékenységét a zérórendű spektrum alapján való méréshez képest. $^2D_{250,254}$ mérése alapján Mura és munkatársai sikerrel oldották meg fenitoin-nátrium mérését kapszulákban [19].

Végül megemlítünk még egy spektrofotometriás módszert fenitoin gyógyszerkönyvi vizsgálatából. A gyógyszer-alapanyag benzofenon szennyezését 248 nm-nél mérik a szennyezésnek lúgos közegből történő szelektív *n*-heptános extrakciója után [30f].

10.7.2. Kémiai reakciókra alapozott módszerek

A barbiturátok és tiobarbiturátok kimutatására és kvantitatív meghatározására szolgáló színreakciók közül jelentőségüket tekintve kiemelkednek a fémkomplex képzésre alapuló módszerek. A klasszikus Parri-módszer [20] reagense a kobalt(II)-nitrát volt vízmentes metanolos közegben, ammónia jelenlétében. A módszer számtalan későbbi változatában elsősorban kobalt(II)-acetátot, oldószerként metanol-kloroform elegyet és ammónia helyett különböző szerves bázisokat alkalmaztak, amelyek közül izopropil-amin használata tekinthető a legáltalánosabbnak. A változtatások eredményeként a szín stabilitása és a módszer kvantitatív analízisre való alkalmazhatósága javult. Ugyancsak a szín stabilizálását eredményezi a reakcióközeg víztartalmának minimalizálása is. Bár a módszer specificitása szerény, hiszen a reakciót más, szomszédos nitrogén és oxigén szubsztituenst tartalmazó szerves vegyületek is adják, és a módszer érzékenysége is csekély, azt mégis széles körben alkalmazták barbiturátkészítmények és biológiai minták analízisére [14, 29].

A másik fémkomplex képzését felhasználó klasszikus módszer a Zwikker-reakció [6, 36], ez réz(II)komplex képzésén alapul. Számos változata közül azt említjük meg, ahol piridint tartalmazó kloroformot, valamint vizes réz(II)-szulfát-oldatot hozunk össze a vizsgálandó mintával. Ennek a módszernek már jobb a szelektivitása, bár barbiturátok, tiobarbiturátok és hidantoinok egyaránt adják a reakciót. Az elkülönülő vizes fázis színe a fenti sorrendben ibolya, zöld és kék. A reakció módosított változatát különösen tiobarbiturátok biológiai mintákban való meghatározására használták eredményesen [17, 18].

A higany(II)komplex képzésén alapuló indirekt módszer alapja higany(II)-barbiturát komplex képzése, annak kirázása a vizes pufferből kloroformmal, majd az extraktum higanytartalmának mérése ditizonos módszerrel (lásd 10.16. fejezet) [1, 2].

Az 5,5-difenil-hidantoin spektrofotometriás meghatározására szolgáló számos módszer közül megemlítjük azokat, amelyek a hidantoingyűrű oxidatív hasítása révén benzofenont állítanak elő, s ezt mérik spektrofotometriásan [21, 32, 33]. Kálium-permanganátot használva oxidálószerként, és a mérést 247 nm-nél végezve, a meghatározás biológiai mintákban is elvégezhető, sőt a két hullámhosszas mérési módszer segítségével 5,5-difenil-hidantoin és karbamazepin egymás mellett is meghatározható, míg fenobarbitál, diazepam és primidon nem zavarja a meghatározást [10].

Leírtak az aromás gyűrű nitrálásán alapuló módszereket is [5, 26]. A keletkező nitrocsoportot aminná lehet redukálni, majd diazotálni és a diazóniumvegyületek *N*-(1-naftil)-etilén-diaminnal való kapcsolás után mérni [5].

Irodalom

1. Björling, C. O., Berggren, A., Willman-Johnson, B., J. Pharm. Pharmacol. **11**, 297 (1959).
2. Björling, C. O., Berggren, A., Willman-Johnson, B., Grönvall, A., Zaar, B., Acta Chem. Scand. **12**, 1149 (1958).
3. Brandau, R., Neuwald, F., Pharm. Techn. **30**, 11 (1964).

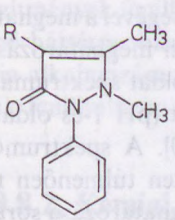
4. Clark, C. R., Chan, J.-L., Anal. Chem. **50,** 635 (1978).
5. Dill, W. A., Kazenko, A., Wolf, L. M., Glazko, A. J., J. Pharmacol. Exper. Ther. **118,** 270 (1956).
6. Flotow, E., Pharm. Zentralhalle Dtsch. **88,** 198 (1949).
7. Goldbaum, L. R., Anal. Chem. **24,** 1604 (1952).
8. Hermann, T., Pharmazie, **29,** 453 (1974).
9. Hermann, T., Pharmazie **31,** 368, 618 (1976).
10. Jaffery, N. F., Ahmad, S. N., Jailkhani, B. L., J. Pharmacol. Meth. **9,** 33 (1983).
11. Lukasiak. J., Jamrógiewicz, Z., Sznitowska, M., Pharmazie **42,** 200 (1987).
12. Lutomski, J., Jernas, B., Pharmazie **31,** 131 (1976).
13. Maher, J. R., Puckett, J., Lab. Clin. Med. **45,** 806 (1955).
14. Mattson, L. N., Holt, W. L., J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed. **38,** 55 (1949).
15. Milch, Gy., Acta Pharm. Hung. **54,** 230 (1984).
16. Minder, E. I., Schaubhut, R., Vonderschmitt, D. J., J. Chromatogr., Biomed. Appl. **428,** 369 (1988).
17. Morvay, J., Középessy, Gy., Acta Pharm. Hung. **39,** 145 (1969).
18. Morvay, J., Középessy, Gy., Nikolasew, V., Acta Pharm. Hung. **39,** 54 (1969).
19. Mura, P., Santoni, G., Pinzauti, S., Pharm. Acta Helv. **62,** 226 (1987).
20. Parri, W., Boll. Chim. Farmac. **63,** 401 (1924).
21. Saitoh, Y., Nishihara, K., Nakagawa, F., Suzuki, T., J. Pharm. Sci. **62,** 206 (1973).
22. Scott, E. P., J. Pharm. Sci. **72,** 1089 (1983).
23. Shah, V. P., Ogger, K. E., J. Pharm. Sci. **75,** 1113 (1986).
24. Smyth, W. F., Jenkins, T., Siekiera, J., Raydar, A., Anal. Chim. Acta **80,** 233 (1975).
25. Stainier, C., Pharm. Acta Helv. **38,** 587 (1963).
26. Stájer, G., Vinkler, E., Avar, Z., Pharmazie **33,** 126 (1978).
27. Stevenson, G. W., Anal. Chem. **33,** 1374 (1961).
28. Stimson, M. M., J. Am. Chem. Soc. **71,** 1470 (1979).
29. Stolman, A., Stewart, C. P., Analyst **74,** 543 (1949).
30. The United States Pharmacopoeia XXII, USP Convention Inc., Rockville, Md., 1990. a. 77; b. 1060; c. 197; d. 1364; e. 1076; f. 1073.
31. Traveset, J., Such, V., Gonzalo, R., Gelpi, E., J. Pharm. Sci. **69,** 629 (1980).
32. Wallace, J. E., Briggs, J. D., Dahl, V. E., Anal. Chem. **37,** 410 (1965).
33. Wallace, J. E., Hamilton, H. E., J. Pharm. Sci. **63,** 1795 (1974).
34. Williams, L. A., Zak, B., Clin. Chim. Acta **4,** 170 (1959).
35. Wilson, T. D., Trompeter, W. F., Gartelman, H. F., J. Liqu. Chrom. **12,** 1231 (1989).
36. Zwikker, J. J. L., Pharm. Weekblad **68,** 975 (1931).

10.8. Pirazolszármazékok

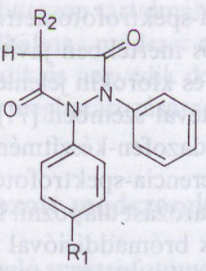
10.8.1. Meghatározás saját fényelnyelés alapján

Ebben a fejezetben a pirazolszármazékok két fontos csoportjával foglalkozunk. A legfontosabb pirazolon- és pirazolidinszármazékokat a következő két általános képleten mutatjuk be.

Pirozolonok spektrumait a 3.11. fejezetben tárgyaljuk és ott — a 3/18. ábrán — mutatjuk be az alapvegyületek, a fenazon spektrumát is. Metanolos, etanolos oldat-



pirazolonok



pirazolidinek

R = —H	fenazon (azofen, antipirin)	R_1 = —H	R_2 = *n*-butil	fenilbutazon (butazolidin)
		R_1 = —OH	R_2 = *n*-butil	oxifenilbutazon
R = —$N(CH_3)_2$	aminofenazon (amidazofen, aminopirin)	R_1 = —H	R_2 = CH_2—CH_2— | S=O	szulfinpirazon
R = —N—CH_3 | CH_2 | SO_2 | ONa	novamidazofen (dipyron, analgin metamizol, sulpyrin)			

ban két intenzív maximumuk van ($\varepsilon \sim 10\,000$); az egyik 234—236 nm táján, a másik a 265—275 nm hullámhossztartományban jelenik meg. Savas oldatban a fenti alacsonyabb hullámhosszú maximum helyén csak inflexió észlelhető, és a két maximum közti minimum helyén, 257 nm táján mutatkozik maximum. Lúgos oldatban a pirazolonszármazékok spektruma a 240—270 nm hullámhossztartományban meglehetősen ellaposodik.

Az ismertetett spektrumok alapján való mérés csak igen mérsékelt szerephez jut a különböző gyógyszerkönyvek pirazolonszármazékokra vonatkozó cikkelyeiben. Fenazon esetében pl. az USP XXII [58a] előírja az abszorbancia meghatározását 266 nm-nél metanolos oldatban. Annál több ilyen jellegű közlemény található a szakirodalomban pirazolonok egyszerű és kombinációs készítményeinek vizsgálatára. Leírták pl. fenazon és aminofenazon meghatározását szalicilsav és származékai, valamint koffein jelenlétében [27], különböző összetett készítmények aminofenazon-tartalmának meghatározását kloroformos kirázás után [50], aminofenazon mérését bomlástermékei jelenlétében [46], novamidazofen mérését készítményeiben [65]. Külön figyelmet érdemelnek a vegyületcsaládra jellemző fotokémiai bomlás tanulmányozására alkalmas — vékonyréteg-kromatográfiával kombinált — módszerek fenazon [35, 36, 37], propifenazon [38], aminofenazon [51] és izopropil-aminofenazon [52] vizsgálatára. A komputeres módszerek (4.4.2. fejezet) természetesen a pirazolonszármazékok összetett készítményeinek esetében is meggyorsítják és megbízhatóbbá teszik a meghatározásokat, amint azt pl. Santoni és munkatársai mutatták be fenazon és prokain fülcseppekben való meghatározásának példáján, ahol a mérést a 242 és 290 nm-nél mért abszorbanciák arányának meghatározására alapozták [54].

A differencia-spektrofotometria alkalmazása segítségével a meghatározások szelektivitása jelentős mértékben javítható. Aminofenazon meghatározása során mepiramin, nialamid és klorokin jelenlétében a pH 8,5-es oldat spektrumát mérték a 0,1 N kénsavas oldatéval szemben [71]. Hasonló módszert (pH 1-es oldattal szemben pH 10-es) novamidazofen-készítményekre is leírtak [20]. A spektrumok pH-függésére alapozott differencia-spektrofotometriás módszereken túlmenően más reakcióra is lehet a meghatározást alapozni. Novamidazofen meghatározása során a mérés alapja a spektrumnak brómaddícióval történő eliminációja volt [20].

A pirazolidin típusú gyógyszerek alapvegyületének, a fenilbutazonnak spektrumát a 3.12. fejezetben, a spektrumnak az enol forma disszociációja következtében bekövetkező batokróm eltolódását pedig a 3.17.2. fejezetben tárgyaljuk. Ez az enolizációra való hajlam meghatározza a vegyületcsoporthoz tartozó vegyületek spektrofotometriás meghatározásának lehetőségeit.

Minthogy a vegyület enol formája kb. ecetsav erősségű sav ($pK=4{,}8$), a fenti szerkezetnek megfelelő diketo forma csak szerves oldószerben (pl. etanolban) vagy vizes közegben pH 2 alatt van jelen. Az ehhez tartozó spektrum ($\varepsilon_{240\,nm}=15\,900$) is alkalmas spektrofotometriás meghatározásokra, gyakrabban alkalmazzák azonban a már egészen enyhén lúgos közegben is teljesen enolát alakban jelen levő anyag spektrumát ($\varepsilon_{264\,nm}=20\,400$) fenilbutazon szelektív és érzékeny meghatározására. Különösen növelhető a szelektivitás a differencia-spektrofotometria alkalmazásával, amikor is a savas oldattal szemben mérjük az enyhén lúgos oldat spektrumát, kiejtve az adott pH-határok között spektrumukat nem változtató anyagok zavaró hatását. Lényegében hasonlók a lehetőségek fenilbutazonnak az oldalláncban vagy a fenilcsoporton helyettesítő többi származékával is [33].

A saját fényelnyelésre alapozott gyógyszerkönyvi módszerek közül megemlítjük, hogy az USP XXII fenilbutazon vizsgálata során előírja az abszorbancia meghatározását 264 nm-nél, és ugyanezen a hullámhosszon határozza meg a tabletta kioldódási vizsgálat során a hatóanyagot [58b]. Szulfinpirazon kapszula és tabletta kioldódási vizsgálata során a mérési hullámhossz 259 nm [58c]. Oxifenilbutazon szemkenőcsnek a BP-88 szerinti vizsgálata során petroléteres extrakció, majd az extraktum vizes nátrium-karbonátos kirázása után a vizes fázis abszorbanciáját mérik (éteres tisztítás után) 254 nm-nél [15].

A szakirodalom is számos leírást tartalmaz fenilbutazon [34], oxifenilbutazon [6] és más pirazolidinszármazékok spektrofotometriás meghatározására.

Az etanolos oldatban végzett spektrofotometriás mérésen és egyszerű gyógyszerkészítmények meghatározásán [56] túlmenően a két hullámhosszon való mérés lehetővé teszi kétkomponensű készítmények analízisét is, mint pl. fenilbutazon—amidazofen [3], oxifenilbutazon—novamidazofen [10, 17], valamint pl. fenilbutazon és hidrolitikus bomlástermékének egymás melletti meghatározását [41] stb.

Az említett differencia-spektrofotometriás módszert is számos gyógyszerkészítmény analízisére használták fel, így pl. fenilbutazon szelektív mérésére amidazofen és prednizolon mellett [21], oxifenilbutazon és paracetamol egymás melletti meghatározására [40], valamint fenilbutazon, oxifenilbutazon, szulfinpirazon, kebuzon és tribuzon számos további gyógyszerkészítményének tartalmi meghatározására [1, 9, 13].

Gyógyszerkészítmények fenilbutazon, ill. oxifenilbutazon tartalmának meghatározása során fellépő háttérproblémák megoldására alkalmas módszer az első derivált spektrofotometria alkalmazása is [31, 32]. A harmadik és negyedik derivált spektrumot felhasználták fenilbutazon bomlástermékeinek meghatározására is [48].

10.8.2. Kémiai reakciókra alapozott módszerek

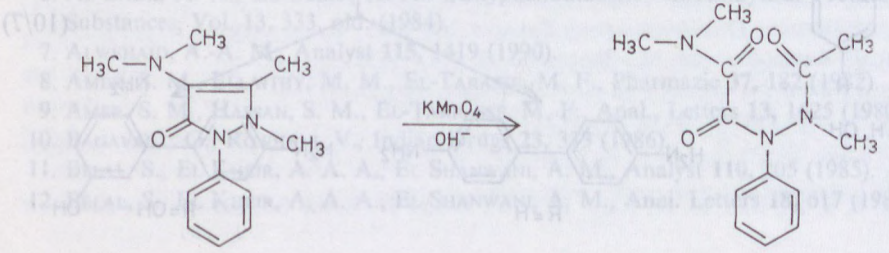
A pirazolonszármazékok származékképzésen alapuló spektrofotometriás meghatározására számos reakció található az irodalomban. A fenazon 4-dimetil-amino-benzaldehiddel [14, 24, 42, 53] vörös, 4-dimetil-amino-fahéjaldehiddel [60] kék színeződést ad. E reakció létrejöttéhez szükséges, hogy a pirazolonváz 4-es szénatomja szabad legyen, így e reakciót az aminofenazon nem adja, sőt e reakció alkalmas az aminofenazon fenazonszennyezésének kimutatására is [22]. E régóta ismert színreakciót a közelmúltban felülvizsgálták és megállapították, hogy a korábban feltételezett egyszerű kondenzációs termék helyett kinoidális szerkezetű polimetinszármazék képződik. A piros színű terméknek 510, a kéknek 610 nm hullámhossz táján van abszorpciós maximuma [45].

A fenazon azonosítására régóta ismert a nitrozált termék képzésén alapuló színreakció, amikor is zöld színű 4-nitrozo-fenazon képződik, amelynek elnyelési maximuma 600 nm-nél van; ezt a reakciót tartalmi meghatározássá fejlesztették [30, 39]. E módszer továbbfejlesztett változata szerint a nitrozált terméket ecetsavas közegben 8-hidroxi-1-naftilamin-4-szulfonsavval kondenzációs termékké alakítják át, majd ennek fényelnyelését mérik az 565 nm-nél mutatkozó maximumban [26].

A fenazon egy másik, régóta ismert azonossági reakciója a savas közegben vas(III)ionnal adott piros színeződés, amelyet tartalmi meghatározássá finomítottak [16, 28]. Mint érdekességet jegyezzük meg, hogy a komplex alkalmas fluoridionok mennyiségének indirekt úton való meghatározására: a fluoridionok gátolják a vas(III)-fenazon komplex képződését, és a komplex piros színe intenzitásának csökkenése arányos a fluoridion-koncentrációval.

Mint gyenge, ill. középerős bázisok fenazon és aminofenazon is meghatározhatók savas festékkel képezett ionpárjuk kloroformos extrakciója után. Fenazon esetében pl. metilnarancsot alkalmaztak reagensként pH 5,5-nél [44], míg aminofenazon esetében tropeolin 00 volt az ionpárképző reagens, és a pH 2,8 volt [4].

Néhány redoxireakción alapuló módszert is leírtak aminofenazon meghatározására. Szász és munkatársai módszerének [57] reagense kálium-permanganát volt, ami lúgos közegben gyűrűfelnyílás közben oxidálja aminofenazont. Az oxidált termék kloroformmal extrahálható és 248 nm-nél mérhető. Lásd a (10/6) reakciósémát.



aminofenazon

(10/6)

Indirekt módszerek alapját képezi az aminofenazon és vas(III)ionok között lejátszódó redoxireakció, ahol a keletkező vas(II)ionokat α,α'-dipiridil- [61], ill. fenantrolinkomplexük [59] alakjában mérik.

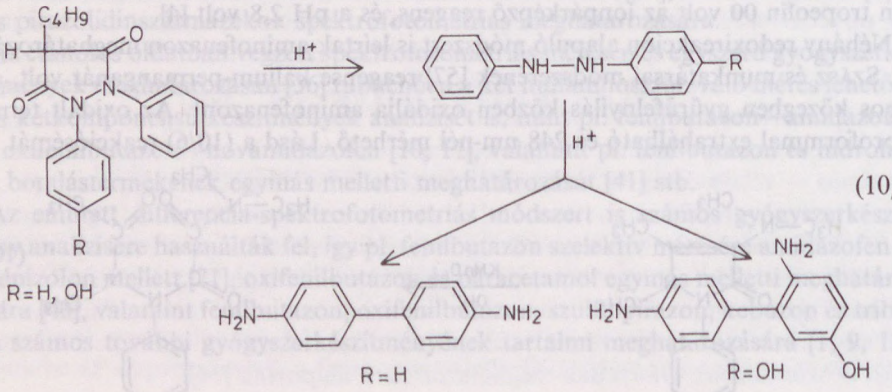
Az aminofenazon meghatározására leírt egyéb módszerek közül megemlítjük az azokapcsoláson alapuló módszert, ahol a reagens diazotált 4-nitro-anilin volt [25]. Említést érdemel, hogy újabban ezt a reakciót alkalmazták a 4-aminoantipirin (aminofenazon gyártásának köztiterméke, ill. — amint ezt a 236. oldalon bemutatjuk — fontos fenolreagens) meghatározására is [56], sőt legújabban leírták a módszer FIA változatát is (lásd 9.10. fejezet) [7].

Az eddig tárgyaltakhoz hasonlóan a novamidazofen meghatározására kidolgozott módszerek alapját is általában redoxi és komplexképzési reakciók alkotják. Így itt is leírták a 4-nitrozo-származék képzésére alapozott módszert [2, 18]. Novamidazofen redukáló sajátságaira látszott épülni az az indirekt módszer is, amelynek reagense neotetrazólium-klorid és a meghatározást a reagensből keletkező formazán 435 nm-nél végrehajtható mérésére alapozzák [63]. Legújabban azt találták, hogy a reagenst nem közvetlenül a meghatározandó anyag, hanem az abból a reakció lúgos reakcióelegyében keletkező szulfitionok redukálják [62]. Ugyancsak indirekt redoxireakción alapul az a módszer, ahol a novamidazofen és jodátionok közti reakcióban felszabaduló jódot extrahálják kloroformmal, majd ezt mérik [49].

A réz(II)komplex 340 nm-nél való mérésére alapozott módszernél sokkal érzékenyebb Fujita és munkatársai [23] módszere, ahol a cérium(IV)—*o*-hidroxi-hidrokinonftalein komplex és a meghatározandó novamidazofen közötti ligandumkicserélődési reakció a mérés alapja. Az 570 nm-nél mért abszorbancia fordítottan arányos a novamidazofen koncentrációjával. Itt a látszólagos moláris abszorpciós koefficiens nem kevesebb, mint 120 000.

Megemlítjük még dimetil-amino-benzaldehid reagens alkalmazását ($\lambda_{max} = 420$ nm) [64].

Fenilbutazon és származékainak kémiai reakciókra alapozott spektrofotometriás módszereinek jelentős részében az indító reakció a pirazolidindiongyűrű savas hidrolitikus hasítása. A tömény sósav és különböző szerves oldószerek (etanol, ecetsav) különböző arányú elegyeiben általában a forráspont hőmérsékletén lejátszódó reakció során hidrazo-benzol keletkezik, ami az adott kísérleti körülmények között benzidin átrendeződést szenved (10/7 reakcióegyenlet).



(10/7)

Az így nyert diamino-difenil-származékok többféle, további reakciókra alapozott módszer alapját képezik. A primer aromás aminocsoportok Schiff-bázis képzése 4-dimetil-amino-benzaldehiddel fenilbutazon esetében 460 nm-nél, oxifenilbutazon esetében pedig 436 nm-nél mérhető termékhez vezet [67]. További kondenzálószerek pl. naftokinon [29] és 4-dimetil-amino-cinnamaldehid ($\lambda_{max} = 525$—540 nm; $\varepsilon = 24\,000$—$65\,000$) [19]. Oxifenilbutazon meghatározására sikerrel alkalmazták az indofenol reakciót is: a 4-amino-fenol típusú hidrolízistermék a levegő oxigénje jelenlétében, lúgos közegben intenzív színű indofenolt képez fenollal ($\varepsilon_{635\,nm} = 14\,900$) [66, 68], ill. *o*-krezollal [69]. A legkorábban alkalmazott lehetőség diazotálás, majd kapcsolás 1-dimetil-amino-naftalinnal [47]. Megjegyzendő, hogy a fenol típusú oxifenilbutazon esetében az azokapcsolási reakció előzetes savas hasítás nélkül is alkalmazható. Belal és munkatársai [11] diazotált *o*-nitro-anilint használtak reagensként, és így nyertek 435 nm-nél közepes intenzitással rendelkező származékot ($\varepsilon = 5000$). Hasonló volt az érzékenysége annak a szelektívebb módszernek, amelynek alapját a nyert azovegyület réz(II)-komplexének kloroformos extrakciója képezte, kétszeresre volt azonban növelhető az érzékenység egy olyan indirekt megoldás segítségével, ahol az extrahált réz(II)-kelát réztartalmát átalakították dietil-ditiokarbamáttá.

Az egyéb módszerek közül megemlítjük oxifenilbutazon előzetes savas hasítás nélküli kezelését savas nátrium-nitrittel; a keletkező 2-nitrozo-fenol-származékot lúgos közegben közvetlenül lehet mérni 358 nm-nél [8], ill. 380 nm-nél [3] vagy réz(II)-, ill. kobalt(II)komplexüket mérik meg metil-izobutil-ketonos extrakció után 357, ill. 330 nm-nél [12]. Számos módszer alapját képezik a vegyületcsalád redukáló sajátságai. Alkalmazható pl. a molibdénkékes módszer [43], oxidáció vas(III)ionokkal és a keletkező vas(II) mérése kálium-ferricianiddal [43] vagy — oxifenilbutazon esetében — oxidatív kapcsolás 4-amino-antipirinnel [3], oxidáció azo-benzollá lúgos permanganáttal, majd mérés 314 nm-nél [70]. Mint sav karakterű anyagok fenilbutazon és oxifenilbutazon ionpárt képeznek megfelelő kationokkal. Ferroinnal (*o*-fenantrolin vas(II)komplexe) képezett ionpárjuk nitro-benzollal extrahálható és 500 nm-nél mérhető [55].

Irodalom

1. Abdine, H., Elsayed, M. A.-H., Abdel-Hamid, M. E., Ind. J. Pharm. Sci. **41,** 118 (1979).
2. Abdine, H., Soliman, S. A., Magdi, G. M., J. Pharm. Sci. **62,** 1834 (1973).
3. Abou-Ouf, A., Walash, M. I., Hassan, S. M., El-Sayed, S. M., Analyst **105,** 169 (1980).
4. Adamski, R., Pawelczyk, E., Farm. Pol. **23,** 295 (1967).
5. Al-Abachi, M. Q., Al-Delami, A. M. S., Al-Najafi, S., Analyst **113,** 1661 (1988).
6. Al-Badr, A. A., El-Obeid, H. A.: „Oxyphenbutazone" in Analytical Profiles of Drug Substances, Vol. 13. 333. old. (1984).
7. Alwehaid, A.-A. M., Analyst **115,** 1419 (1990).
8. Amer, S. M., Ellaithy, M. M., El-Tarasse, M. F., Pharmazie **37,** 182 (1982).
9. Amer, S. M., Hassan, S. M., El-Tarrasse, M. F., Anal., Letters **13,** 1625 (1980).
10. Bagavant, G., Rowhani, V., Indian Drugs **23,** 373 (1986).
11. Belal, S., El Kheir, A. A. A., El Shanwani, A. M., Analyst **110,** 205 (1985).
12. Belal, S., El Kheir, A. A. A., El Shanwani, A. M., Anal. Letters **18,** 617 (1985).

13. Bezakova, Z., Bachrata, M., Blesova, M., Knazko, L., Farm. Obz. **49,** 157 (1980).
14. Bontemps, R., Parmentier, J., Diessé, M., J. Pharm. Belg. **23,** 222 (1968).
15. British Pharmacopoeia 1988, Her Majesty's Stationery Office, London, 1988. 689. old.
16. Celechovky, J., Svobodova, D., Ceskosl. Farm. **8,** 380 (1959).
17. Chatterjee, P. K., Jain, C. L., Sethi, P. D., Ind. J. Pharm. Sci. **49,** 111 (1987).
18. El-Kheir, A. A., Belal, S., Shanwani, A., Pharmazie **40,** 62 (1985).
19. El-Kommos, M. E., Analyst **108,** 1144 (1983).
20. Elsayed, M. A.-H., Abdine, H., Abdel-Hamid, M. E., Analyst **104,** 568 (1979).
21. Elsayed, M. A.-H., Abdine, H., Abdel-Hamid, M. E., Ind. J. Pharm. Sci. **40,** 52 (1978).
22. Europäisches Arzneibuch. 1. Ausgabe. Band II. — Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart 1975. 144. old.
23. Fujita, Y., Mori, I., Kitano, S., Bunseki Kagaku **33,** E383 (1984).
24. Hahn, M., Kolsek, J., Perpar, M., Z. Anal. Chem. **151,** 104 (1956).
25. Haslinger, R., Struntz, W., Arzneimittelforsch. **5,** 61 (1951).
26. Hentrich, K., Pfeiffer, S., Pharm. Zhalle **106,** 735 (1967).
27. Heise, D., Pfeiffer, S., Dtsch. Apoth. Ztg. **115,** 2024 (1975).
28. Horn, D., Pharmazie **6,** 330 (1951).
29. Issa, A. S., Beltagy, Y. A., Kassem, M. G., Daabees, H. S., Talanta **32,** 657 (1985).
30. Juhl, L., Arch. Pharm. Chemi (Dánia) **76,** 819 (1969).
31. Korany, M. A., Wahbi, A. M., Elsayed, M. A., Mandour, S., Anal. Letters **17,** 1373 (1984).
32. Korany, M. A., Wahbi, A. M., Elsayed, M. A., Mandour, S., Farmaco Ed. Prat. **39,** 243 (1984).
33. Kracmar, J., Kracmarova, J., Remsova, M., Kovarova, A., Pharmazie **43,** 681 (1988).
34. Laik, Ali, S.: „Phenylbutazone" in Analytical Profiles of Drug Substances, Vol. 11. 483. old. (1982).
35. Marciniec, B., Pharmazie **39,** 103 (1984).
36. Marciniec, B., Acta Polon. Pharm. **40,** 185 (1984).
37. Marciniec, B., Pharmazie **40,** 180 (1985).
38. Marciniec, B., Vojciechowska, B., Acta Polon. Pharm. **46,** 248 (1989).
39. Nieth, H., Thiele, P., Klin. Wochenschr. **36,** 832 (1958).
40. Parimoo, P., Drug Dev. Ind. Pharm. **13,** 127 (1987).
41. Pawelczyk, E., Wachowiak, R., Chem. Anal. **14,** 925 (1969).
42. Pesez, M., Ann. Chim. Anal. **24,** 11 (1942).
43. Peterkova, M., Kakac, B., Matousova, O., Cesk. Farm. **26,** 255 (1977).
44. Pietura, A., Farm. Pol. **29,** 425 (1973).
45. Pindur, U., Arch. Pharmaz. **313,** 301 (1980).
46. Pohloudek-Fabini, R., Gundermann, P., Pharmazie **35,** 685 (1986).
47. Pulver, R., Schweiz. Med. Wschr. **80,** 308 (1950).
48. Quaglia, M. G., Carlucci, G., Cavicchio, G., Mazzeo, P., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 421 (1988).
49. Quereshi, S. Z., Sajed, A., Hasan, T., Talanta **36,** 869 (1989).
50. Réffy M., Küttel D., Szigetváryné Takácsy Nagy M., Gyógyszerészet **14,** 256 (1970).
51. Reisch, J., Abdel-Khalek, M., Pharmazie **34,** 408 (1979).
52. Reisch, J., Ekiz, N., Güneri, T., Arch. Pharmaz. **319,** 973 (1986).
53. Rózsa, P., Acta Pharm. Hung. **27,** 246 (1957).
54. Santoni, G., Mura, P., Pinzauti, S., Lombado, E., Gratteri, P., Int. J. Pharm. **64,** 235 (1990).
55. Sarma, B. S. R., Rao, K. B., Raju, D. J. K., Indian J. Pharm. Sci. **52,** 188 (1990).

56. Stuzka, V., Ceskoslov. Farmac. **38,** 446 (1989).
57. Szász, Gy., Kovács, Á., Ladányi, L., Acta Pharm. Hung. **48,** 221 (1978).
58. The United States Pharmacopoeia XXII, USP Convention Inc., Rockville, Md., 1990. a. 105; b. 1067.
59. Tonooka, K., Sato, M., Mizukami, H., Yarimizu, S., Sankyo Kenkyusho Nempo **18,** 160 (1966).
60. Tulus, R., Aydogan, Y., Istanbul Univ. Eczacilik Fak. Mecm. **3,** 168 (1967).
61. Vasileva-Alexandrova, P., Mikrochim. Acta 582 (1971).
62. Vasileva-Alexandrova, P., Alexandrov, A., Pharmazie **45,** 348 (1990).
63. Vasileva-Alexandrova, P., Shishmanov, P. S., Anal. Chem. **47,** 1432 (1975).
64. Végh, A., Szász, gy., Kertész, P., Acta Pharm. Hung. **31,** 49 (1961).
65. Végh, A., Szász, Gy., Kertész, P., Pharmazie **17,** 512 (1962).
66. Verma, K. K., Jain, A., Analyst **110,** 997 (1985).
67. Verma, K. K., Jain, A., Patel, N., Sanghi, S. K., Farmaco, Ed. Prat. **42,** 185 (1987).
68. Verma, K. K., Sanghi, S. K., Farmaco, Ed. Prat. **43,** 13 (1988).
69. Viswanath, K. K., Rao, A. S., Sivaramakrishnan, M. V., Indian Drugs **24,** 170 (1986).
70. Wallace, J. E., J. Pharm. Sci. **57,** 2053 (1968).
71. Wahbi, A. M., Abdine, H., Blaih, S. M., Pharmazie **33,** 96 (1978).

10.9. Benzdiazepinek

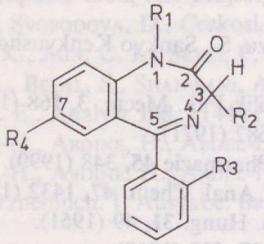
10.9.1. Meghatározás saját fényelnyelés alapján

A gyógyászatban leggyakrabban alkalmazott, közös képlettel jellemezhető 1,4-benzdiazepinek szerkezetét a 10/5. táblázatban foglaltuk össze.

A 10/5. táblázatban nem szereplő származékok közül a nagy fontosságú klórdiazepoxid diazepingyűrűjében az 1 és 2 helyzet között is kettős kötés, a 2-es helyzetben metil-amino, a 7 helyzetben klór van, a 3-as szénatom szubsztituálatlan, a 4-es nitrogén pedig *N*-oxid formában van. A bromazepam jellemzője a 5-piridil és a 7-bróm szubsztituens. A medazepam a diazepam 2-deoxo analógja, a tetrazepamra az 5-ciklohexenil, az estazolamra és a triazolamra pedig a 2 és 3 helyzetben a gyűrűrendszerre kondenzált triazolgyűrű a jellemző. Említést érdemelnek még a 2-tion analógok is.

Amint azt a 3.11. fejezetben részletesen tárgyaltuk, az 1,4-benzdiazepinek spektrofotometriásan erősen aktív anyagok (lásd diazepam és nitrazepam spektrumait a 3/25. ábrán). Mivel az 1-es helyzetben szubsztituálatlan származékok iminocsoportja savas karakterű, a 4-es nitrogén viszont bázisos, a spektrumok erős pH-függést mutatnak [23, 42]. Különösen a savas közegben végbemenő batokróm eltolódás következtében juthatunk mind az azonosítást, mind pedig a kvantitatív mérést is lehetővé tevő strukturált és intenzív spektrumokhoz. Ezek alapján elvégezhető kvantitatív meghatározásuk gyógyszerkészítményekben. Így pl. diazepam meghatározását tabletta-, ill. kapszulakészítményekben az USP XXI kloroformos extrakció, az extraktum kirázásos tisztítása, majd oldószercsere után híg vizes kénsavas közegben végeztette 285 nm-nél [46], de a kioldódási vizsgálatokat az USP XXII-ben is 284 nm-nél végzik [47a]. A Brit Gyógyszerkönyv ugyanezen a maximumon közvetlen híg savas—vizes—metanolos extrakció után végezteti el a mérést [7a]. Az injekciós és elixír készítmények kloroformos extrakció és oldószercsere után ugyancsak híg kénsavas közegben

10/5. táblázat. Néhány fontosabb 1,4-benzdiazepin-származék



	R_1	R_2	R_3	R_4
Diazepam	CH_3	H	H	Cl
Nitrazepam	H	H	H	NO_2
Oxazepam	H	OH	H	Cl
Clonazepam	H	H	Cl	NO_2
Flunitrazepam	CH_3	H	F	NO_2
Flurazepam	$(CH_2)_2—N(C_2H_5)_2$	H	F	Cl
Lorazepam	H	OH	Cl	Cl
Prazepam		H	H	Cl
Clorazepat	H	COOH	H	Cl
Temazepam	CH_3	OH	H	Cl
Lormetazepam	CH_3	OH	Cl	Cl

kerülnek mérésre. Érdekesség itt az, hogy a mérést a hosszúhullámú, kisebb intenzitású, de igen szelektív kvantitatív méréshez még kellőképen intenzív 368 nm-es maximumhelyen végzik el [7b]. Klórdiazepoxid tabletta és kapszula meghatározását az extraktum savas közegben végzett közvetlen spektrofotometrálásával végezhetjük el 308 nm-nél [7c], vagy a nagyobb érzékenységet biztosító 245 nm-es hullámhosszon [47b]. Flurazepam, ill. nitrazepam tabletta mérésére savas—metanolos közegben a 284 nm-es, ill. 280 nm-es maximumhelyet írták elő [7d, 7e]. Nitrazepam esetében a szabad iminocsoport lúgos közegben végbemenő deprotonálódását és az ezzel járó batokróm eltolódást kihasználva a nagy intenzitású 366 nm-es maximumhelyen is érzékeny és szelektív meghatározásra van lehetőség [41]. Az oldószer, a pH és a mérési hullámhossz megfelelő megválasztásán alapuló számos egyszerű spektrofotometriás módszert írtak még le a fenti és egyéb benzdiazepin-származék (tetrazepam, medazepam, clorazepat, 2-tion analógok stb.) meghatározására gyógyszerkészítményekben [18, 29, 43, 48]. A spektrofotometriás mérés még olyan kényes feladat elfogadható színvonalú megoldását is lehetővé tette, mint klórdiazepoxid meghatározása plazmában. Jatlow [24] kloroformos extrakció, az extraktum lúgos extrakciós tisztítása, sósavba való vissza-extrahálás, savas, ill. lúgos közegben való mérés, valamint korrekciók alkalmazása segítségével jutott kvantitatív eredményekhez.

Bár — amint erre az eddig leírtakban rámutattunk — a saját spektrum maximumhelyein elvégzett mérés segítségével megoldható benzdiazepin típusú gyógyszerkészít-

mények analízisének csaknem valamennyi feladata, bizonyos esetekben mégis szembekerül az analitikus olyan feladatokkal is, amelyek fejlettebb módszerek alkalmazását igényelik. Ilyen elsősorban a bomlástermékek jelenlétében elvégzendő meghatározás problémája. A 7.6. és 9.7. fejezetekben részletesen ismertettük benzdiazepinek hidrolitikus bomlását, ami 2-amino-benzofenon-származékokhoz vezet. Ezek jelenlétében (pl. stabilitási vizsgálatoknál) természetesen nem alkalmazható a közvetlen egy hullámhosszas spektrofotometriás mérés. KORANY és munkacsoportja sikerrel alkalmazta az ilyen típusú feladatok megoldására a 4.3.3. fejezetben ismertetett, több hullámhosszon való mérésen és ortogonális polinomokkal való számításon alapuló módszert. 0,1 M sósavban végezve a mérést (ahol a bomlatlan benzdiazepinek spektruma batokróm, a bomlásterméké pedig hipszokróm eltolódást szenved) 8 nm-enként végezve a mérést diazepam esetében 272 és 360 nm között, klórdiazepoxid esetében pedig 230 és 318 nm között végezhető el a stabilitási vizsgálatokat is lehetővé tevő szelektív meghatározás [5]. Hasonlóképpen végezték el nitrazepam, prazepam és clorazepat meghatározását is [15]. Ez a módszer alkalmas bizonyos kombinált készítmények vizsgálatára is pl. oxazepam meghatározására dipiridamol mellett [26].

A háttérproblémák megoldásának másik módszere, a derivatív spektrofotometria is alkalmas a benzdiazepinek meghatározására bomlástermékeik jelenlétében. ABDEL-HAMID és ABUIRJEIE [1] pl. a negyedik derivált spektrum alapján végezte el diazepam és oxazepam szelektív meghatározását bomlástermékeik jelenlétében, RICHTER pedig $^2D_{237,247}$ mérése alapján végezte el bromazepam tabletta hatóanyag-tartalmának mérését [40].

Különböző pH-függésű spektrummal rendelkező származékok kombinációs készítményei esetében sikerrel alkalmazható a differencia-spektrofotometria is. DAVIDSON pl. demoxepam és klórdiazepoxid egymás melletti meghatározását végezte el pH 8—13, ill. 3—8 közti differenciaspektrumok felvétele alapján [10]. A nitrazepam tabletta meghatározására szolgáló differencia-spektrofotometriás módszer 282 nm-nél méri a pH 13-as oldattal szemben a pH 1-es oldatot [11].

A differencia-derivatív spektrofotometriás módszert (lásd 4.5.3.) alkalmazták EL-YAZBI és munkatásai [16] oxazepam és fenobarbitál meghatározására dipiridamol jelenlétében, valamint ABOUNASSIF [2] bromazepam tabletta hatóanyag-tartalmának mérésére.

A háttérproblémák megoldásának másik, általánosan alkalmazható megoldása természetesen az előzetes kromatográfiás elválasztás. Oszlopkromatográfiás elválasztást alkalmaztak pl. PEERAN és munkatársai [37] diazepam meghatározására oxifenilbutazonnal és paracetamollal kombinált készítményben, míg clonazepam szelektív meghatározását szennyezései és bomlástermékei jelenlétében PAWELCZYK és munkatársai [36] vékonyréteg-kromatográfiás elválasztás, elúció és spektrofotometriás mérés segítségével végezték el. Az oszlopkromatográfiás tisztítás után végzett második derivatív spektrofotometriás mérés segítségével MARTINEZ és GIMENEZ [32] diazepam, nitrazepam, klórdiazepoxid és clorazepat meghatározását vér- és vizeletmintákban is el tudták végezni.

Megjegyezzük még, hogy a spektrofotometriás mérést LATTORE és munkatársai [28] sikerrel alkalmazták clonazepam meghatározására a FIA módszerrel (lásd 9.10. fejezet). Ugyancsak a FIA módszerrel oldották meg FEHÉR és munkatársai [17] nitrazepam tabletta kioldódási görbéjének felvételét.

10.9.2. Kémiai reakciókra alapozott módszerek

Bár a saját fényelnyelés mérésére alapozott módszerek segítségével sikeresen oldották meg a benzdiazepinek analízise során felmerülő problémák széles körét, bizonyos jelentősége különösen a fejlődés korábbi fázisában volt, s a klinikai-toxikológiai analízisben a mai napig is van a kémiai reakciókra és a színes reakciótermék mérésére alapozott módszereknek.

A legszelektívebb meghatározási módszer alapja a 7.6. és 9.7. fejezetekben részletesen tárgyalt és (7/19) reakcióegyenletben nitrazepam példáján bemutatott sav katalizálta hidrolitikus hasítás, ami szubsztituált 2-amino-benzofenonokhoz és glicinhez vezet. A reakció teljessé tétele a különböző származékok esetében meglehetősen tömény (3—6 mólos) sósavval való rövidebb-hosszabb forralással érhető el. Figyelmet érdemel a mikrohullámú kályha alkalmazásával elérhető rövid reakcióidő [12]. A legegyszerűbb mérési lehetőség a keletkező 2-amino-benzofenon-származék abszorbanciájának közvetlen meghatározása a hidrolizáló elegyben, pl. nitrazepam esetében 360 nm-nél [44], ez azonban sem érzékenységben, sem pedig a mérés hullámhosszát illetően nem jelent előnyt a direkt méréshez viszonyítva. Előnyösebb a termék kloroformos extrakció utáni mérése [3]: így pl. diazepam esetében 410 nm-nél mérhetünk. Az ezzel a módszerrel elért legszebb eredmény kétségkívül DE SILVA és STROJNY [14] módszere, akik vizeletminták sósavas hidrolitikus kezelése, extrakció, majd vékonyréteg-kromatográfiás elválasztás és elúció után flurazepam és metabolitjai egymás melletti meghatározását végezték el az egyes hasított metabolitok 392 és 412 nm közti maximumhelyein.

Érdekes LA GUARDIA és munkatársai [13] módszere; itt a savas hidrolizátumhoz felületaktív anyagot adtak (Nemol Y 1030), és ennek hatására az abszorpciós sávok eltolódása következett be, ami lehetővé tette biner benzdiazepin elegyek analízisét.

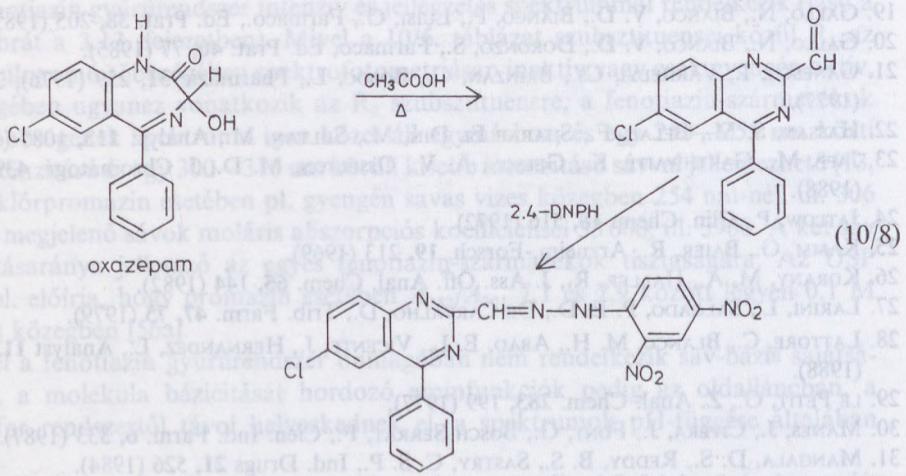
A hidrolízisen alapuló legtöbb módszer a keletkező 2-amino-benzofenon-származék diazotálásán és az ezt követő azokapcsolási reakción alapul. Kapcsoló reagensként *N*-naftil-etilén-diamint [25], *β*-naftolt [4], timolt [34], 8-hidroxi-kinolint [35] és még számos más fenolt, ill. aromás amint alkalmaztak. A módszerek érzékenysége és szelektivitása jó. Érdemes megjegyezni, hogy ezek a módszerek természetesen csak azokra a benzdiazepinekre alkalmazhatók, amelyek a savas hidrolízis során primer aromás aminná alakulnak, tehát az N_1-en szubsztituált származékokra, pl. a diazepamra nem. Ilyen esetekben viszont a meghatározást vissza lehet vezetni a másik reakciótermék, a glicin ninhidrines színreakció utáni mérésére [39].

Benzdiazepinek fotometriás meghatározására szolgáló módszerek másik fontos csoportját a vegyületek gyengén bázikus karakterén alapuló, savas festék-reagensekkel végrehajtott ionpárképzésen alapuló módszerek képezik (lásd 7.8. fejezet). MANES és munkatársai [30] számos benzdiazepin meghatározását végezte el Orange II és más festékek segítségével erősen savas közegből végzett kloroformos extrakció után. MITSUI és munkatársai [33] medazepam meghatározása során Erio Green B festéket alkalmazott, és az ionpárt 4,1-es pH-jú pufferből kloroformmal extrahálta. Ugyancsak kloroformos extrakcióval jutottak a spektrofotometrálható oldathoz Alizarin ibolya 3B festékkel pH 1,2-nél végzett ionpárképzés után MANGALA és munkatársai [31] diazepam, nitrazepam és klórdiazepoxid meghatározása során. POPOVICI és mun-

katársai [38] ugyanezen benzdiazepinek meghatározását benzolban, ill. kloroformban extrakció nélkül végrehajtott pikrinsavas ionpárképzéssel végezték el. BLAZSEK—BODÓ és munkatársai [6] pedig egy sor sav karakterű festéket (metilnarancs, tropeolin 00 és 000, eriokróm fekete stb.) alkalmaztak sikerrel különböző benzdiazepinek meghatározására.

Az ionpárképzésen alapuló módszerek érzékenysége és — a pH megfelelő megválasztása esetén szelektivitása is — jó. Lényegesen kisebb az érzékenysége a benzdiazepinek fémkomplex képző hajlamára alapozott módszereknek (a moláris abszorpciós koefficiens általában 1000 alatt marad). Ezek közül a módszerek közül említést érdemel triazolam [19] és estazolam [20] meghatározása ruténium (III)komplexe alakjában, bromazepam mérése vas (II)komplexeként [45], valamint klórdiazepoxid és diazepam meghatározása diamino-tetrarodanato-króm(III)-komplexszel való kölcsönhatásuk alapján [21].

Az egyéb módszerek közül érdekes reakciómechanizmusával kitűnik BÜYÜKTIMKIN [8, 9] módszere oxazepam és lorazepam meghatározására. Amint az a (10/8) reakcióegyenleten látható, ennek jégecettel való forralása során a többi benzdiazepin sósavas kezelésekor lejátszódó hasítással szemben gyűrűszűkülés közben kinazolin-2-karboxaldehid-származék keletkezik, ami 2,4-dinitro-fenil-hidrazinos (2,4-DNPH) kezeléssel a megfelelő hidrazonná alakítható, aminek mérése lúgos közegben 520 nm-nél igen szelektív és érzékeny meghatározást tesz lehetővé.



A kisebb jelentőségű egyéb módszerek közül megemlítjük WASSEL és DIAB [49] hidroxil-aminos hidroxámsav képzésen és ennek vas (III)komplexe alakjában való mérésen (lásd 242. oldal) alapuló módszerét, valamint LARINI és munkatársai [27] módszerét valamennyi fontosabb benzdiazepin mérésére redukált molibdo-foszforsavval való csapadékképzés és a reagens feleslegének spektrofotometriás mérése alapján. Cink/sósavas redukció után nitrazepámból keletkező aromás amin azokapcsolással mérhető [22].

Irodalom

1. Abdel-Hamid, M. E., Abuirjeie, M. A., Analyst **113,** 1443 (1988).
2. Abounassif, M. A., J. Pharm. Belg. **44,** 329 (1989).
3. Baggi, T. R., Mahajan, S. N., Rao, G. R., J. Ass. Off. Anal. Chem. **58,** 875 (1975).
4. Baumler, J., Rippstein, S., Helv. Chim. Acta **44,** 2208 (1961).
5. Bedair, M., Korany, M. A., Abdel-Hamid, M. E., Analyst **109,** 423 (1984).
6. Blazsek-Bodó, Á., Kiss, I., Józsa, J., Farmacia **33,** 15 (1985).
7. British Pharmacopoeia 1988, Her Majesty's Stationery Office, London, 1988. a. 633; b. 730, 783; c. 628, 914; d. 637; e. 642.
8. Büyüktimkin, N., Büyüktimkin, S., Sci. Pharm. **53,** 147 (1985).
9. Büyüktimkin, N., Büyüktimkin, S., Acta Pharm. Turc. **28,** 87 (1986).
10. Davidson, A. G., J. Pharm. Sci. **73,** 55 (1984).
11. Davidson, A. G., J. Pharm. Pharmacol. **41,** 63 (1989).
12. de la Guardia, M., Salvador, A., Gomez, M. J., Banzo, Z. A., Anal. Chim. Acta **224,** 123 (1989).
13. de la Guardia, M., Galdú, M. V., Monzó, J., Salvador, A., Analyst **114,** 509 (1989).
14. de Silva, J. A. F., Strojny, N., J. Pharm. Sci. **60,** 1303 (1971).
15. El-Yazbi, F. A., Abdel Hay, M. H., Korany, M. A., Pharmazie **41,** 639 (1986).
16. El-Yazbi, F. A., Korany, M. A., Bedair, M., J. Pharm. Belg. **40,** 244 (1985).
17. Fehér, Zs., Kolbe, I., Pungor, E., Analyst **116,** 483 (1991).
18. Fernández-Arciniega, M. A., Rosas, J., Hernández, L., Alonso, R. M., Boll. Chim. Farm. **124,** 19 (1985).
19. Gallo, N., Bianco, V. D., Bianco, P., Luisi, G., Farmaco., Ed. Prat. **38,** 205 (1983).
20. Gallo, N., Bianco, V. D., Doronzo, S., Farmaco, Ed. Prat. **40,** 77 (1985).
21. Ganescu, I., Várhelyi, Cs., Brinzan, G., Boboc, L., Pharmazie **31,** 259 (1976); **32,** 52 (1977).
22. Hassan, S. M., Belal, F., Sharaf El Din, M., Sultan, M., Analyst **113,** 1087 (1988).
23. Japp, M., Garthwaite, K., Geeson, A. V., Osselton, M. D., J. Chromatogr. **439,** 317 (1988).
24. Jatlow, P., Clin. Chem. **18,** 516 (1972).
25. Kamm, G., Baier, R., Arzneim.-Forsch. **19,** 213 (1969).
26. Korany, M. A., Haller, R., J. Ass. Off. Anal. Chem. **65,** 144 (1982).
27. Larini, L., Salgado, P. E. D., De Carvalho, D., Trib. Farm. **47,** 75 (1979).
28. Lattore, C., Blanco, M. H., Abad, E. L., Vicente, J., Hernandez, L., Analyst **113,** 317 (1988).
29. le Petit, G., Z. Anal. Chem. **283,** 199 (1977).
30. Manes, J., Civera, J., Font, G., Bosch Serrat, F., Cien. Ind. Farm. **6,** 333 (1987).
31. Mangala, D. S., Reddy, B. S., Sastry, C. S. P., Ind. Drugs **21,** 526 (1984).
32. Martinez, D., Gimenez, P. M., J. Anal. Toxicol. **5,** 10 (1981).
33. Mitsui, T., Matsuoka, T., Fujimura, Y., Bunseki Kagaku **34,** 72 (1985).
34. Ossman, A. R. E. N., El Hassany, A. H., Pharmazie **30,** 257 (1975).
35. Ossman, A. R. E. N., El Hassany, A. H., Pharmazie **31,** 744 (1976).
36. Pawelczyk, E., Plotkowiak, Z., Mikolajczak, P., Farm. Polska **43,** 261 (1987).
37. Peeran, M. T., Baravani, G. S., Bhalla, V. K., Ind. Drugs **23,** 52 (1985).
38. Popovici, I., Dorneanu, V., Cuciureanu, R., Stefanescu, E., Rev. Chim. **34,** 554, 653 (1983).
39. Rao, G. R., Kanjilal, G., Srivastava, C. M. R., Ind. J. Pharm. Sci. **42,** 63 (1980).
40. Richter, P., Int. J. Pharm. **72,** 207 (1991).

41. Sanghavi, N. M., Jivani, N. G., Talanta **26,** 63 (1979).
42. Schütz, H., Benzodiazepines. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1982.
43. Seitzinger, R. W. T., Pharm. Weekblad. **110,** 1073 (1975).
44. Shingbal, D. M., Agni, R. M., Ind. Drugs **20,** 162 (1983).
45. Smyth, W. F., Scannell, R., Goggin, T. K., Lucas-Hernandez, D., Anal. Chim. Acta **141,** 321 (1982).
46. The United States Pharmacopoeia XXI, U.S.P. Convention Inc., Rockville, Md., 1985, 225. old.
47. The United States Pharmacopoeia XXII, USP Convention Inc., Rockville, Md., 1990. a. 414; b. 282.
48. Volke, J., Ellaithy, M. M., Manousek, O., Talanta **25,** 209 (1978).
49. Wassel, G. M., Diab, A. M., Pharmazie **28,** 790 (1973).

10.10. Fenotiazin-származékok

10.10.1. Meghatározás saját fényelnyelés alapján

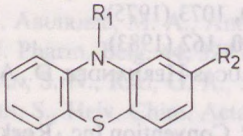
A gyógyászatban alkalmazott igen nagyszámú fenotiazin-származék közül néhány fontosabb képleteit a 10/6. táblázatban foglaltuk össze.

A fenotiazin gyűrűrendszer intenzív és jellegzetes spektrummal rendelkezik (lásd a 3/26. ábrát a 3.13. fejezetben). Mivel a 10/6. táblázat szubsztituensei közül R_1 az esetek túlnyomó többségében spektrofotometriásan inaktív vagy csak gyengén aktív, s lényegében ugyanez vonatkozik az R_2 szubsztituensre, a fenotiazin-származékok nagy többségének spektruma igen közel áll egymáshoz, és egy 250—255 nm közti nagy intenzitású és egy 300—310 nm körüli kisebb intenzitású sávval jellemezhető [13, 27]. A klórpromazin esetében pl. gyengén savas vizes közegben 254 nm-nél, ill. 306 nm-nél megjelenő sávok moláris abszorpciós koefficiensei 33 600, ill. 3900. A két sáv intenzitásaránya jellemző az egyes fenotiazin-származékok tisztaságára. Az USP XXII pl. előírja, hogy promazin esetében A_{252}/A_{301} 7,1 és 7,9 között legyen 0,1 M sósavas közegben [56a].

Mivel a fenotiazin gyűrűrendszer önmagában nem rendelkezik sav-bázis sajátságokkal, a molekula bázicitását hordozó aminfunkciók pedig az oldalláncban, a kromofor rendszertől távol helyezkednek el, a spektrumok pH-függése általában csekély.

Fenotiazin típusú gyógyszerek intenzív spektruma széles körű lehetőségeket nyújt készítményeik kvantitatív analízisére. Ennek megfelelően a gyógyszerkönyvek az esetek túlnyomó részében híg savas közegben végzett spektrofotometriás módszerrel végeztetik el fenotiazin-származékok meghatározását a legkülönbözőbb szilárd és folyékony gyógyszerkészítményekben. Általában a 254 nm körüli, nagy intenzitású sávot használják fel a kvantitatív mérésre. Így 249 és 258 nm között végzik el egyebek között promazin tabletta [6a] és injekció [6b], prometazin tabletta [6c] és injekció [6d], perfenazin tabletta [6e] és injekció [6f], klórpromazin tabletta [6g], injekció [6h], szolúció [6i] és kúp [6j] flufenazin tabletta [6k], trifluoperazin tabletta [6l], trimeprazin

10/6. táblázat. Néhány fontosabb fenotiazin-származék



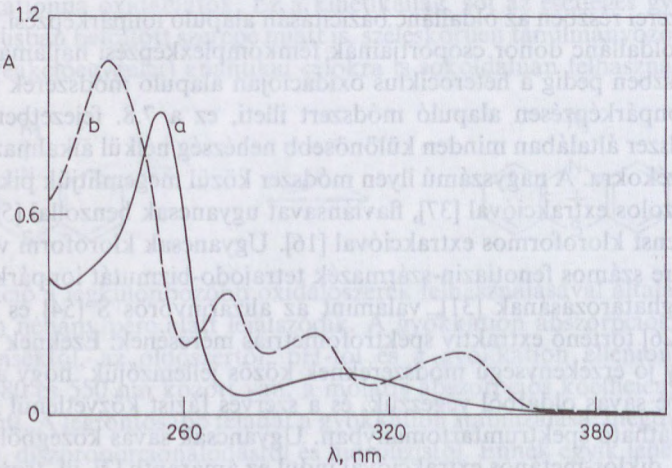
	R_1	R_2
Promazin	$-CH_2-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$	H
Klórpromazin	$-CH_2-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$	Cl
Perfenazin	$-(CH_2)_3-N$ (piperazin) $N-(CH_2)_2-OH$	Cl
Proklórperazin	$-(CH_2)_3-N$ (piperazin) $N-CH_3$	Cl
Prometazin	$-CH_2-CH(CH_3)-N(CH_3)_2$	H
Flufenazin	$-(CH_2)_3-N$ (piperazin) $N-(CH_2)_2-O-C(=O)-(CH_2)_5-CH_3$	CF_3
Trifluoperazin	$-(CH_2)_3-N$ (piperazin) $N-CH_3$	CF_3
Trimeprazin	$-CH_2-CH(CH_3)-CH_2-N(CH_3)_2$	H
Metofenazát	$-(CH_2)_3-N$ (piperazin) $N-(CH_2)_2-O-C(=O)-$ (3,4,5-trimeprazin) $-O-CH$	Cl
Tioridazin	$-CH_2-CH_2-$ (piperazin) $N-CH_3$	SCH_3
Trifluopromazin	$-CH_2-CH_2-CH_2-N(CH_3)_2$	CF_3

tabletta [6l] meghatározását. Tioridazin tabletta [6m] és szuszpenzió [56b] esetében a sáv metil-tio szubsztitúció következtében fellépő batokróm eltolódása miatt a meghatározást 264, ill. 266 nm-nél végzik. Háttérproblémák kiküszöbölése céljából a 4.3.2. fejezetben leírt háttér-korrekciós módszerek közül a legegyszerűbbet, a két hullámhosszas módszert gyakran alkalmazzák. Így klórpromazin tabletta, injekció és a kúp készítmények esetén (A_{254}—A_{277}) a hatóanyag-tartalom kiszámításának alapja [56c], trifluoperazin készítmények esetében (A_{255}—A_{278}) értéket mérik [56d], trimeprazin szirup és tabletta esetében pedig az (A_{251}—A_{276}) értéket [56e].

A hosszúhullámú, kisebb intenzitású sáv gyengébb érzékenységű, de nagyobb szelektivitású meghatározást tesz lehetővé, s ezt ki is használták pl. promazin alapanyag és injekció meghatározására 301 nm-nél [56a], prometazin szirup mérésére 298 nm-nél [56f] stb.

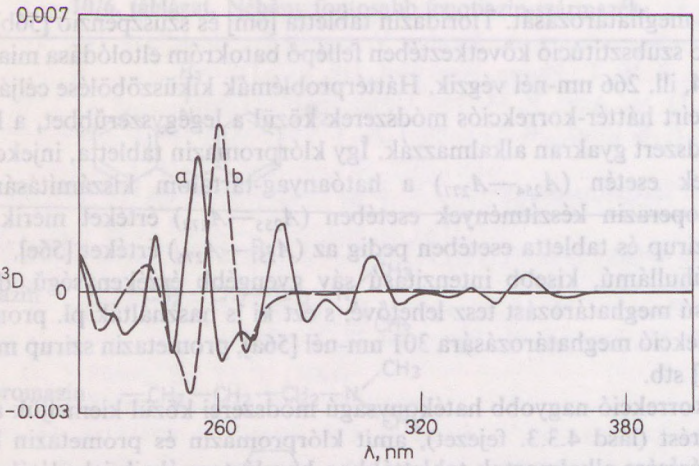
A háttérkorrekció nagyobb hatékonyságú módszerei közül kiemeljük a 6 hullámhosszas mérést (lásd 4.3.3. fejezet), amit klórpromazin és prometazin hatóanyagtartalom mérésére alkalmaztak tablettákban bomlástermékeik jelenlétében [57].

A bomlástermékek közül a szulfoxid szennyezéssel, ami az autoxidáció terméke, külön kell foglalkozni. Amint az a 10/4. ábrán klórpromazin példáján látható, jelentős különbségek vannak a tiszta gyógyszer és oxidációs termékének spektrumai között, amik azonban túlságosan átfednek ahhoz, hogy bármelyikük szelektív meghatározását minden további nélkül el lehessen végezni. Fasenmade és Fell [17] harmadik derivált spektrofotometriás méréssel megoldotta mind az oxidálatlan klórpromazin, mind pedig szulfoxidja szelektív meghatározását. Amint az a 10/5. ábrán látható, a megvizsgált számos hullámhossz-kombináció közül klórpromazin szelektív meghatározására a legalkalmasabb a 3. derivált görbe 259 nm-es pozitív és 267 nm-es negatív maximuma amplitúdójának mérése, ezen a két hullámhosszon ui. a szulfoxid



10/4. ábra. Klórpromazin (*a* görbe) és klórpromazin-szulfoxid (*b* görbe) spektrumai. Oldószer: víz.

(A. A. Fasanmade, A. F. Fell, Analyst **110,** 1117 (1985) [17])



10/5. ábra. Klórpromazin (*a* görbe) és klórpromazin-szulfoxid (*b* görbe) harmadik derivált spektrumai. Oldószer: 0,1 M sósav. Forrás: lásd 10/4. ábra

derivált görbéjéről azonos értékek olvashatók le. Hasonló meggondolások alapján a szulfoxid szennyezés meghatározásának optimális hullámhossz-párja 350 és 361 nm. A derivatív spektrofotometriás módszert számos további fenotiazin-készítmény analízisére is felhasználták [48].

10.10.2. Kémiai reakciókra alapozott módszerek

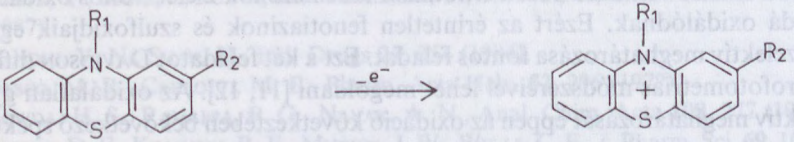
Fenotiazin-származékok kémiai reakciókra alapozott spektrofotometriás meghatározási módszerei részben az oldallánc bázicitásán alapuló ionpárképzési, ill. a heterociklus és az oldallánc donor csoportjainak fémkomplexképzési hajlamára alapozott eljárások, részben pedig a heterociklus oxidációján alapuló módszerek [5, 9].

Ami az ionpárképzésen alapuló módszert illeti, ez a 7.8. fejezetben részletesen tárgyalt módszer általában minden különösebb nehézség nélkül alkalmazható fenotiazin-származékokra. A nagyszámú ilyen módszer közül megemlítjük pikrinsav alkalmazását benzolos extrakcióval [37], flaviánsavat ugyancsak benzollal [55], brómkrezolzöld reagenst kloroformos extrakcióval [16]. Ugyancsak kloroform volt az extraháló oldószere számos fenotiazin-származék tetrajodo-bizmutát ionpárképző anionnal való meghatározásának [31], valamint az alizarinvörös S [54] és a nitrozo-R festékekkel [26] történő extraktív spektrofometriás mérésének. Ezeknek az általában közepes vagy jó érzékenységű módszereknek közös jellemzőjük, hogy az extrakciót többé-kevésbé savas oldatból végezzük, és a szerves fázist közvetlenül spektrofotometráljuk a látható spektrumtartományban. Ugyancsak savas közegből végzett kloroformos, ill. diklór-metános extrakcióval indul az amaranth [3], ill. tropeolin 000 [4] festékek alkalmazásával végrehajtott módszer, itt azonban a komplexet semleges, ill. lúgos vizes pufferral megbontják és a vizes fázisba átmenő festéket spektrofotometráljak.

A fémkomplexképződésen alapuló spektrofotometriás módszerek közül a palládium(II)ionnal képezett lila színű komplex mérésén alapuló módszerek terjedtek el a leginkább. Ezt a klasszikus módszert [33, 46], ami szelektíven méri az oxidálatlan fenotiazinokat a mai napig is széles körben használják a gyógyszerkönyvi analízisben is, pl. perfenazin injekció, szirup és tabletta [56g], flufenazin tabletta és elixír [56h], prometazin injekció [56i] és trimeprazin elixír [6n] meghatározására. A mérési hullámhossz 450—500 nm. A módszer automatizált változatát is alkalmazták számos fenotiazin-származék meghatározására [51]. Érdekesek Mori és Fujita módszerei, amelyek a fémkomplex- és ionpárképzésen alapuló eljárások kombinációjának tekinthetők. Az eozinnal és palládium(II)-kloriddal enyhén savas közegben 545 nm-nél végrehajtott mérés során pl. klórpromazin esetében tulajdonképpen a Pd(klórpromazin)$_2$ komplex kationnak eozin anionnal képezett ionpárját mérjük [18]. Ennek a megoldásnak egyik nagy előnye, hogy nincs szükség a színes termék extrakciójára, a másik pedig a nagy érzékenység ($\varepsilon = 57\,000$). Hasonló elvek alapján végezhető el klórpromazin meghatározása Pd(II)-*o*-hidroxi-hidrokinon-ftalein komplex- ionpárképzés segítségével ($\varepsilon_{525} = 22\,000$) [29]. Szelektív, de kevésbé érzékeny módszerek alapjait képezi ón(IV)-[36], germánium(IV)-[30] és réz(II)ionok [38], különböző komplexképző anionok és fenotiazinok között keletkező színes vegyes komplexek extrakciója és spektrofotometriás mérése.

A 7.9. fejezetben bevezetett töltésátviteli komplexek kialakítása is alapját képezheti fenotiazinok spektrofotometriás meghatározásának: erre a tiazingyűrű kén-, ill. nitrogénatomjának donor sajátságai jó lehetőséget nyújtanak. A felhasznált reagensek: klóranil [2], 2,3-diklór-5,6-diciano-*p*-benzokinon [1], jód [10, 25], jód-monoklorid [35], morfolin — jód [58], morfolin — *N*-bróm-szukcinimid [15].

Fenotiazin-származékok elektrondonor sajátságai átvezetnek sajátságos és igen specifikus meghatározási lehetőségük területére: a legkülönbözőbb oxidálószerek hatására egyelektronos oxidációval viszonylag stabilis, színes, jól spektrofotometrálható gyökkationná oxidálhatók. Ez a kinetikailag, sőt az esetleges gyógyszerhatásmechanizmusban betöltött szerepe miatt is, széleskörűen tanulmányozott reakció [20] (lásd 10/9 reakcióegyenlet) analitikai célokra is sokoldalúan felhasználható.



(10/9)

Az oxidáció a legkülönbözőbb oxidálószerek felhasználásával általában szobahőmérsékleten néhány perc alatt lejátszódik. A gyökkation abszorpciós maximuma a szubsztituensektől, az oldószertől, pH-tól és a gyökkation ellenionjától függően általában 480 és 550 nm között van, a moláris abszorpciós koefficiensek pedig 5 és 20 000 között. A legfontosabb feladat a gyökkation stabilizálása: megóvása a továbboxidációtól, diszproporcionálódástól és hidrolízistől. Ennek egyik lehetősége az igen magas savkoncentráció alkalmazása. Taha és munkatársai [53] pl. az *N*-brómszukcinimides oxidációt és a spektrofotometriás mérést 30—70 v/v százalékos kénsavas oldatban végezték.

Kiterjedten alkalmaznak oxidálószerként heteropolisavakat: itt a feleslegben levő reagens anionja stabilizálja a gyökkationt, ezek közül a reagensek közül arzeno-molibdénsavat [41], foszfor-molibdénsavat [21, 52], foszfor-volfrámsavat [42, 43] és vanado-bórsavat [44] említjük meg. Savas közegben spektrofotometrálható gyökkationhoz vezető további oxidálószerek: nátrium-vanadát [45], nátrium-nitrit [49], klóramin-T [24, 34], kálium-jodát [39, 40], nátrium-kobalt-nitrit [28] és vas(III)-klorid [19, 32]. Ez utóbbi reagenst kombinálták 2,2'-dipiridillel [8] és 1,10-fenantrolinnal [7], amelyek az oxidáció során keletkező vas(II)ionokkal a gyökkation abszorpciós maximumának tartományában elnyelő komplexet képeznek. Külön említést érdemel El-Kommos és Emara [14] módszere, akik oly módon értek el rendkívül magas hullámhosszal (700—740 nm) igen intenzíven elnyelő ($\varepsilon = 19\,700$—$40\,000$), igen stabilis származékot, hogy az oxidációs reakcióelegybe 3-metil-benzotiazolin-2-on-hidrazont is bevittek. Az ismertetett, kitűnő spektrális sajátságokkal rendelkező származék a két molekula oxidatív kapcsolásának metilénkék-szerű terméke. Ezt a reagenst Sastry és munkatársai [50] is alkalmazták számos fenotiazin-származék meghatározására. Oxidálószerként nátrium-hipokloritot, kálium-perszulfátot vagy vas(III)-kloridot használva még a fentinél is jobb érzékenységet értek el: $\varepsilon = 12\,000$—$130\,000$. Két molekula fenotiazin oxidatív kapcsolása (oxidálószer réz(II)-klorid) az alapja Rychlovsky és Némcová [47] módszerének ($\lambda_{max} = 635$ nm), ami a nitrogénen szubsztituálatlan fenotiazin szelektív meghatározására szolgál.

Általánosságban megállapítható, hogy a klasszikus értelemben vett töltésátviteli komplexek képződésén alapuló módszerek nem választhatók el élesen a gyökkationná való oxidáláson alapuló eljárásoktól, sőt számos esetben a gyökkation mint köztitermék további, irreverzíbilis átalakuláson megy át. A fenti reakciók mechanizmusára vonatkozó, esetenként gyakran különböző megállapítások tárgyalása meghaladná könyvünk kereteit.

Az eddig ismertetett módszerek kémiai alapját az képezte, hogy a meghatározott kísérleti körülmények között, bizonyos oxidálószerek hatására végbemenő oxidáció megáll az egy elektron elvonásával kialakuló, viszonylag stabilis gyökkation állapotnál. Más oxidálószerek hatására, levegő hatásának kitett gyógyszerkészítmények tárolása, ill. metabolizmusuk során fenotiazin-származékok 2 elektronos oxidációval szulfoxiddá oxidálódnak. Ezért az érintetlen fenotiazinok és szulfoxidjaik egymás melletti szelektív meghatározása fontos feladat. Ezt a két feladatot Davidson differencia-spektrofotometriás módszereivel lehet megoldani [11, 12]. Az oxidálatlan gyógyszer szelektív meghatározását éppen az oxidáció következtében bekövetkező spektrumeltolódásra alapozta. Amint azt a 8/9. ábrán bemutattuk, a szulfoxidok spektruma jelentősen különbözik az oxidálatlan fenotiazinétól. Ha tehát egy peroxi-ecetsavval szobahőmérsékleten kvantitatíven szulfoxiddá oxidált minta spektrumát azonos koncentrációjú kezeletlen oldattal szemben vesszük fel, igen jellegzetes differencia-spektrumhoz jutunk. Amint az a 8/10. ábrán prometazin példáján látható, 337 nm-nél kitűnő lehetőség nyílik a kvantitatív mérésre; (ez a hullámhossz más fenotiazin-származékok esetében 342 és 354 nm között van). A differencia-spektrofotometriás módszer segítségével az eleve szulfoxid formában levő fenotiazin fényelnyelése természetesen kiesik, s így a mérés valóban szelektíven a bomlatlan gyógyszert méri. Ezt a

módszert sikerrel alkalmazták szinte valamennyi fontosabb fenotiazin-származékra [22, 23] és kidolgozták annak automatizált változatát is [22].

A szulfoxid szelektív meghatározásának lehetőségét az teremti meg, hogy az sósavas közegben cinkporral kvantitatíven fenotiazinná redukálható. Ez esetben a differencia-spektrofotometriás mérés során a redukált oldattal szemben mérjük a kezeletlent: így a fenotiazin elnyelése esik ki, és a mért differencia-abszorbancia szelektíven csak a szulfoxidtartalmat méri [12].

Irodalom

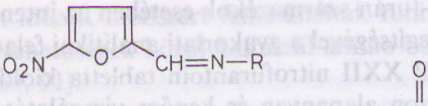
1. Abdel-Salam, M., Issa, A. S., Mahrous, M., Abdel-Hamid, M. E., Anal. Letters **18,** 1391 (1985).
2. Al-Ghabsa, T. S., Ibrahim, S. K., Al-Abachi, M. Q., Microchem. J. **28,** 501 (1983).
3. Ayad, M. M., Moussa, A. F.-A., J. Drug. Res. **15,** 95 (1984).
4. Beltagy, Y. A., Issa, A., Rida, S. M., Pharmazie **31,** 484 (1976).
5. Blazek, J., Dymes, A., Stejskal, Z., Pharmazie **31,** 681 (1976).
6. British Pharmacopoeia 1988, Her Majesty's Stationery Office, London, 1988. a. 994; b. 842; c. 995; d. 843; e. 834; f. 982; g. 918; h. 727; i. 771; j. 888; k. 948; m. 1011; n. 754.
7. Buhl, F., Chwistek, M., Chem. Anal. **29,** 581 (1984).
8. Buhl, F., Mazur, U., Chwistek, M., Chem. Anal. **21,** 121 (1976).
9. Chagonda, L. F. S., Millership, J. S., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 271 (1989).
10. Comby, F., Jambut-Absil, A.-C., Buxeraud, J., Raby, C., Chem. Pharm. Bull. **37,** 151 (1989).
11. Davidson, A. G., J. Pharm. Pharmacol. **28,** 795 (1976).
12. Davidson, A. G., J. Pharm. Pharmacol. **30,** 410 (1978).
13. De Lenheer, A., J. Ass. Off. Anal. Chem. **56,** 105 (1973).
14. El Kommos, M., Emara, K. M., Analyst **113,** 1267 (1988).
15. El-Shabouri, S. R., Youssef, A. F., Mohamed, F. A., Rageh, A. M. I., J. Ass. Off. Anal. Chem. **69,** 821 (1986).
16. Enami Khoi A.-A. M., J. Pharm. Sci. **72,** 704 (1983).
17. Fasanmade, A. A., Fell, A. F., Analyst **110,** 1117 (1985).
18. Fujita, Y., Mori, I., Fujita, K., Nakahashi, Y., Tanaka, T., Chem. Pharm. Bull. **35,** 5004 (1987).
19. Gandhi, V. N., Shah, H., Ind. Drugs **21,** 354 (1984).
20. Gasco, M. R., Carlotti, M. E., Pharm. Acta Helv. **52,** 296 (1977).
21. Gowda, H. S., Ramappa, P. G., Nayak, A. N., Anal. Chim. Acta **108,** 277 (1979).
22. Gurka, D. F., Kolinski, R. E., Myrick, J. W., Wells, C. E., J. Pharm. Sci. **69,** 1069 (1980).
23. Hackmann, E. R. M., Magalhaes, J. F., Santoro, M. I. R. M., Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paolo **22,** 22 (1986).
24. Issa, A. S., Beltagy, Y. A., Mahrous, M. S., Talanta **25,** 710 (1978).
25. Jambut-Absil, A. C., Buxeraud, J., Lagorce, J. F., Raby, C., Int. J. Pharm. **35,** 129 (1987).
26. Jayarama, M., D'Souza, V., Yathirajan, H. S., Rangaswamy, Talanta **33,** 352 (1986).
27. Krácmar, J., Blazek, J., Pharmazie **23,** 651 (1968).
28. Mahrous, M. S., Abdel-Khalek, M. M., Talanta **31,** 289 (1984).
29. Mori, I., Fujita, Y., Kitano, S., Bunseki Kagaku **32,** El (1983).
30. Myszczynska, B., Puzanowska-Tarasiewicz, H., Farm. Pol. **45,** 87 (1989).
31. Nayak, A. N., Ramappa, P. G., Yathirajan, H. S., An. Quim., Ser. C **78,** 86 (1982).

32. Pasich, J., Wojdak, H., Jurczyk, T., Farm. Pol. **34,** 359 (1978).
33. Pesez, M., Bartos, J., Colorimetric and Fluorimetric Analysis of Organic Compounds and Drugs. Marcel Dekker, New York 1974. 388 old.
34. Puzanowska-Tarasiewicz, H., Kojlo, A., Farm. Pol. **39,** 141 (1983).
35. Puzanowska-Tarasiewicz, H., Karpinska, J., Golebiewski, Z., Pharmazie **44,** 350 (1989).
36. Puzanowska-Tarasiewicz, H., Myszcynska, B., Acta Pol. Pharm. **45,** 311 (1988).
37. Puzanowska-Tarasiewicz, H., Staniszewska, E., Tarasiewicz, M., Farm. Pol. **37,** 495 (1981).
38. Puzanowska-Tarasiewicz, H., Woliniec, E., Poltorak, J., Acta Pol. Pharm. **46,** 55 (1989).
39. Ramappa, P. G., Basavaiah, K., J. Inst. Chem. **56,** 107 (1984).
40. Ramappa, P. G., Basavaiah, K., Ind. J. Pharm. Sci. **47,** 125 (1985).
41. Ramappa, P. G., Gowda, H. S., Nayak, A. N., Analyst **105,** 663 (1980).
42. Ramappa, P. G., Gowda, H. S., Nayak, A. N., Michrochem. J. **28,** 586 (1983).
43. Ramappa, P. G., Gowda, H. S., Nayak, A. N., Z. Anal. Chem. **298,** 160 (1979).
44. Ramappa, P. G., Nayak, A. N., Basavaiah, K., Ind. Drugs **21,** 448 (1984).
45. Ramappa, P., Rao, N. R. R., Ind. Drugs. **24,** 441 (1987).
46. Ryan, J. A., J. Am. Pharm. Ass. Sci. Ed. **48,** 240 (1959).
47. Rychlovsky, P., Nemcová, I., Ceskosl. Farm. **37,** 104 (1988).
48. Rychlovsky, P., Nemcová, I., Cesk. Farm. **38,** 241 (1989).
49. Sane, R. T., Kamat, S. S., Narkar, V. S., Sathe, A. Y., Mhalas, J. G., Ind. Drugs **18,** 19 (1980).
50. Sastry, C. S. P., Prasad Tipirneni, A. S. R., Suryanarayana, M. V., J. Pharm. Biomed. Anal. **8,** 287 (1990).
51. Sawada, M., Motoyama, I., Yamada, S., Kanaya, Y., Bunseki Kagaku **35,** T16 (1986).
52. Stan, M., Dorneanu, V., Ghimicescu, G., Talanta **24,** 140 (1977).
53. Taha, A. M., El-Rabbat, N. A., El-Kommos, M. E., Refat, I. H., Analyst **108,** 1500 (1983).
54. Tarasiewicz, M., Staniszewska, E., Puzanowska-Tarasiewicz, H., Chem. Anal. **25,** 591 (1980).
55. Tarasiewicz, M., Staniszewska, E., Puzanowska-Tarasiewicz, H., Farm. Pol. **37,** 427 (1980).
56. The United States Pharmacopoeia XXII, USP Convention Inc., Rockville, Md., 1990. a. 1156; b. 1365; c. 292—294; d. 1409; e. 1416; f. 1160; g. 1048—1050; h. 586—587; i. 1159.
57. Xiang, B., Xu, J., Lu, M., An., D., Nanjing Yaoxueyuan Xuebao **16,** 33 (1985).
58. Youssef, A. F., El-Shabouri, S. R., Mohamed, F. A., Rageh, A. M. I., J. Ass. Off. Anal. Chem. **69,** 513 (1986).

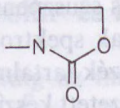
10.11. Egyéb heterociklusos származékok

10.11.1. Furánszármazékok

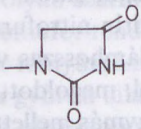
Ebben a fejezetben elsősorban az antibakteriális hatású nitro-furán-származékok spektrofotometriás meghatározási lehetőségeit tárgyaljuk, de itt kerül ismertetésre a diuretikus hatású furoszemid, valamint a H_2-receptor antagonista ranitidin spektrofotometriás analízisének áttekintése is.



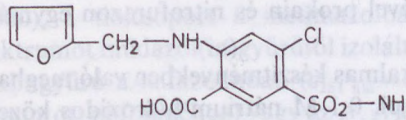
nitrofurazon



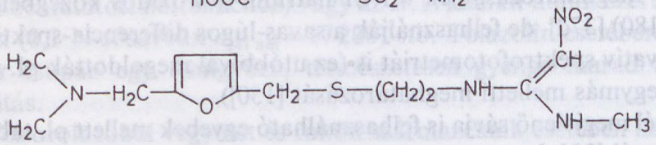
furazolidon



nitrofurantoin



furoszemid



ranitidin

Maga a furángyűrű spektrofotometriásan csak gyengén aktív (lásd 3.11. fejezet). A nitro-furán-származékok jellegzetes és intenzív sárga színe a furángyűrűhöz kapcsolódó nitro- és aldehid-hidrazon-csoportok egyidejű jelenlétének következménye. Ezeknek a származékoknak spektrumára a 263 és 370 nm körül megjelenő két sáv a jellemző, amelyek közül az utóbbi, intenzív sávot használják kvantitatív analitikai célokra. A fontosabb nitro-furán-származékok spektrumadatait a 10/7. táblázatban mutatjuk be.

Furoszemid spektrumában már alig van szerepe a furángyűrűnek: azt a tetraszubsztituált aromás gyűrű határozza meg (lásd 3/17. ábra, 95. old.), a ranitidin spektrumának kvantitatív analitikai célokra is alkalmas 314 nm-nél megjelenő sávjáért pedig a nitro- és aminocsoportokkal szubsztituált etilén rész a felelős.

10/7. táblázat. Néhány nitro-furán-származék ultraibolya-látható spektrumadatai [100]

	λ_{max}, nm	ε
2-Nitro-furán	315	18 500
Furazolidon	259	13 000
	366	17 000
Nitrofurantoin	266	14 100
	367	18 460
Nitrofurazon	261	13 510
	375	16 300

A leírtak alapján érthető, hogy a nitro-furán-származékok esetében az intenzív és igen hosszú hullámoknál megjelenő sáv segítségével a gyakorlati analitikai feladatok széles köre oldható meg. Így pl. az USP XXII nitrofurantoin tabletta kioldódási vizsgálatát 375 nm-nél [231a], nitrofurazon alapanyag és kenőcs vizsgálatát vizes közegben 375 nm-nél, a krém vizsgálatát pedig dimetil-formamidban 385 nm-nél [231a], furazolidon alapanyag, tabletta és szuszpenzió mérését pedig vizes közegben 367 nm-nél [231b] végezteti el. Ugyancsak spektrofotometriásan végezteti el a Brit Gyógyszerkönyv is a fenti három származék tartalmi meghatározását [37f], valamint nitrofurantoin tabletta mérését [37g]. Összetett készítmények esetében gyakran áll elő olyan eset, hogy a hosszúhullámú maximumon való mérést a készítmény másik komponense nem zavarja, mint pl. efedrin nitrofurantoin mérését 375 nm-nél [126]. A spektrofotometriás módszer két hullámhosszas változata más összetett készítmények vizsgálatát is lehetővé teszi; így pl. megoldották 340 és 365 nm-en való mérés segítségével nifuroxim és furazolidon egymás melletti meghatározását kúpokban [74] vagy 290 és 373 nm-es mérés segítségével prokain és nitrofurazon egymás melletti meghatározását [70].

Furoszemid intenzív spektruma is alkalmas készítményekben való meghatározására. Injekciókban való meghatározását pl. 0,1 M nátrium-hidroxidos közegben 271 nm-nél végzik ($\varepsilon = 19\,180$) [37d], de felhasználják a savas-lúgos differencia-spektrofotometriát [4] és a derivatív spektrofotometriát is (ez utóbbival megoldották pl. furoszemid és triamteren egymás melletti meghatározását [150]).

Ranitidin 314 nm-nél megjelenő sávja is felhasználható egyebek mellett pl. tabletta kioldódási vizsgálatoknál [231c].

Az eleve sárga színű nitro-furán-származékok esetében nincs különösebb jelentősége a színreakcióknak. A viszonylag leggyakrabban alkalmazott módszer azon alapul, hogy nátrium-hidroxiddal [28, 31, 58] vagy tetraetil-ammónium-hidroxiddal [165, 166] erősen meglúgosított oldatban nitro-furán-származékok narancsvörös színű termékekké rendeződnek át. A szín fenollal [58] vagy rezorcinnal [28] stabilizálható. Megemlíthetők még a hidrolízist követő dinitro-fenil-hidrazon [53] vagy izonikotinsav-hidrazon [209] képzésen, ill. hidroxilaminolízist követő vas(III)komplex képzésen [12] alapuló módszerek.

A furoszemid különböző készítményekben való meghatározására szolgáló, kémiai reakciókra alapozott spektrofotometriás módszerek közül megemlítjük ametisztibolyával alkotott ionpárjának kloroformos extrakcióját, amit 550 nm-es spektrofotometriás mérés követ [155], 3-metil-2-benztiazolinon-hidrazon és oxidálószerek együttes alkalmazásán alapuló eljárást [196], rézkomplex [131] és vaskomplex [132] képzésén alapuló módszert, a vegyület redukáló sajátságain alapuló indirekt molibdénkékes módszert [104], valamint sósav-ecetsavas fluroglucin reagens alkalmazását [43].

A ranitidin meghatározására szolgáló kolorimetriás módszerek közül legjelentősebbek az ionpár-extrakción alapuló eljárások: az erősen bázikus ranitidin savas festékekkel mint brómtimolkék [144, 173], brómfenolkék, brómkrezolzöld, brómkrezolbíbor [173], Rose Bengal [169], semleges vagy enyhén savas közegből kloroformmal [173] vagy diklór-metánnal [144, 169] jól extrahálható ionpárt képez. Mind-

három idézett módszert felhasználták ranitidin meghatározására tablettákban. Az egyéb lehetőségek közül 4-dimetil-amino-benzaldehid reagens alkalmazását említjük meg [64, 91].

10.11.2. Imidazolin- és imidazolszármazékok

Mind az imidazolin-, mind pedig az imidazolgyűrű spektrofotometriásan csak enyhén aktív (lásd 3.11. fejezet). Így a saját fényelnyelésre alapozott ultraibolya spektrofotometria nem alkalmas olyan származékok vizsgálatára, amelyek nem tartalmaznak a molekulában más kromofor rendszert (pl. cimetidin). Az, hogy az ebben az alfejezetben tárgyalt vegyületek túlnyomó része mégis megfelelő spektrofotometriás aktivitással rendelkezik, vagy a gyűrűn található kromofor, ill. auxokróm csoportoknak köszönhető, amilyen pl. a nitrocsoport a metronidazolban (0,1 N sósavban $\varepsilon_{277\,nm} = 6500$), a tiolcsoport a metimazolban (0,1 N kénsavban $\varepsilon_{251\,nm} = 17400$) vagy a spektrumot imidazol(in)gyűrűtől izolált más kromofor rendszerek adják. Ilyen pl. a naftalingyűrű a nafazolinban ($\varepsilon_{281\,nm} = 6530$; a finomszerkezet hasonló a 3/7. ábrán bemutatott naftalinéhoz) vagy az *N, N*-dialkil-anilin-szerű szerkezet az antazolinban (0,1 N sósavban $\varepsilon_{241\,nm} = 17\,200$) stb. Tolazolin esetében, ahol az izolált kromofor csupán egy fenilgyűrű, természetesen gyenge marad a spektrofotometriás aktivitás.

A felsorolt többi vegyület és rokon származékaik esetében azonban a saját fényelnyelésre alapozott spektrofotometriás mérés számos gyakorlati feladat megoldását teszi lehetővé, mint pl. nafazolin meghatározását szolúciós [231d], metronidazol meghatározását pedig tabletta készítményben [231e] metanolos, ill. 0,1 M sósavas közegben a fenti abszorpciós maximumokban.

A fenti egyszerű feladatok megoldásán túlmenően a két hullámhosszon való mérés segítségével már összetett gyógyszerkészítmények hatóanyag-tartalmainak mérése is kivitelezhető, így pl. a diloxanid furoát és metronidazol egymás melletti meghatározása 0,01 M vizes nátrium-hidroxidban 247 és 320 nm-nél [230] vagy etanolban 258 és 310 nm-nél [47], furazolidon és metronidazol [220] vizes közegben 367 és 320 nm-nél, metronidazol és dijód-hidroxi-kinolin [49] 0,02 M vizes nátrium-hidroxidban 320 és 267 nm-nél, antazolin és nafazolin [143] vizes közegben 271 és 281 nm-nél. Ez utóbbi kombináció elemzésére sikerrel alkalmazták a teljes érintett spektrumtartományban 2 nm-enként lemért abszorbanciákból a 4.3.3. fejezetben leírt algebrai módszerrel való meghatározást is [240]. Természetesen a spektrofotometriás mérés előtti kromatográfiás elválasztás szinte korlátlan lehetőségeket jelent kombinált készítmények analízisére. Megemlítjük, hogy az 5.2. fejezetben éppen egy antazolin—nafazolin készítmény példáján mutatjuk be nagy részletességgel az oszlopkromatográfia lehetőségeit ilyen feladatok megoldásában [127].

A derivatív spektrofotometria is kitűnő lehetőségeket biztosít imidazolin- és imidazolszármazékok analízisére. Megemlítjük mikonazol és ekonazol meghatározását különböző készítményekben (lásd a 4/6. táblázatot a 171. oldalon) [45], nafazolin és difenhidramin egymás melletti meghatározását metilénkék jelenlétében szemcseppben

$^2D_{273}$ és $^2D_{255}$ mérése alapján [118], nafazolin és thonzylamin egymás melletti mérését $^3D_{280}$ és $^3D_{258}$ alapján [235] és cimetidin meghatározását $^2D_{216}$ mérésével [22].

Azoknál az imidazolszármazékoknál, ahol a spektrofotometriás aktivitás hordozója maga a szubsztituált imidazolgyűrű, bő lehetősége van a szelektivitás növelésének a differencia-spektrofotometriás módszer valamely változatának segítségével. A legegyszerűbb lehetőség a pH-változtatás hatására bekövetkező spektrumeltolódás felhasználása. A 3. fejezet 32. ábráján mutattuk be metronidazol spektrumának pH-függését. Az ott bemutatotthoz hasonló hipszokróm eltolódást szenved savanyítás hatására metronidazol-benzoát spektruma is. Az 1 M sósavas oldattal szemben felvett semleges oldat differenciaspektrumának 324 nm-nél mért maximumában elvégzett mérés lehetővé tette a hatóanyag szelektív meghatározását számos spektrofotometriásan aktív segédanyagot tartalmazó szuszpenziós készítményben [88]. Metronidazol meghatározása furazolidon jelenlétében is elvégezhető, ha a 0,01 M sósavas oldattal szemben határozzuk meg 322 nm-nél a differencia-abszorbanciát [48].

Metronidazol (2-metil-1-hidroxi-etil-5-nitro-imidazol) gyártásának melléktermeke a 4-nitro-izomer. A két izomer spektruma, sőt a savas közegben észlelhető spektrumeltolódás is igen hasonló. A differencia-spektrofotometriás módszer mégis lehetővé teszi a 4-nitro-izomer szennyezés meghatározását metronidazolban. A meghatározás azon alapul, hogy a két izomer bázisállandójában fennálló 2 pK egységnyi különbség következtében 0,2 M sósavban, ahol az erősebb bázis metronidazol kvantitatíven protonálva van, a 4-nitro-izomernek csak csekély hányada van jelen protonált formában. Ha tehát a mindkét izomert protonált formában tartalmazó 2 M sósavas oldattal szemben mérjük 325 nm-nél a 0,2 M sósavas oldat differenciaabszorbanciáját, a mért értékből a 4-nitro-izomer szennyezés mennyiségét lehet kiszámítani [89].

Egy másik elvi lehetőség egyéb aromás nitrovegyületek között metronidazol differencia-spektrofotometriás meghatározására a nitrocsoport cink/sósavas redukcióján alapul. A keletkező aminszármazékok csekélyebb spektrofotometriás aktivitása miatt a redukált oldattal szemben mért redukálatlan oldat jellegzetes és intenzív differenciaspektrumot ad, ami számos gyakorlati feladat megoldását tette lehetővé [95].

Imidazol- és imidazolinszármazékok spektrofotometriás meghatározására számos színreakciót is felhasználtak. A fenti gyűrűk bázikus jellegét használják ki a savas festékekkel végrehajtott ionpár-extrakciós módszerek (lásd 7.8. fejezet). A felhasznált festékreagensek: brómkrezolzöld [46, 184, 189, 238], brómfenolkék [184, 189], brómtimolkék [76, 184], metilnarancs [184] és Rose Bengal [15], a meghatározott származékok pedig oximetazolin [15, 189], xilometazolin [15, 184], cimetidin [76], antazolin [184] és nafazolin [184]. Guven és munkatársai [92] cimetidin meghatározására kidolgozott módszerében a reagens réz(II)-acetát; a keletkező komplex extrakciója, majd dietil-ditio-karbamátos komplexképzés után végezhető el a mérés 433 nm-nél. Felhasználható (pl. oximetazolin mérésére) a Reinecke-sóval való lecsapás és a kiszűrt csapadék acetonos oldása után 525 nm-nél végrehajtott spektrofotometriás mérés is [69].

A vegyületcsalád kolorimetriás mérésének legjellegzetesebb reagensei különböző nitrit-, ill. nitrozoszármazékok, elsősorban nitroprusszid-nátrium [219], amelyet még az USP XXII is felhasznál tolazolin injekció mérésére [231f], de egyebek között felhasználták cimetidin [16] és tolazolin [214] mérésére tablettában, fentolamin és

nafazolin meghatározására szilárd és folyékony gyógyszerformákban [103], valamint metimazol meghatározására tabletta és injekciós készítményekben [108]. Felhasználásra került még pl. nátrium-nitrit antazolin mérésére [14], valamint nátrium-kobalt-nitrit oximetazolin meghatározására különböző gyógyszerkészítményekben [208].

Az azokapcsoláson alapuló klasszikus módszerek újabb alkalmazásai egy részénél a reagens diazotált aromás amin (szulfanilamid, szulfofenazol, szulfacetamid, benzokain vagy 4-amino-acetofenon) [183], fenil-hidrazin-4-szulfonsav [121], valamennyien cimetidinnek tablettából való meghatározására alkalmazott reagensek. Ennek a reakciónak megfordítottja alkalmazható metronidazolra: itt a nitrocsoport cink/sósavas redukciójával nyert aminocsoport diazotálása és 2-naftollal való kapcsolása útján lehet 480 nm-nél mérhető származékhoz jutni [83]. Olyan megoldások is ismeretesek, ahol a nitroszármazék lúgos kezelése során keletkező nitritből felszabadított salétromossav reagál pl. 4-amino-benzoesavval [79] vagy szulfanilamiddal [90], s az így keletkező diazóniumsókat kapcsolják *N*-(1-naftil)-etilén-diaminnal.

Ugyancsak a nitro-imidazol-származékok (pl. tinidazol) nitrocsoportjának cink/sósavas redukcióján alapulnak azok a módszerek, amelyekben a keletkező primer aminocsoport és különböző aromás aldehidek mint pl. vanillin [178], szalicilaldehid [112] vagy 4-dimetil-amino-benzaldehid [111] reakciója során keletkező színes Schiff-bázis a meghatározás alapja.

Töltésátviteli komplexek képzésén alapul klonidin meghatározása 2,3-diklór-5,6-diciano-1,4-benzokinon reagenssel [75], cimetidin meghatározása 2,6-diklór-fenol-indofenol reagenssel [22], valamint antazolin és nafazolin meghatározása jód, ill. klóranil reagensekkel [27]. Ez utóbbi módszer a mindkét komponenst tartalmazó kombinált készítmények elemzésére is alkalmas.

A vegyületcsalád analízisében felhasznált számos egyéb reagens közül megemlítjük 1,2-naftokinon-4-szulfonsav alkalmazását cimetidin [167] és nafazolin [223] meghatározására, 3,5-diklór-*p*-benzokinon-klórimin felhasználását cimetidin [212] és metimazol [85] meghatározására, vanillin—foszforsav reagenst [137], valamint cérium(IV)—perklórsav reagenst [141] antazolin mérésére, cimetidin meghatározását a Folin—Ciocalteu-reagenssel [129], ill. ninhidrinnel [163] a 2,6-diklór-fenol-indofenolos színreakció alkalmazását antazolin, tolazolin, xilometazolin és nafazolin meghatározására [3], végül pedig a jod-azid reakció katalízisén alapuló rendkívül érzékeny módszert metimazol meghatározására [52].

10.11.3. Piridinvázas antituberkulotikumok

Az ebbe a csoportba tartozó vegyületek saját fényelnyelésen alapuló spektrofotometriás meghatározása számos feladat megoldását teszi lehetővé. A piridinszármazékokra jellemző az, hogy protonált formában a kvantitatív mérés alapjául szolgáló sáv helyzete nem változik jelentősen a protonálatlan formában észlelthez képest, intenzitása viszont jelentősen megnő. Ezért a meghatározásokat általában 0,01 M, ill. 0,1 M sósavas oldatban végzik el, ahol az izonikotinsav-hidrazid (INH) 265 nm-nél rendelkezik maximummal ($\varepsilon = 5750$). Említést érdemel még az erősen lúgos (pH 12) közegben végbemenő erőteljes batokróm eltolódás ($\varepsilon_{300\,nm} = 4000$). A savas közegben va-

ló mérés olyan egyszerű feladatok megoldásán túlmenően, mint pl. izonikotinsav-hidrazid tabletta kioldódási vizsgálata [231g], szelektív mérést is lehetővé tesz, pl. meghatározását cikloszerinnel való kombinációs készítményben [248], de a két hullámhosszon való mérés olyan kombinációk vizsgálatát is lehetővé teszi, ahol a másik komponens magasabb hullámhossznál nyel el, mint pl. izonikotinsav-hidrazid—rifampin kombináció analízise 264 és 335 nm-nél [204].

Az említett lúgos közegben végbemenő batokróm eltolódás is lehetőséget teremt szelektív mérésre. Az eltolódás pH-függése különbözik INH és annak glükóz-hidrazonja esetében. Ezen az alapon az A_{302}/A_{240} arányból (pH 11) a két vegyület aránya kiszámítható, s így ez a módszer felhasználható a hidrazon bomlásának tanulmányozására [200].

A derivatív spektrofotometria ezen a területen is kiszélesítheti a lehetőségeket. KITAMURA és munkatársai pl. [117] INH meghatározását 2-laktozil-hidrazonja mellett vékonyréteg-kromatográfiás elválasztás, a lapról való elúció és a lapról leoldódó háttér jellegű zavaró anyagok hatásának kiküszöbölése céljából a második derivált spektrum alapján végezte el.

A kémiai reakcióra alapozott módszerek túlnyomó többsége nem a piridingyűrű, hanem a rajta elhelyezkedő csoport (INH esetében a karbonsav-hidrazid) reakcióin alapul. Az INH klasszikus meghatározási módszere a sav-hidrazid-csoport szabad $-NH_2$-csoportjának aromás aldehidekkel képzett hidrazonjainak mérése. Az alkalmazott reagensek közül megemlítjük a vanillint [9, 34], 4-nitro-benzaldehidet [203], piridoxált [203] és 4-dimetil-amino-benzaldehidet [152]. Ez utóbbi módszer egyik változatával kapcsolatban érdekes megjegyezni, hogy előzetes erélyes sósavas hidrolízise után a hidrazin mindkét aminocsoportja reagál a reagenssel. Ugyanennek a reagensnek alkalmazásával INH-ban, ill. készítményeiben levő nyomnyi szabad hidrazin meghatározására a DAVIDSON [61] által kidolgozott differencia-spektrofotometriás módszert a 281. oldalon ismertettük. INH hidrazon képzésre alapozott meghatározási módszereivel kapcsolatban említést érdemel, hogy ennek a reakciónak olyan felhasználási területe is van, ahol az INH tölti be a reagens szerepét: amint azt a 10.13.2. fejezetben részletesen ismertetjük, INH a telítetlen 3-ketoszteroidok spektrofotometriás meghatározásának legáltalánosabban használt reagense.

Ugyancsak INH hidrazidcsoportjának szabad $-NH_2$-csoportján reagálnak a különböző aktív halogént tartalmazó aromás reagensek. Ezek közül 1-fluor-2,4-dinitro-benzol [59, 201, 236] 530 nm-nél, 9-klór-akridin [222] 500 nm-nél, 2,3-diklór-1,4-naftokinon [66] és 6,7-diklór-kinolin-5,8-dion [73] pedig (ez utóbbiak lúgos közegben) 640, ill. 645 nm-nél adnak abszorpciós maximumot. A moláris abszorpciós koefficiensek (hasonlóan a fenti reagensekhez) általában 5 és 15 000 között vannak. Itt említendő meg 1,2-naftokinon-4-szulfonsavas színreakció [156] alkalmazása ($\varepsilon_{480\,nm} = = 10\,100$).

A módszerek egy másik csoportja a meghatározandó vegyületek komplexképző sajátságait aknázza ki. Ezek közül a módszerek közül megemlítjük etionamid meghatározását palládium(II)komplexe alakjában 410 nm-nél [215], ill. ozmium-tetraoxiddal való reakciója után 380 nm-nél [216]. Ezeknek a módszereknek közepes az érzékenysége csakúgy, mint a hidroxil-aminos hidroxámsav képzésre és vas(III)-hidroxámsavas komplex alakjában való mérésre alapozott etionamid-meghatározási mód-

szeré [202]. Rendkívüli érzékenységével tűnik ki viszont FUJITA és munkatársai indirekt [81] módszere INH meghatározására. Ennek a módszernek az képezi az alapját, hogy az INH ligandum kicserélődési reakció során megbontja az *o*-hidroxi-hidrokinon-ftalein—palládium(II)—cetil-piridinium-klorid komplexet, ami a 635 nm-nél mért abszorbanciának az INH koncentrációjával arányos csökkenéséhez vezet. A látszólagos moláris abszorpciós koefficiens 620 000. Itt említjük még meg nitroprusszid-nátrium alkalmazását INH meghatározására [110, 154].

Számos módszer alapját INH könnyű oxidálhatósága képezi. Az indirekt meghatározások során felhasznált legkülönbözőbb oxidálószerek közül megemlítjük pl. az ammónium-vanadátot [168, 218], vas(III)-kloridot [218], kálium-ferri-cianidot [218] tetrazólium reagenseket [119], ammónium-paramolibdenátot [106] és a vas(III)-klorid —*o*-fenantrolin reagenst [107].

10.11.4. Néhány további piridinszármazék

Klórfeniramin ultraibolya spektrumát a molekulában levő izolált piridingyűrű határozza meg; $\varepsilon_{265\,nm} = 6600$ (0,1 M kénsav). Ez a közepes intenzitású sáv is lehetővé teszi meghatározását különféle gyógyszerkészítményekben [37e, 231h]. A derivatív spektrofotometria ($^2D_{265,262}$ mérése) a háttérproblémák kiejtésével növeli a mérés szelektivitását [125]. Komputerizált diódasoros készülékkel, sokkomponensű rendszerek analízisére alkalmas program segítségével, a derivatív spektrumban fellépő különbségek alapján klórfeniramin-maleát tizenötszörös mennyiségű ψ-efedrin-hidroklorid jelenlétében való meghatározását is megoldották tabletta készítményben [99].

Ugyancsak a piridingyűrűre alapozták a gyűrű bróm-cianos felnyitását, majd a termék anilinnel való kondenzálásán keresztül sárga színű termékhez vezető meglehetősen szerény érzékenységű módszert, ami viszont lehetővé teszi a szelektív meghatározást kodein és efedrin jelenlétében [30]. Az ionpár-extrakciós módszerek a molekula dimetil-amino-csoportja segítségével végzik el a meghatározást. A felhasznált reagensek brómfenolkék [140], brómkrezolzöld [35], metilnarancs [20], cinkon [97] stb. Külön említést érdemel SAKAI módszere [175], ahol az extraháló ionpárképző reagens tetrabróm-fenolftalein-etil-észter és a termokrómia jelenségének segítségével (lásd 2.11.4. fejezet) a diklór-etános extraktum két hullámhosszon (555 és 575 nm), valamint két hőmérsékleten (25 és 50 °C) való mérése segítségével klórfeniramin és cincokain egymás melletti meghatározását lehet elvégezni.

Más aminvegyületekhez hasonlóan klórfeniramin is képez töltésátviteli komplexet jóddal kloroformos oldatban; a komplex 293 nm-nél való mérése kvantitatív meghatározásának alapját képezi [93]. A klórfeniramin meghatározására szolgáló spektrofotometriás módszerek közül mind szelektivitását, mind pedig érzékenységét ($\varepsilon_{580\,nm} = 65\,000$) tekintve kiemelkedik FUJITA és munkatársai módszere [82], ahol a meghatározás alapja a titánium(IV)-ionnal, *o*-hidroxi-hidrokinonftaleinnel és fluoriddal képezett terner komplex.

A kolinészteráz reaktivátor hatású piridin-aldoxim vegyületek (pralidoxim, obidoxim stb.) spektruma 242 és 292 nm-nél megjelenő intenzív sávjaival a piridingyűrű és

az aldoximcsoport konjugációjának eredménye. Erősen lúgos közegben az oximcsoport ionizációja következtében batokróm eltolódás következik be ($\lambda_{max} = 332$ nm). Ezek a spektrumok számos analitikai feladat megoldását teszik lehetővé [130].

Kémiai reakciókra alapozott meghatározási módszereik közül a fémkomplexképzésen alapuló módszerek a leggyakoribbak. Pralidoxim palládium(II)-vel alkotott 1 : 1 arányú komplexe pH 6,45-nél 327 nm-nél rendelkezik intenzív elnyeléssel ($\varepsilon = 10\,500$), amit tabletta [115] és injekciós [116] készítmények meghatározására is felhasználtak. Hasonlóan határozhatók meg obidoximkészítmények is [114]. Említést érdemelnek még a nikkel(II) [239] és az amin-, ill. nitrozo-pentaciano-ferrát reagensekkel képzett jellegzetes színű komplexek; az ezekre alapozott módszerek érzékenysége azonban szerény [40,41].

Nikotinsav-észter-származékok saját fényelnyelés alapján való spektrofotometriás meghatározására számos lehetőség nyílik, amelyek közül megemlítjük metilnikotinát meghatározását kenőcs készítményben dietil-ammónium-szalicilát és parabének jelenlétében vékonyréteg-kromatográfiás elválasztás és 264 nm-en végzett mérés alapján [1], valamint inozitol-nikotinát és bametán-szulfát egymás melletti meghatározását tablettából az extraktum első derivált spektruma segítségével [57]. A kémiai reakciókra alapozott módszerek közül megemlítjük a piridingyűrű brómciános felnyitásán, majd szulfanilsavas színreakción [29], az észtercsoportnak vas(III)-hidroxámsav komplexszé való átalakításán [56], ill. réz(II)komplex képződésén [122] alapuló módszereket.

A derivatív spektrofotometriának piridinszármazékokra való alkalmazásai közül megemlítjük pirbuterol-hidroklorid és butorphanol tartarát egymás melletti meghatározását [134], valamint pirenzepin-hidroklorid szelektív mérését bomlástermékei jelenlétében [241] az első derivált spektrofotometria segítségével. Ez utóbbi vegyület meghatározására tablettában sikerrel alkalmazták a savas-lúgos differencia-spektrofotometriás módszert. A 0,1 M sósavban 280 nm-nél lévő abszorpciós maximum 0,1 M nátrium-hidroxidban 295 nm-ig tolódik el; a differenciaspektrum 300 nm-nél megjelenő maximumában szelektív mérés végezhető [242].

10.11.5. Piperidin, piperazin és egyéb telített gyűrűk származékai

Spektrofotometriásan aktív csoportokat is tartalmazó piperidinszármazékok meghatározására szolgáló módszereket már a korábbi fejezetekben (elsősorban a 10.2. fejezetben) is ismertettünk, és itt került megemlítésre az ionpár-extrakció alkalmazása is piperidinszármazékok meghatározására. Az ott leírtakon túlmenően néhány módszert itt is bemutatunk loperamid, haloperidol és néhány további származék meghatározására.

A loperamid-molekulában jelenlevő két izolált fenil- és egy 4-klór-fenil-csoport kitűnő lehetőséget biztosít a derivatív ultraibolya spektrofotometriás meghatározásra. Dol és munkatársai [71] a második derivált spektrum 259 vagy 265,5 nm-en való mérése segítségével tabletta és kapszula készítmények analízisét végezte el. Ionpár-extrakción alapuló meghatározása során a 10/1. táblázatban bemutatott tropeolin 00

festéken túlmenően használnak metilnarancsot [170], brómkrezolbíbort [17] és tetrarodanato-kobaltot [210] is. Jóddal képzett töltésátviteli komplexe is alapját képezi készítményeinek analízisére alkalmas spektrofotometriás módszernek [36].

Tolperizon és haloperidol a molekulában levő aromás ketoncsoportok miatt spektrofotometriásan erősen aktív vegyületek ($\varepsilon_{257\,nm} = 15\,750$, ill. $\varepsilon_{243\,nm} = 13\,000$) (lásd a 3/13. ábrát a 89. oldalon). Ennek a sávnak a mérésén alapul az USP XXII módszere haloperidol tabletta és injekció hatóanyag-tartalmának mérésére [231i]. Mivel a konjugált ketoncsoport sávja nátrium-bór-hidrides redukcióval eltüntethető, a 8.4. fejezetben leírt differencia-spektrofotometriás módszer alkalmazható, s ez a mérés szelektivitásának jelentős növekedését eredményezi [227]. Haloperidol meghatározására alkalmazható még egyebek között az ionpár-extrakciós módszer pl. brómfenolkékkel (pH 2, extrakció kloroformmal, mérés 400 nm-nél) [120], ketoncsoportjának kondenzációja fenil-hidrazinnal; mérés 335 nm-nél [133], színreakció 1,2-naftokinon-4-szulfonsavval ($\lambda_{max} = 410$ nm) [164], ill. töltésátviteli komplex képzése klóranillal ($\lambda_{max} = 540$ nm) [206].

A további piperidinszármazékok közül meperidin meghatározása hidroxil-amin—vas(III) reagenssel [86] a molekulában levő észtercsoporton alapul. Tenalidin maleát meghatározására tropeolin 00 festékkel pH 4-nél 1,2-diklór-etánnal végzett ionpár-extrakciót alkalmaznak ($\lambda_{max} = 410$ nm) [65], míg heptakain, ill. *N*-oxidja ionpár-extrakciós meghatározása során a reagens pikrinsav [225].

A nagyobb tagszámú gyűrűs analógok közül guanetidin is kizárható brómtimolkékkel képezett ionpárja alakjában kloroformmal pH 3,6-os oldatából [109]. Ugyanennek a vegyületnek diacetil és 1-naftol reagensekkel végzett meghatározása során a guanidincsoport lép reakcióba [162]. Pentazocin meghatározására a molekula fenol része alkalmasabb egyrészt 278 nm-nél végzett közvetlen mérés alapján, másrészről fenol reagansekkel mint nitroprusszid-nátriummal [199] vagy Folin—Ciocalteu-reagenssel [207] való reakció után. Ugyancsak a fenol rész reakciója a salétromossavas kezelés hatására végbemenő és lúgos közegben 434 nm-nél mérhető nitrozo termékhez vezető reakció [51]. Ennek a módszernek a szelektivitása növelhető, ha a keletkező *o*-nitrozo-fenolt kobalt(II)- vagy réz(II)-kelátja formájában mérjük. [50].

Piperazin meghatározásának klasszikus módszere reineckát alakban való lecsapása és a kiszűrt csapadék mérése acetonos oldás után 525 nm-nél [213]. Salétromossavval *N*-nitrozo-származékká alakítható át, ami 239 nm-nél mérhető [7]. A *p*-benzokinonnal lejátszódó kondenzáció 516 nm-nél mérhető termékhez vezet [243], míg a töltésátviteli komplex képződésére alapozott módszerek [171, 172] reagensei jód, klóranil, ill. klóranilsav 264, 545, ill. 343 nm-es abszorpciós maximumokkal.

Piperazin származékainak, mint dietil-karbamazin-citrát [195], ciklizin [188] és centpropazin [234] a legáltalánosabban használt meghatározási módszere az ionpár-extrakción alapuló spektrofotometriás mérés. A reagensek egyebek között Fast Green FCF [195], Orange II [195], brómkrezolzöld [188], brómfenolkék [188, 234]. Dietil-karbamazin-citrát meghatározható töltésátviteli komplexe formájában is jóddal mint reagenssel közvetlenül [245] vagy klóranilsav reagenssel előzetes kénsavas hidrolízis után, amikor is a pozitív reakciót adó *N*-metil-piperazin képződik [172]. Ugyancsak jód, valamint 2,3-diklór-5,6-diciano-benzokinon a reagense cinnarizin meghatározásának [176].

Hexametilén-tetramin savas hidrolízissel ammóniára és formaldehidre hasítható, s így spektrofotometriás analízisük is visszavezethető ezek mérésére. Az USP XXII [231j] pl. a klasszikus kromotrópsavas módszerrel méreti a keletkező formaldehiddel (lásd 7.5. fejezet). Direkt meghatározására jóddal képezett töltésátviteli komplexe segítségével van lehetőség: 1,2-diklór-etános közegben 273 nm-nél keletkezik analitikai mérésre alkalmas, intenzív sáv ($\varepsilon = 29\,000$) [228]. Említést érdemel még az alloxán reagenssel végrehajtott reakció, aminek során 532 nm-nél mérhető murexid képződik [149].

Flucitozin (4-amino-5-fluor-2-(1H)-pirimidinon) meghatározását szintetikus prekurzora, ill. bomlásterméke, 5-fluorouracil jelenlétében derivatív spektrofotometriás módszerrel végezték el [44].

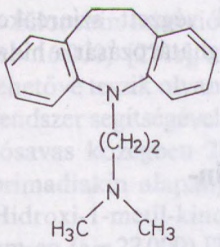
10.11.6. Triciklusos antidepresszánsok és rokon vegyületek

Az ebben a fejezetben tárgyalt vegyületek közül spektroszkópiai szempontból az imipramin difenil-amin-származéknak tekinthető (ugyanebbe a típusba tartozik még a trimipramin is). Ennek a váznak konjugációs viszonyai a karbamazepin és opipramol esetében egy, a két benzolgyűrűt összekötő —CH = CH-híddal és *N*-karbamoil-csoporttal bővülnek. Az 1,1-difenil-etilén típust az amitriptilin és nortriptilin képviselik. Oxigén, ill. kén bevitele a középső gyűrűbe pl. a doxepin, ill. a klórprotixén esetében fenol, ill. tiofenol-éter jelleget kölcsönöz a molekuláknak, ennek valamennyi spektroszkópiai következményével. Valamennyi felsorolt típushoz tartozó vegyületek erős spektrofotometriás aktivitást mutatnak az ultraibolya tartományban, nem így a maprotilin, amelynek középső gyűrűje sem heteroatomot, sem kettős kötést nem tartalmaz, s így a két izolált benzolgyűrűvel csak csekély a spektrofotometriás aktivitása. Itt jegyezzük meg, hogy az alfejezet tárgyát képező vegyületcsaládhoz mind szerkezetileg, mind hatástanilag közel álló fenotiazinokat külön fejezetben tárgyaljuk (10.10.).

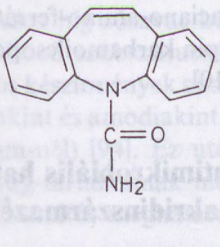
A fent említett spektrofotometriás aktivitás széles körű felhasználási lehetőségeit néhány, az USP XXII-ből és BP 1988-ból vett példával illusztráljuk. Imipramin tabletta és injekció hatóanyag-tartalmának meghatározását 250 nm-nél végzik el ($\varepsilon = 6700$) [231k], karbamazepin alapanyag [37a] és tabletta [37b] hatóanyag-tartalom meghatározását, valamint a tabletta kioldódási vizsgálatát [231l] 285 nm-nél ($\varepsilon = 11\,600$). Amitriptilin és nortriptilin tabletta kioldódási vizsgálatának [231m, 231n], valamint amitriptilin szuszpenzió hatóanyag-tartalma meghatározásának [37c] hullámhossza 239 nm ($\varepsilon = 13\,200$, ill. 12 300). Doxepin tabletta és szolúció meghatározását 292 nm-nél végzik [231o], ahol a moláris abszorpciós koefficiens 3350, míg klórprotixen tabletta és injekció vizsgálatának hullámhossza 324 nm ($\varepsilon = 2800$) [231p].

Ha a spektrofotometriás meghatározás szelektivitását a derivatív spektrofotometriás technika alkalmazásával növeljük, olyan kényes feladat is megoldható, mint pl. amitriptilin és a fentiazin vázas perfenazin egymás melletti meghatározása plazmában [78].

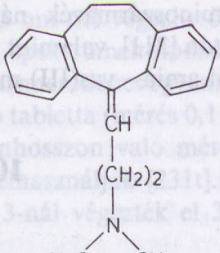
A vegyületcsalád tagjainak túlnyomó részénél (köztük valamennyi triciklusos antidepresszánsnál) az oldallánc tercier vagy szekunder aminocsoportot tartalmaz. Ez a



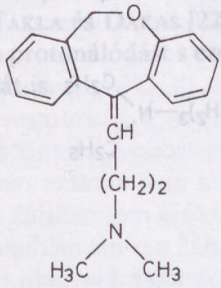
imipramin



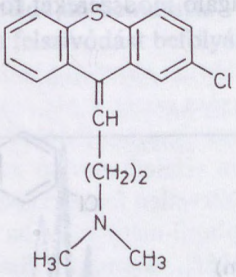
karbamazepin



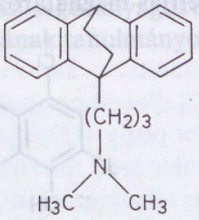
amitriptilin



doxepin



klórprotixen



maprotilin

nagy térkitöltésű apoláris gyűrűrendszerhez csatlakozó aminocsoport kiválóan alkalmassá teszi ezeket a vegyületeket ionpár-extrakciós módszerrel való meghatározásra (lásd 7.8. fejezet). Az ilyen célra más vegyületcsaládoknál is széles körben használt pikrinsavon [63,233] és savas karakterű festékeken mint brómfenolkék [146,182], brómtimolkék [80,182], brómkrezolzöld [32,182], metilnarancs [67], brómkrezolbíbor [32] kívül számos más festéket, mint pl. Chrome Azurol S [153], orange II, croceine orange, lithol red, fast red A [151] is sikerrel alkalmaztak.

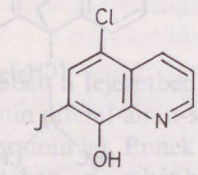
A szervetlen ionpárképző reagensek közül az imipramin meghatározására leírt jodo-bizmutátot [62], valamint az amitriptilin meghatározására javasolt kobalt-rodanidot [187] említjük meg, amelyek savas közegből való extrakció után 490, ill. 625 nm-nél adnak jól mérhető adduktot. A gyógyszer-analitikában ritkán használt tetrabromo-aurát alkalmazásával [33] az addukt abszorpciós maximuma az ultraibolya tartományba esik ugyan, az érzékenység viszont igen jó ($\varepsilon_{253\,nm} = 33\,000$), és külön érdekesség az elérhető szelektivitás: pH 4-nél savasabb oldatokból kloroformmal a származékok széles köre extrahálható, pH 5 és 6 között viszont, ciklohexánnal végezve az extrakciót csupán a szekunder aminocsoportot tartalmazó desipramin és nortriptilin.

A töltésátviteli komplexek képzésén alapuló módszerek közül (lásd 7.9. fejezet) maprotilin meghatározását írták le klóranil reagenssel [77], ill. klór-protixén mérését tetraciano-etilénnel [247]. A kisebb jelentőségű egyéb módszerek közül megemlítjük a formaldehid—kénsav reagens alkalmazását doxepin meghatározására [146], doxepin [157], ill. karbamazepin [160] meghatározását kálium-permanganátos, ill. perjódsavas oxidáció után, nitroxazepin mérését a nitrocsoport cinkes redukciója s a nyert

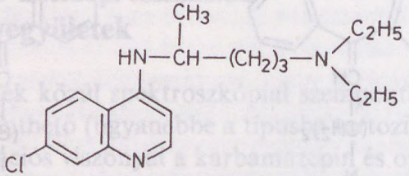
aminoszármazék nátrium-pentaciano-amino-ferrát reagenssel végzett színreakció után [211], valamint karbamazepin karbamoilcsoportjának meghatározását a hidroxil-amin—vas(III) módszerrel [10].

10.11.7. Antimikrobiális hatású kinolin- és akridinszármazékok

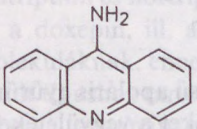
Ebben az alfejezetben 8-hidroxi-kinolin halogénszármazékai (kliokinol és rokonvegyületek), antimaláriás aminokinolin-származékok mint pl. klorokin és amodiakin, valamint amino-akridin-származékok, mint pl. aminakrin és etakridin spektrofotometriás meghatározására szolgáló módszereket foglaljuk össze.



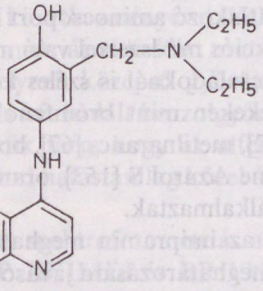
5-klór-7-jód-8-hidroxi-kinolin (kliokinol, vioform)



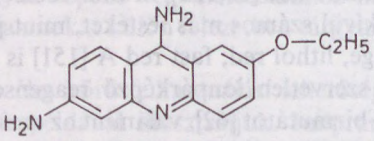
klorokin



aminakrin



amodiakin

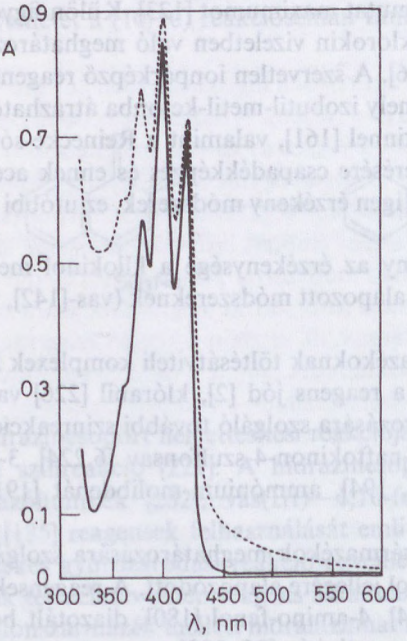


etakridin

A naftalinból levezethető spektrummal rendelkező kinolinszármazékok spektrumát a 3.13. fejezetben tárgyaltuk. A nagy intenzitású és erősen pH-függő spektrumok (lásd a 8/1. ábrát a 8.1. fejezetben) változatos analitikai feladatok megoldását teszik lehetővé. Kliokinol hintőpor hatóanyag-tartalmának meghatározását pl. 3 M sósavas közegben 267 nm-nél lehet elvégezni [231u], ahol a moláris abszorpciós koefficiens 30 400. Ez a sáv semleges közegben még nagyobb intenzitású ($\varepsilon_{255\,nm} = 40\,000$); az ezen alapuló semleges—savas differencia-spektrofotometriás módszer lehetővé teszi kliokinol meghatározását prednizolon mellett Prednizolon J kenőcsben [87] (lásd a 8/2. ábrát a 8.1. fejezetben). Más kombináció, mint pl. a dijód-hidroxi-kinolint és metronidazolt tartalmazó készítmények esetén a lúgos közegben 267 és 320 nm-nél végzett mérés és a kétismeretlenes egyenlet megoldása tette lehetővé a két komponens meghatározását [49].

Klorokin injekció meghatározása híg sósavas közegben 343 nm-nél végezhető el ($\varepsilon = 16\,000$) [231r], míg a különböző szubsztituensek okozta spektrumeltolódások lehetővé teszik olyan kombinációs készítmények analízisét is kétismeretlenes egyenletrendszer segítségével, mint primakint és amodiakint tartalmazó tabletta (mérés 0,1 M sósavas közegben 282 és 342 nm-nél) [94]. Ez utóbbi hullámhosszon való mérést primadiakin alapanyag hatóanyag-tartalmának mérésére is felhasználják [231t]. 8-Hidroxi-1-metil-kinolinium-metil-szulfát meghatározását pH 3-nál végezték el 365 nm-en ($\varepsilon = 27\,000$) [236].

Érdekes megjegyezni, hogy a vegyületcsalád spektrumainak erős pH-függése nemcsak a mérések szelektivitásának és érzékenységének optimálását, valamint a differencia-spektrofotometriás módszer alkalmazását teszik lehetővé, hanem — amint azt TAKLA és DAKAS [229] klorokin példáján bemutatta — kiszerelési segédanyagoknak a protonálódást s ezen keresztül a felszívódást befolyásoló hatásának tanulmányozását is.



10/6. ábra. Aminakrin készítmények spektrumai. Oldószer: 1 ml tömény sósav 100 ml-re hígítva 95%-os etanollal. Koncentráció: 1,6 mg/100 ml.

aminakrin ——— krém - - - - - - - - (E. A. BUNCH, J. Ass. Off. Anal. Chem. **70**, 560 (1987) [39])

A sárga színű amino-akridin-származékok spektrumában az ultraibolya sáv rendkívüli intenzitást ér el (pl. aminakrin esetében $\varepsilon_{260\,nm} = 64\,000$). Kisebb, de még így is kedvező a szelektívebb mérési lehetőségeket biztosító hosszúhullámú sáv intenzitása. Etakridin-laktát esetében pl. $\varepsilon_{360\,nm} = 15\,400$; ezen a hullámhosszon elvégezhető pl. oldatos készítményének stabilitásvizsgálata [35,98]. Hasonlóan nagy intenzitású és

finomszerkezettel is rendelkezik aminakrin hosszúhullámú sávja is, amelyet a 10/6. ábrán mutatunk be. Ennek alapján végezteti el az USP XXII acrisorcin krém aminakrin-tartalmának meghatározását kloroformos extrakció, 0,3 mólos sósavba való átrázás és 400 nm-en végzett mérés segítségével [231s]. Itt szükséges lehet a 4.3.2. fejezetben bemutatott Allen-féle háttérkorrekció alkalmazása. BUNCH [38,39] ezen az alapon oldotta meg meghatározását krémekben és kúpokban: a számítás alapjául $A_{402}—0{,}5(A_{412}—A_{389})$ szolgált.

Az ebben a fejezetben tárgyalt vegyületek közül a bázisos dietil-amino oldalláncot tartalmazó származékok meghatározása savas reagensekkel végzett ionpár-extrakciós módszerrel is elvégezhető. Dequalinium-klorid tablettában való meghatározására pl. pH 7-nél pikrinsavat használtak; az 1,2-diklór-etánnal extrahált komplex abszorpciós maximuma 342 nm-nél van [124]. Más származékok (klorokin, amodiakin, primakin) meghatározására pH 5-nél Food Green, pH 1-nél pedig Acid Orange 7 festéket használtak; a kloroformos extraktum abszorpciós maximuma 630, ill. 495 nm-nél van [192]. Brómkrezolzöld alkalmazása esetén a pH optimum 1,3-nél van, a kloroformos oldat pedig 415 nm-nél mutat maximumot [123]. Külön figyelmet érdemel MOUNT és munkatársai módszere klorokin vizeletben való meghatározására metilnarancs reagens alkalmazásával [136]. A szervetlen ionpárképző reagensek közül megemlítjük a kobalt(II)-rodanidot, amely izobutil-metil-ketonba átrázható és 625 nm-nél mérhető komplexet képez klorokinnel [161], valamint a Reinecke-sót ugyancsak klorokin és rokon vegyületeinek mérésére csapadékképzés és ennek acetonos oldása után [60]. Míg azonban az előzőek igen érzékeny módszerek, ez utóbbi két módszer érzékenysége csekély.

Hasonlóképpen szerény az érzékenysége a kliokinol meghatározására szolgáló, fémkelátok képződésére alapozott módszereknek (vas-[142], vanádium-[13], ill. urán-[174] komplexek).

Amino-kinolin-származékoknak töltésátviteli komplexek képzése segítségével történő meghatározásánál a reagens jód [2], klóranil [226] vagy klóranilsav [128]. A vegyületcsalád meghatározására szolgáló további színreakciók reagensei: 2,6-diklór--kinon-klórimin [6], 1,2-naftokinon-4-szulfonsav [6,224], 3-metil-benztiazolin-2-on--hidrazon—Ce(IV) [193, 194], ammónium-molibdenát [191], klóramin T [158] és perjódsav [179].

A 8-hidroxi-kinolin-származékok meghatározására szolgáló színreakciók túlnyomó része a molekula fenol jellegére alapozódott. A reagensek: 2,6-diklór-kinon-klórimin ($\varepsilon_{650\,nm} = 15\,300$) [24], 4-amino-fenol [180], diazotált benzokain [181], kálium--vas(III)-cianid—4-amino-antipirin [25, 102].

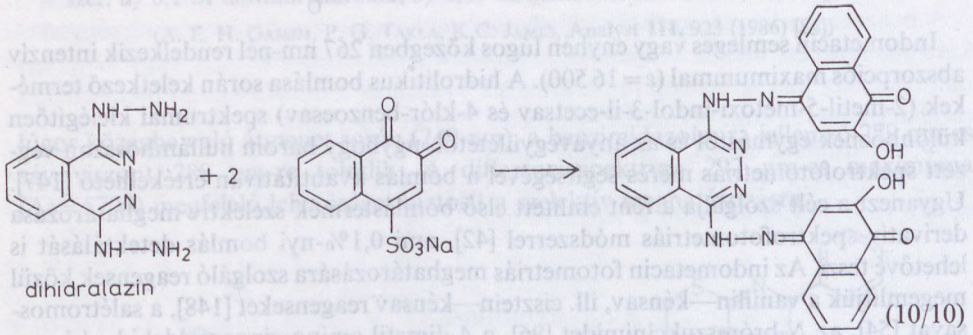
10.11.8. Egyéb kondenzált heterociklusok

Hidralazin és dihidralazin intenzív spektrumai a terápiás alkalmazásaik során gyakran használt többkomponensű készítményeik analízisét is lehetővé teszik. BEYREICH és munkatársai [21] pl. komputerizált analízis segítségével olyan kényes feladatot oldottak meg, mint dihidralazin-szulfát ($\lambda_{max} = 219$, 310 nm), hidroklorotiazid (226, 271 és 316 nm) és reszerpin (218, 267 és 294 nm) egymás melletti mérése. További

lehetőségeket jelent a derivatív spektrofotometria: BEDAIR és munkatársai [23], valamint BARARY és munkatársai [19] hidralazin, hidroklorotiaziddal, ill. propranolollal való kombinációit elemezte sikeresen az első és második derivált spektrofotometria segítségével. A szelektív meghatározást az teszi lehetővé, hogy 256 nm-nél hidralazin második derivált spektruma zéró értéket mutat, míg ez a hullámhossz igen közel esik hidroklorotiazid második derivált spektrumának maximumához. Ugyanezen elv alapján a 317 nm-es hullámhossz hidralazin szelektív meghatározását teszi lehetővé. Ugyanígy elemezve az említett másik kombinációt a hidralazin és propranolol szelektív meghatározására szolgáló hullámhosszak 265 és 284 nm.

A kémiai reakcióra alapozott módszerek közül elsőként a hidrazincsoport(ok) és aromás aldehidek között végbemenő, hidrazonokhoz vezető reakciókat említjük. Számos ilyen reagens kipróbálása után [138,237] 4-dimetil-amino-cinnamaldehid bizonyult a legmegfelelőbbnek hidralazin gyógyszerkészítményekben való meghatározására ($\varepsilon_{450\,nm}$ (kloroform) = 20 000) [138]. Ugyancsak hidrazon képzése játszódik le ninhidrin reagenssel elvégzett meghatározás során [72].

Az 1,2,-naftokinon-4-szulfonsavval végbemenő és 455 nm-nél mérhető termékhez vezető reakció [177] egyenletét a (10/10) reakciósémán tüntettük fel.

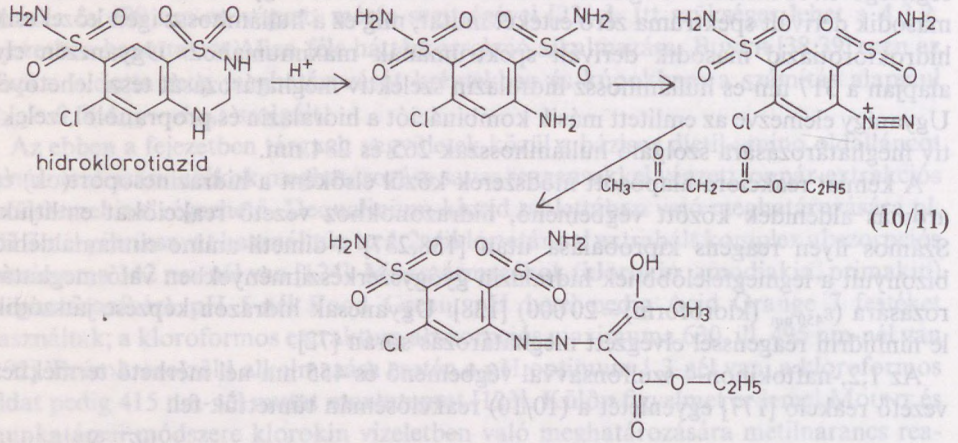


(10/10)

Hasonlóképpen a hidrazincsoport helyettesítési reakcióján alapul a 9-klór-akridin reagenssel végrehajtott színreakció [221]. A hidrazincsoport oxidációján alapuló módszerek közül tetrazóliumkék [232], vas(III)—1,10-fenantrolin, paramolibdát [105] és salétromossav [135] reagensek felhasználását említjük meg; (ez utóbbi reagenssel végbemenő érdekes gyűrűzáródási reakció egyenletét a 234. oldalon közöltük). Végül megemlítjük tetraciano-etilén reagens alkalmazását [101], amely számos más hidrazin- és pirazolonszármazék mellett hidralazinnal is analitikai meghatározását lehetővé tevő színes töltésátviteli komplexet képez.

Hidralazin és dihidralazin spektrofotometriás meghatározási lehetőségeinek felvázolása során már említés esett a kombinációs készítményekben mellettük előforduló hidroklorotiazid meghatározásáról [21, 23]. A második derivált spektrumok segítségével hidroklorotiazid meghatározása amilorid mellett is elvégezhető [145]. A benzotiadiazin típusú diuretikumok meghatározására szolgáló kolorimetriás módszerek közül a legjellegzetesebb a savas hidrolízis után keletkező anilinszármazék diazotálásán és a keletkező diazóniumsó megfelelő kapcsoló reaganssel való reakcióján alapul. A klasszikus kapcsoló reagensek mellett erre a célra acetecetésztert is használtak [26];

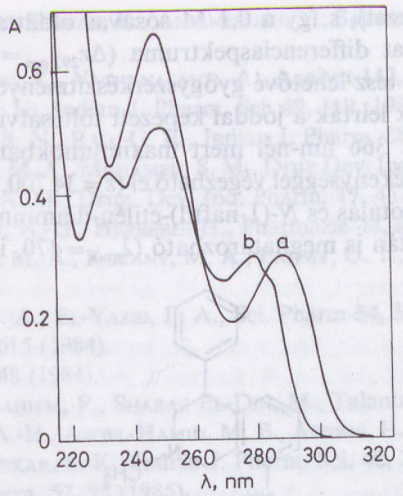
a reakciósémát hidroklorotiazid esetében a (10/11) egyenlet ábrázolja. Megemlítjük még kálium-[hexaciano-ferrát] alkalmazását is, ami 725 nm-nél mérhető termékhez vezet [11].



Indometacin semleges vagy enyhén lúgos közegben 267 nm-nél rendelkezik intenzív abszorpciós maximummal ($\varepsilon = 16\,500$). A hidrolitikus bomlása során keletkező termékek (2-metil-5-metoxi-indol-3-il-ecetsav és 4-klór-benzoesav) spektrumai kielégítően különböznek egymástól és az anyavegyületétől, úgyhogy három hullámhosszon végzett spektrofotometriás mérés segítségével a bomlás kvantitatívan értékelhető [147]. Ugyanezt a célt szolgálja a fent említett első bomlástermék szelektív meghatározása derivatív spektrofotometriás módszerrel [42], ami 0,1%-nyi bomlás detektálását is lehetővé teszi. Az indometacin fotometriás meghatározására szolgáló reagensek közül megemlítjük a vanillin—kénsav, ill. cisztein—kénsav reagenseket [148], a salétromossavat [54], az *N*-brómszukcinimidet [96], a 4-dimetil-amino-cinnamaldehid—kénsav [198], ill. 4-dimetil-amino-benzaldehid— 4-toluol-szulfonsav [18] reagenseket, klóramin-T —3-amino-fenol [197] és rezorcin— nátrium-hipoklorit [197] reagens kombinációkat.

A benzimidazol-származékok közül mebendazol meghatározása tabletta készítményben kényelmesen elvégezhető 0,01 M perklórsavas oldatban 288 nm-nél végzett spektrofotometriás meghatározással ($\varepsilon_{288\,nm} = 16\,700$) [246]. 4-Fluor-származéka (flubendazol) esetében a rövidebb hullámú, de nagyobb intenzitású sávot ($\varepsilon_{237\,nm} = 27\,700$) javasolták a készítmények analízisére [90]. Mebendazol kémiai reakcióra alapozott spektrofotometriás meghatározási lehetőségei közül a kálium-tetrajodo-bizmutát reagenssel keletkező csapadék kiszűrése, acetonban való oldása és 430 nm-nél való mérése [113] a klasszikus alkaloidreakció új alkalmazásának tekinthető, míg a vas(III)-hidroxámsavas módszer (mérés 520 nm-nél) [159] alkalmazása esetén a karbamát típusú oldallánc reagál.

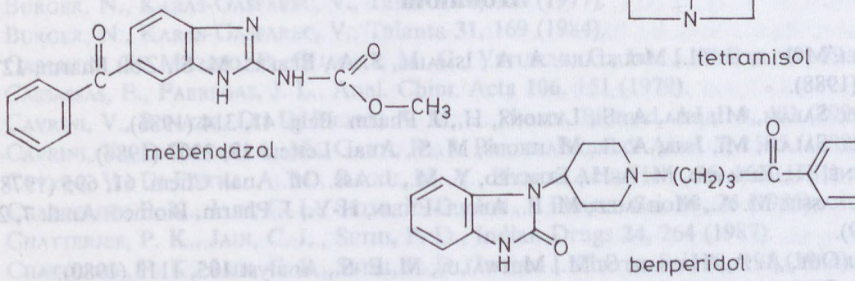
Az ugyancsak benzimidazol-származék benperidol szelektív meghatározására gyógyszerkészítményekben Gassim és munkatársai [84] differencia-spektrofotometriás módszert írtak le. Amint az a 10/7. ábrán látható, a két izolált kromofor rendszerrel rendelkező molekula fluoro-acetofenon részének spektruma nem változik a savasból

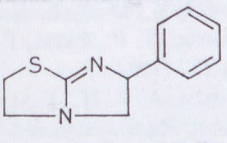


10/7. ábra. Benperidol spektrumai a differencia-spektrofotometriás meghatározáshoz. Oldószer: *a)* 0,1 M nátrium-hidroxid; *b)* 0,05 M kénsav. Koncentráció: 1,5 mg/100 ml.

(A. E. H. Gassim, P. G. Takla, K.C. James, Analyst **111**, 923 (1986) [84])

lúgos közegbe való átmenet során (249 nm), a benzimidazolonra jellemző 279 nm-es sáv viszont 288 nm-re tolódik. A differenciaspektrum 292 nm-es maximuma ($\Delta\varepsilon = 5700$) megfelelő lehetőséget biztosít a szelektív meghatározásra.

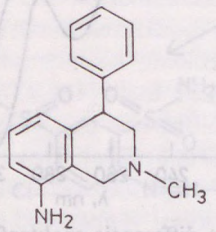




Tetramisol (és levamisol) meghatározására az enyhén savas közegből ionpárképző reagensekkel, mint brómfenolkék [139,185], brómtimolkék, brómkrezolbíbor, brómkrezolzöld és Solochrom-kék és fekete [185] végzett reakció utáni kloroformos extrakció, valamint egyebek között a nitroprusszid-nátriumos színreakció [186,205] ad lehetőséget.

Nomifensin maleát spektrofotometriás meghatározására a legegyszerűbb lehetőséget Wahbi és munkatársai [244] differencia-spektrofotometriás módszere jelenti. Az anilin-típusú spektrum 290 nm körül megjelenő sávja ui. erős savanyítás hatására

eltűnik (lásd 3.17.3. fejezet), s így a 0,1 M sósavas oldattal szemben felvett 0,1 M nátrium-hidroxidos oldat differenciaspektruma ($\Delta\varepsilon_{292\,nm} = 1120$) megfelelően érzékeny és szelektív mérést tesz lehetővé gyógyszerkészítményekben való meghatározására. Ugyanezen szerzők leírták a jóddal képezett töltésátviteli komplexre alapozott módszert is. A 293, ill. 366 nm-nél mért maximumokban a meghatározás a ΔA módszernél nagyobb érzékenységgel végezhető el ($\varepsilon = 34\,700$, ill. 22 900). Mint aromás amin természetesen diazotálás és *N*-(1-naftil)-etilén-diaminnal vagy *p*-amino-szalicilsavval való kapcsolás után is meghatározható ($\lambda_{max} = 470$, ill. 435 nm) [5].



nomifensin

A benzofurán-típusú, antiarritmiás hatású amiodaron meghatározását gyógyszerkészítményekben derivatív spektrofotometriás módszerrel ($^1D_{250,232}$ vagy $^1D_{254,243}$) oldották meg [68], a benzopirán-származék khellin és 3-dimetil-amino-metil-khellin meghatározását pedig perklórsav-jégecetes kezelés után 410, ill. 430 nm-nél [8]. Az utóbbi származék ionpár-extrakciós módszerrel is meghatározható (metilnarancs, pH 5, kloroform, 420 nm) [8]. A derivatív spektrofotometriás módszer methaqualon vérből való meghatározását is lehetővé teszi [217].

Irodalom

1. Abdel Moety, E. M., Moustafa, A. A., Ismaiel, S. A., Bebers, M. S., Zbl. Pharm, **127,** 583 (1988).
2. Abdel Salam, M., Issa, A. S., Lymona, H., J. Pharm. Belg. **41,** 314 (1986).
3. Abdel Salam, M., Issa, A. S., Mahrous, M. S., Anal. Letters **19,** 2207 (1986).
4. Abdine, H., Elsayed, M. A-H., Elsayed, Y. M., J. Ass. Off. Anal. Chem. **61,** 695 (1978).
5. Abounassif, M. A., Mohamed, M. E., Aboul-Enein, H-Y., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 23 (1989).
6. Abou Ouf, A. A., Hassan, S. M., Metwally, M. E.-S., Analyst **105,** 1113 (1980).
7. Abou Ouf, A. M., Walash, M. I., Rizk, M. S., Ibrahim, F. A., J. Ass. Off. Anal. Chem. **62,** 1138 (1979).
8. Abu-Shady, H., Girgis, E. H., J. Pharm. Sci. **67,** 618 (1978).
9. Adil, A. S., Sarwar, M., J. Chem. Soc. Pak. **9,** 313 (1987).
10. Agrawal, Y. K., Giridhar, R., Menon, S., Indian J. Pharm. Sci. **51,** 75 (1989).
11. Agrawal, Y. K., Giridhar, R., Menon, S. K., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 759 (1989).
12. Agrawal, Y. K., Patel, D. R., Anal. Letters **19,** 1289 (1986).
13. Agrawal, Y. K., Patel, D. R., Indian J. Pharm. Sci. **47,** 207 (1985).
14. Amer, M. M., Tawakkol, M. S., Analyst **99,** 487 (1974).

15. Anjaneyulu, Y., Chandra Sekhar, K., Anjaneyulu, V., Sarma, R. N., Indian Drugs **22,** 655 (1985).
16. Aromdee, C., Raksrivong, K., Vathanasanti, A., Analyst **112,** 1523 (1987).
17. Arora, S. P., Pandey, P. N., Indian J. Pharm. Sci. **49,** 119 (1987).
18. Baggi, T. R., Mahajan, S. N., Rao, G. R., Indian J. Pharm. **38,** 101 (1976).
19. Barary, M. H., Elsayed, M. A., Mohamed, S. M., Drug Dev. Ind. Pharm. **16,** 1639 (1990).
20. Barary, M. H., Wahbi, A. M., Drug. Dev. Ind. Pharm. **17,** 457 (1991).
21. Beyrich, Th., Feldmeier, H.-G., Herberg, H., Pharmazie **44,** 36 (1989).
22. Bedair, M. M., Elsayed, M. A., Korany, M. A., Fahmy, O. T., J. Pharm. Biomed. Anal. **9,** 291 (1991).
23. Bedair, M., Korany, M. A., El-Yazbi, F. A., Sci. Pharm **54,** 31 (1986).
24. Belal, F., Analyst **109,** 615 (1984).
25. Belal, F., Talanta **31,** 648 (1984).
26. Belal, F., Rizk, M., Ibrahiem, F., Sharaf El-Din, M., Talanta **33,** 170 (1986).
27. Belal, S., Elsayed, M. A.-H., Abdel-Hamid, M. E., Abdine, H., Analyst **105,** 774 (1980).
28. Bhatkar, R. G., Chodankar, S. K., Indian J. Pharm. Sci. **42,** 23 (1980).
29. Bhuee, G. S., J. Inst. Chem. **57,** 95 (1985).
30. Biswas, A., Analyst **105,** 353 (1980).
31. Biswas, A., Ghost, S., Indian J. Pharm. Sci. **42,** 60 (1980).
32. Blazsek-Bodó, A., Józsa, J., Kis, I., Farmacia **30,** 193 (1982).
33. Bosch Serrat, F., Lagarda, M. J., Barberá, R., Sanmartin, J., Cienc. Ind. Farm. **7,** 144 (1988).
34. Boxenbaum, H. G., Riegelman, S., J. Pharm Sci. **63,** 1191 (1974).
35. Brüggmann, J., Risse, G., Krankenhauspharm. **10,** 364 (1989).
36. Bruno, L. Suresh, K. John, Indian J. Pharm. Sci. **51,** 14 (1989).
37. British Pharmacopoeia 1988, Her Majesty's Stationery Office, London, 1988. a. 95; b. 912; c. 718; d. 794; e. 770, 917; f. 263, 392; g. 976.
38. Bunch, E. A., J. Ass. Off. Anal. Chem. **66,** 140 (1983).
39. Bunch, E. A., J. Ass. Off. Anal. Chem. **70,** 560 (1987).
40. Burger, N., Karas-Gasparec, V., Talanta **24,** 704 (1977).
41. Burger, N., Karas-Gasparec, V., Talanta **31,** 169 (1984).
42. Carlucci, G., Mazzeo, P., Quaglia, M. G., Vetuschi, C., Int. J. Pharm. **49,** 79 (1989).
43. Cassassas, E., Fabregas, J. L., Anal. Chim. Acta **106,** 151 (1979).
44. Cavrini, V., Bonazzi, D., Di Pietra, A. M., J. Pharm. Biomed. Anal. **9,** 401 (1991).
45. Cavrini, V., Di Pietra, A. M., Gatti, R., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 1535 (1989).
46. Cavrini, V., Di Pietra, A. M., Raggi, M. A., Pharm. Acta Helv. **56,** 163 (1981).
47. Chatterjee, P. K., Jain, C. L., Sethi, P. D., Ind. J. Pharm. Sci. **48,** 25 (1986).
48. Chatterjee, P. K., Jain, C. L., Sethi, P. D., Indian Drugs **24,** 264 (1987).
49. Chatterjee, P. K., Jain, C. L., Sethi, P. D., Indian J. Pharm. Sci. **48,** 195 (1986).
50. Chatterjee, P. K., Jain, C. L., Sethi, P. D., Indian J. Pharm. Sci. **49,** 34 (1987).
51. Chatterjee, P. K., Sethi, P. D., Indian Drugs **22,** 391 (1985).
52. Ciesielski, W., Acta Pol. Pharm. **44,** 202 (1987).
53. Chowdary, K. P. R., Murty, K. V. R., Sriramamurthy, A., Indian Drugs **22,** 482 (1985).
54. Chowdary, K. P. R., Rao, G. N., Rao, V. B., Indian Drugs **24,** 361 (1987).
55. Chowdary, K. P. R., Sundari, P. V., Indian Drugs **23,** 577 (1986).
56. Corti, P., Boll. Chim. Farm. **120,** 484 (1981).
57. Corti, P., Sciarra, G., Boll. Chim. Farm. **120,** 657 (1981).
58. Cross, A. H. J., Hendey, R. A., Stevens, S. G. E., Analyst **85,** 355 (1960).
59. Csiba, A., Acta Pharm. Hung. **59,** 205 (1989).

60. Dalal, R. R., Bulbule, M. V., Wadodkar, S. G., Kasture, A. V., Indian Drugs **19,** 361 (1982).
61. Davidson, A. G., Analyst **107,** 422 (1982).
62. Dembinski, B., Acta Pol. Pharm. **34,** 509 (1977).
63. Dembinski, B., Farm. Pol. **39,** 21 (1983).
64. Desai, D. K., Kurani, S. P., Seshadrinathan, A. G., East. Pharm. **31,** 189 (1988).
65. Dessouky, Y. M., Mousa, B. A., Nour El-Din, H. M., Pharmazie **29,** 579 (1974).
66. Devani, M. B., Shishoo, C. J., Patel, M. A., Bhalara, D. D., J. Pharm. Sci. **67,** 661 (1978).
67. Devriendt, A., Weemaes, I., Jansen, F. H., Arzneim. Forsch. **23,** 863 (1973).
68. Di Pietra, A. M., Cavrini, V., Gatti, R., Raggi, M. A., Pharm. Res. **5,** 709 (1988).
69. Dixit, R. K., Misra, S. K., Awasthi, B. B., Indian Drugs **22,** 31 (1984).
70. Dmitrenko, T. S., Suranova, A. V., Luttseva, A I., Chichiro, V. E., Tereschchenkova, I. A., Istranov, L. P., Aboyants, R. K., Farmatsiya **36,** 41 (1986).
71. Dol., I., Knochen, M. Altesor, C., Boll. Chim. Farm. **128,** 18 (1989).
72. Dutt, M. C., Ng, T.-L., Long, L.-T., J. Ass. Off. Anal. Chem. **66,** 1455 (1983).
73. El-Kommos, M. E., Yanni, A. S., Analyst **113,** 1091 (1988).
74. Elsayed, L., Hassan, S. M., Kelani, K. M., El-Fatatry, H. M., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **63,** 992 (1980).
75. El Yazbi, F. A., Bedair, M., Korany, M. A., Analyst **111,** 477 (1986).
76. Emmanuel, J., Naik, P. N., Indian Drugs **20,** 33 (1982).
77. Ersoy, L., Alpertunga, B., Analyst **113,** 1745 (1988).
78. Fernández, P., Bermejo, A. M., Lopez-Rivadulla, M., Anal. Letters **21,** 1045 (1988).
79. Fink, D. W., Fox, A., Anal. Chim. Acta **106,** 389 (1979).
80. French, W. N., Matsui, F., Truelova, L. F., Can. J. Pharm. Sci. **3,** 33 (1968).
81. Fujita, Y., Mori, I., Kitano, S., Bunseki Kagaku **32,** E199 (1983).
82. Fujita, Y., Mori, I., Kitano, S., Bunseki Kagaku **32,** 327 (1983).
83. Gandhi, T. P., Patel, P. R., Patel, V. C., Patel, S. K., Gilbert, R. N., J. Inst. Chem. **56,** 127 (1984).
84. Gassim, A. E. H., Takla, P. G., James, K. C., Analyst **111,** 923 (1986).
85. Gatti, R., Cavrini, V., Balboni, B., Roveri, P., Farmaco, Ed. Prat. **40,** 71 (1985).
86. Giridhar, R., Menon, S., Agrawal, Y. K., Indian J. Pharm. Sci. **49,** 32 (1987).
87. Görög, S., Farm. Tidende **80,** 321 (1970).
88. Görög, S., Fütő, M., Laukó, A., Acta Pharm. Hung. **46,** 113 (1976).
89. Görög, S., Csizér, É., Proc. III. Anal. Chem. Conf., Budapest, 1970, Vol. 2. Akadémiai Kiadó, Budapest 65. old.
90. Gratteri, P., Pinzauti, S., La Porta, E., Mura, P., Papeschi, G., Farmaco **45,** 707 (1990).
91. Guvener, B., Acta Pharm. Turc. **28,** 35 (1986).
92. Guven, K. C., Guvener, B., Sunam, G., Ozdemir, O., Eczacilik Bul. **24,** 30 (1982).
93. Hady, M. A., Salam, M. A., Acta Pharm. Jugosl. **28,** 27 (1978).
94. Hassan, S. M., Metwally, M. E. S., Ouf. A. M. A., J. Ass. Off. Anal. Chem. **66,** 1433 (1983).
95. Hassan, S. M., Sharef El Din, M., Belal, F., Sultan, M., J. Pharm. Pharmacol. **40,** 798 (1988).
96. Hassib, S. T., Safwat, H. M., El-Bagry, R. I., Analyst **111,** 45 (1986).
97. Hattori, T., Washio, Y., Inoue, M., Bunseki Kagaku **27,** 707 (1978).
98. Hecker-Niediek, A., Krankenhauspharm. **9,** 497 (1988).
99. Hoover, J. M., Soltero, R. A., Bansal, P. C., J. Pharm. Sci. **76,** 242 (1987).
100. Horváth, G., Milch, Gy., Pharm. Zentralh. **104,** 647 (1965).

101. Ibrahim, F. A., Rizk, M. S., Belal, F., Analyst **111,** 1285 (1986).
102. Ismaiel, S. A., Sharaby, N. A., Soliman, R. F., Abdel-Moety, E. M., Zentralbl. Pharm. **122,** 815 (1983).
103. Ismaiel, S. A., Tawakkol, M. S., Pharmazie **29,** 544 (1974).
104. Issopoulos, P. B., Z. Anal. Chem. **334,** 554 (1989).
105. Issopoulos, P. B., Int. J. Pharm. **61,** 261 (1990).
106. Issopoulos, P. B., Pharm. Acta Helv. **64,** 280 (1989).
107. Issopoulos, P. B., Economou, P. T., Internat. J. Pharm. **57,** 235 (1989).
108. Jaksevac-Miksa, M., Hankonyi, V., Karas-Gasparec, V., Acta Pharm. Jugosl. **29,** 91 (1979).
109. Kadyrova, R. D., Ikramov, L. T., Tegisbaev, E. T., Farmatsiya **37,** 44 (1988).
110. Kalashnikov, V. P., Mynka, A. F., Farm. Zh. 45 (1987).
111. Kamalapurkar, O. S., Chudasama, J. J., East. Pharm. **26,** 207 (1983).
112. Kamalapurkar, O. S., Menezes, C., Indian Drugs **22,** 164 (1984).
113. Kar, A., Analyst **110,** 1031 (1985).
114. Karljikovic-Rajic, K., Stankovic, B., Binenfeld, Z., J. Pharm. Biomed. Anal. **5,** 141 (1987).
115. Karljikovic-Rajic, K., Stankovic, B., Granov, A., Binenfeld, Z., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 773 (1988).
116. Karljikovic-Rajic, K., Stankovic, B., Granov, A., Pharmazie **44,** 497 (1989).
117. Kitamura, K., Hatta, M., Fukuyama, S., Hozumi, K., Anal. Chim. Acta **201,** 357 (1987).
118. Korany, M. A., Bedair, M. M., El Gindy, A., Drug. Dev. Ind. Pharm. **16,** 1555 (1990).
119. Kovatscheva, E., Vasileva-Aleksandrova, P., Ivanova, V., Microchim. Acta 483 (1983).
120. Kramarenko, V. P., Turkevich, O. D., Farm. Zh. 67 (1981).
121. Krishnan, M. V. S., Rao, A. S., Indian Drugs **23,** 469 (1986).
122. Krzek, J., Chem. Anal. **24,** 643 (1979).
123. Kulkanjanatorn, P., Shaipanich, C., Varasarn Paesachasarthara **5,** 107 (1978).
124. Leung, C. P., Kwan, S. Y., Analyst **104,** 143 (1979).
125. Leung, C. P., Law, C.-K., Analyst **114,** 241 (1989).
126. Li, X., Yaoxue Tongbao **19,** 26 (1984).
127. Lopez Silva, F., Bocic Vildosola, R., Vallejos Ramos, C., Alvarez Lueje, A., An. Real Acad. Farm. **56,** 19 (1990).
128. Mahrous, M. S., Abdel Salam, M., Issa, A. S., Abdel-Hamid, M., Talanta **33,** 185 (1986).
129. Mazza, P., Gianelli, P., Rosai, A., Pecori Vettori, L., G. Med. Mil. **130,** 121 (1980).
130. May, J., Zvirblis, P., Kondritzer, A., J. Pharm. Sci. **54,** 1508 (1965).
131. Mishra, P., Katrolia, D., Agrawal, R. K., Curr. Sci. **58,** 503 (1989).
132. Mishra, P., Katrolia, D., Agrawal, R. K., Ind. J. Pharm. Sci. **52,** 155 (1991).
133. Misztal, G., Farm. Pol. **44,** 206 (1988).
134. Mohamed, M. E., Anal. Lett. **19,** 1323 (1986).
135. Mopper, B., J. Ass. Off. Anal. Chem. **70,** 42 (1987); **71,** 1121 (1988).
136. Mount, D. L., Patchen, L. C., Williams, S. B., Churchill, F. C., Bull. World Health Org. **65,** 615 (1987).
137. Moussa, A.-F. A., Pharmazie **32,** 801 (1977).
138. Nakashima, K., Shimada, K., Akiyama, S., Chem. Pharm. Bull. **33,** 1515 (1985).
139. Nechaeva, L. Y., Galatenko, N. A., Bufius, N. N., Farmatsiya **38,** 24 (1989).
140. Nino, N., Kapitanova, D., Farmatsiya (Sofia) **24,** 1 (1974).
141. Omar, N. M., J. Pharm. Sci. **67,** 1610 (1978).
142. Ossman, A. R. E.-N., Sci. Pharm. **40,** 193 (1981).
143. Othman, S. O., Drug. Dev. Ind. Pharm. **13,** 1257 (1987).

144. Ozsoy, Y., Guvenar, B., Acta Pharm. Turc. **29,** 13 (1987).
145. Parissi-Poulou, M., Reizopoulou, V., Koupparis, M., Macheras, P., Internat. J. Pharm. **51,** 169 (1989).
146. Patel, R. B., Gandhi, T. P., Patel, V. C., Gilbert, R. N., Indian Drugs **20,** 194 (1983).
147. Pawelczyk, E., Knitter, B., Farm. Pol. **32,** 357 (1976).
148. Peterkova, M., Kakac, B., Matousova, O., Cesk. Farm. **29,** 73 (1980).
149. Petrenko, V. V., Ukr. Khim. Zh. **46,** 1225 (1980).
150. Piippo, H., Acta Farm. Fenn. **96,** 129 (1987).
151. Pitarch, B., Manes, J., Bosch Serrat, F., An. Real Acad. Farm. **52,** 279 (1986).
152. Poole, N. F., Meyer, A. E., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **98,** 375 (1958).
153. Popelkova-Mala, Z., Malat, M., Cesk. Farm. **34,** 422 (1985).
154. Prakash, A., Murthy, A. K., Pathak, V. N., Shukla, I. C., Acta Chim. Hung. **112,** 21 (1983).
155. Prasad, T. N. V., Sastry, B. S., Venkata Rao, E., Sastry, C. S. P., Pharmazie **42,** 135 (1987).
156. Pratt, E. L., Anal. Chem. **25,** 814 (1953).
157. Przyborowski, L., Misztal, G., Farm. Pol. **43,** 404 (1987).
158. Ramana Rao, G., Pulla Rao, Y., Raju, I. R. K., Analyst **107,** 776 (1982).
159. Rana, N. G., Dave, R. V., Patel, M. R., Indian Drugs **18,** 333 (1981).
160. Rao, G. R., Murty, S. S. N., East. Pharm. **25,** 111 (1982).
161. Rao, G. R., Pullarao, Y., Raju, I. R. K., Indian Drugs **19,** 162 (1982).
162. Rao, G. R., Raghuveer, S., Indian J. Pharm. Sci. **42,** 141 (1980).
163. Rao, G. R., Raghuveer, S., Indian Drugs **18,** 408 (1981).
164. Rao, G. R., Raghuveer, S., Indian Drugs **19,** 408 (1982).
165. Rao, G. R., Raghuveer, S., Murty, S. S. N., Bajrangrao, B., Indian Drugs **17,** 50 (1979).
166. Rao, G. R., Raghuveer, S., Murty, S. S. N., Bajrangrao, B., Indian J. Pharm. Sci. **39,** 83 (1977).
167. Rao, G. R., Raghuveer, S., Rao, Y. P., J. Inst. Chem. **54,** 146 (1982).
168. Rao, P. V. K., Rao, G. B. B., Murti, P. S., Microchim. Acta 979 (1974).
169. Raut, K. N., Sabnis, S. D., Indian J. Pharm. Sci. **49,** 65 (1987).
170. Rivaya, M., Batlle, R., Cien. Ind. Farm. **3,** 178 (1984).
171. Rizk, M. S., Walash, M. I., Ibrahim, F. A., Analyst **106,** 1163 (1981).
172. Rizk, M., Walash, M. I., Ibrahim, F., Spectrosc. Letters **17,** 423 (1984).
173. Sadana, G. S., Sane, R. T., Ozarkar, S. G., Sapre, D. S., Nayak, V. G., Indian Drugs **23,** 573 (1986).
174. Saha, U., Sen, A. K., Das, T. S., Analyst **113,** 1653 (1988).
175. Sakai, T., Analyst **107,** 640 (1982).
176. Saleh, G. A., Askal, H. F., Pharmazie **45,** 220 (1990).
177. Salman, A., Sci. Pharm. **55,** 255 (1987).
178. Sanghavi, N. M., Joshi, N. G., Saoji, D. G., Indian J. Pharm. Sci. **41,** 226 (1979).
179. Sanghi, S. K., Verma, A., Verma, K. K., Analyst **115,** 333 (1990).
180. Sane, R. T., Ambardekar, A. B., Shastry, V. K., Indian Drugs **18,** 290 (1981).
181. Sane, R. T., Malkar, V. B., Nayak, V. G., Indian Drugs **19,** 487 (1982).
182. Sane, R. T., Malkar, V. B., Nayak, V. G., Sapre, D. S., Banawalikar, V. J., Indian Drugs **22,** 16 (1984).
183. Sane, R. T., Nadkarni, A. D., Joshi, S. K., Indian Drugs **20,** 333 (1983).
184. Sane, R. T., Sane, S., Indian Drugs **16,** 239 (1979).
185. Sane, R. T., Sapre, D. S., Nayak, V. G., Talanta **32,** 148 (1985).
186. Sane, R. T., Sawant, S. V., Jashi, V. J., Mhalas, J. G., Indian Drugs **20,** 460 (1983).

187. Sane, R. T., Shinde, B. R., Parikh, A. K., Tikekar, S. P., Indian Drugs **21,** 257 (1984).
188. Sane, R. T., Vaidya, U. M., Indian J. Pharm. Sci. **41,** 73 (1979).
189. Sane, R. T., Vaidya, U. M., Sane, S., Curr. Sci. **47,** 853 (1978).
190. Sanyal, A. K., J. Ass. Off. Anal. Chem. **71,** 849 (1988).
191. Sastry, B. S., Rao, E. V., Sastry, C. S. P., Indian J. Pharm. Sci. **48,** 71 (1986).
192. Sastry, B. S., Rao, E. V., Tummuru, M. K., Sastry, C. S. P., Indian Drugs **24,** 105 (1986).
193. Sastry, B. S., Rao, E. V., Tumuru, M. K., Sastry, C. S. P., Indian Pharm. Sci. **48,** 109 (1986).
194. Sastry, C. S. P., Aruna, M., Pharmazie **43,** 361 (1988).
195. Sastry, C. S. P., Aruna, M., Reddy, N., Sankar, D. G., Indian J. Pharm. Sci. **50,** 140 (1988).
196. Sastry, C. S. P., Prasad, T. N., Sastry, B. S., Rao, E. V., Analyst **113,** 255 (1988).
197. Sastry, C. S. P., Mangala, D. S., Rao, K. E., Analyst **111,** 323 (1986).
198. Sastry, C. S. P., Mangala, D. S., Rao, K. E., Acta Cienc. Indica Ser. Chem. **12c,** 17 (1986).
199. Sastry, C. S. P., Rao, A. R. M., Indian J. Pharm Sci. **49,** 95 (1987).
200. Savitskaya, A. V., Pashchenko, L. A., Dobrotvorsky, A. E., Farmatsiya **38,** 39 (1989).
201. Scott, P. G. W., J. Pharm. Pharmacol. **4,** 681 (1952).
202. Shah, A. K., Agrawal, Y. K., Banerjee, S. K., Anal. Letters **14,** 1449 (1981).
203. Shah, P. R., Raje, R. R., J. Pharm. Sci. **66,** 291 (1977).
204. Sharma, S. C., Das, S., Talwar, S. K., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **70,** 679 (1987).
205. Shingbal, D. M., Joshi, S. V., Indian Drugs **21,** 396 (1984).
206. Shingbal, D. M., Joshi, S. V., Indian Drugs **22,** 326 (1985).
207. Shingbal, D. M., Naik, R. R., Indian J. Pharm. Sci. **23,** 124 (1985).
208. Shingbal, D. M., Naik, S. D., East. Pharm. **26,** 201 (1983).
209. Shingbal, D. M., Natekar, G. B., East. Pharm. **23,** 117 (1980).
210. Shingbal, D. M., Rao, V. R., Indian Drugs **23,** 472 (1986).
211. Shingbal, D. M., Rao, V. R., Indian Drugs **23,** 638 (1986).
212. Shingbal, D. M., Sawant, K. V., Indian Drugs **20,** 104 (1982).
213. Shirsat, P. D., Indian J. Pharm. Sci. **37,** 101 (1975).
214. Siegel, K., Vogel, E., Pharm. Prax. **41,** 116 (1986).
215. Sikorska-Tomicka, H., Z. Anal. Chem. **132,** 353 (1982).
216. Sikorska-Tomicka, H., Microchim. Acta 151 (1985).
217. Singh, V., Shukla, S. K., Mahanwal, J. S., Ram, J., Pharmazie **44,** 229 (1989).
218. Siraj, P., Krishna, R. R., Murty, S. S. N., Reddy, B. S., Sastry, C. S. P., Talanta **28,** 477 (1981).
219. Slack, S. C., Mader, W. J., J. Amer. Pharm. Assoc., Sci. Ed. **46,** 742 (1957).
220. Srinath, V., Bagavant, G., Ind. Drugs **24,** 173 (1986).
221. Stewart, J. T., Chang, Y.-C., J. Ass. Off. Anal. Chem. **62,** 1107 (1979).
222. Stewart, J. T., Settle, D. A., J. Pharm. Sci. **64,** 1403 (1975).
223. Strelets, L. M., Filipeva, S. O., Petrenko, V. V., Buryak, V. P., Farm. Zh. 64 (1986).
224. Strelets, L. M., Filipeva, S. O., Petrenko, V. V., Buryak, V. P., Farm. Zh. 65 (1987).
225. Subert, J., Cizmarik, J., Zentralbl. Pharm. **123,** 397 (1984).
226. Sulaiman, S. T., Amin, D., Int. J. Environ. Anal. Chem. **20,** 313 (1985).
227. Szepesi, G., Görög, S., Szakolczay, I., Chem. Anal. **16,** 211 (1971).
228. Taha, A. M., El-Rabbat, N. A., Abdel Fattah, F., Analyst **105,** 568 (1980).
229. Takla, P. G., Dakas, C. L., Int. J., Pharm. **43,** 225 (1988).
230. Talwar, S. K., Sharma, S. C., Das, S., J. Pharm. Biomed. Anal. **4,** 511 (1986).

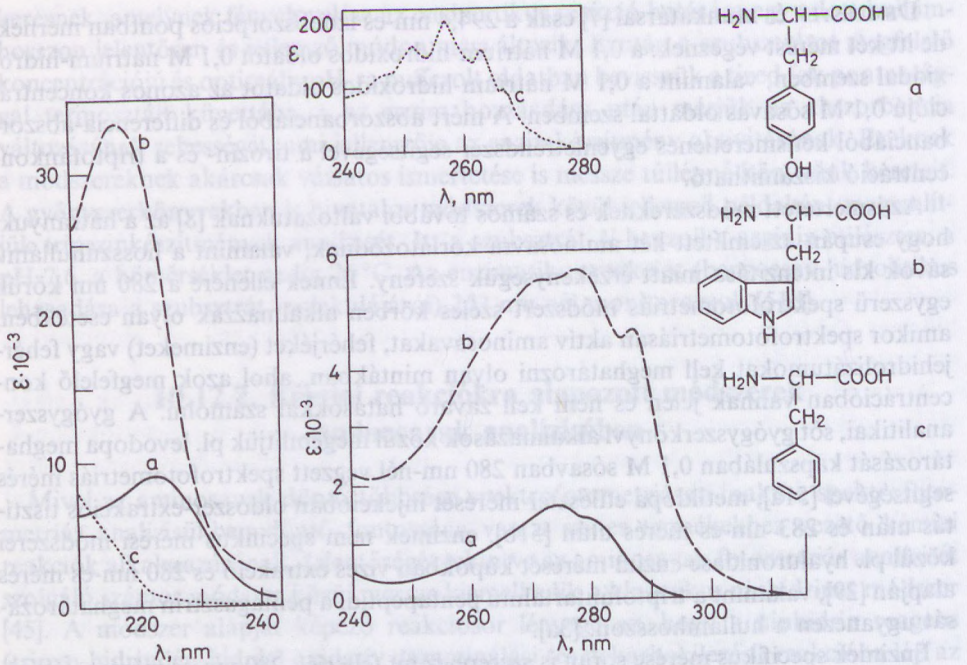
231. The United States Pharmacopoeia XXII, USP Convention Inc., Rockville, Md., 1990. a. 950; b. 596; c. 1210; d. 917; e. 892; f. 1385; g. 729; h. 290; i. 628; j. 847; k. 686; l. 223; m. 74; n. 966; o. 476; p. 296; r. 286; s. 29; t. 79; u. 326.
232. Urbányi, T., O'Connel, A., Anal. Chem. **44,** 565 (1972).
233. Vachek, J., Cesk. Farm. **36,** 168 (1987).
234. Varma, V., Tewari, N., Sircar, K. P., Rao, K. M., Ghatak, S., Indian J. Pharm. Sci. **48,** 78 (1986).
235. Vetuschi, C., Ragno, G., Farmaco **45,** 771 (1990).
236. Vicente, J., Hernandez, P., Hernandez, L., An. Real Acad. Farm. **51,** 301 (1985).
237. Zak, S. B., Bartlett, M. F., Wagner, W. E., Gilleran, T. G., Lukas, G., J. Pharm. Sci. **63,** 225 (1972).
238. Zivanov-Stakic, D., Panic, Lj., Agbaba, G., Farmaco **45,** 381 (1990).
239. Zommer-Urbanska, S., Lesz, K., Acta Pol. Pharm. **37,** 225 (1980).
240. Wahbi, A. M., Abdine, H., Korany, M. A., El-Yazbi, F. A., J. Pharm. Sci. **67,** 140 (1978).
241. Wahbi, A. M., Abounassif, M. A., El-Obeid, H. A., Al-Juliani, A. M., Arch. Pharm. Chem., Sci. Ed. **14,** 69 (1986).
242. Wahbi, A. M., Abounassif, M. A., Al-Obeid, H. A., Gad-Kariem, E.-R. A., Farmaco, Ed. Prat. **40,** 334 (1985).
243. Wahbi, A.-A. M., Abounassif, M. A., Gad-Kariem. E.-R. A., Talanta **33,** 179 (1986).
244. Wahbi, A.-A. M., Abounassif, M. A., Gad-Kariem. E.-R. A., Aboul-Enein, H. Y., Talanta **34,** 287 (1987).
245. Wahbi, A. M., El-Obeid, H. A., Gad-Kariem, E.-R. A., Farmaco, Ed. Prat. **41,** 210 (1986).
246. Wahbi, A.-A. M., Onsy, S., Talanta **25,** 716 (1978).
247. Walash, M. I., Rizk, M., El-Brasy, A., Pharm. Weekbl., Sci. Ed. **8,** 234 (1986).
248. Woodside, J. M., Piper, I., Leary, J. B., J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed. **46,** 729 (1957).

10.12. Aminosavak és származékaik, peptidek és fehérjék

10.12.1. Meghatározás saját fényelnyelés alapján

Ebben a fejezetben a fehérjealkotó α-aminosavakkal, azok egyszerű származékaival (pl. dopa, metildopa, captopril, EDTA stb.), peptidekkel és azok származékaival (enalapril stb.) foglalkozunk, valamint röviden érintjük fehérjék igen kiterjedt spektrofotometriás analízisének néhány, gyógyszer-analitikai szempontból jelentős vonatkozását. Peptid egységeket tartalmazó alkaloidok, antibiotikumok tárgyalását a megfelelő fejezetekben végezzük el.

A fehérjealkotó aminosavak közül csupán a fenil-alanin, valamint a fenolgyűrűt tartalmazó tirozin és az indol egységet tartalmazó triptofán rendelkezik spektrofotometriás meghatározásukat lehetővé tevő spektrummal. Amint az a 10/8. ábrán látható, a két utóbbi jelenlétében a csupán izolált fenilcsoportot tartalmazó fenil-alanin meghatározása nem végezhető el. Hasonlóképpen nehézségek merülnek fel a nagyobb intenzitású, de erősen átfedő spektrummal rendelkező tirozin és triptofán egymás



10/8. ábra. Tirozin (*a* görbe), triptofán (*b* görbe) és fenil-alanin (*c* görbe) spektrumai. Oldószer: 0,01 M sósav

melletti meghatározásánál is. A probléma annak segítségével oldható meg, hogy lúgos közegben csak a fenolos hidroxilt tartalmazó tirozin spektruma mutat számottevő batokróm és hiperkróm eltolódást ($\varepsilon_{293} = 2480$; 0,01 M nátrium-hidroxidban). (A tirozinhoz hasonló spektrális sajátságokkal rendelkeznek származékai: dopa, metildopa stb. is.)

Tirozin spektrumának lúgos eltolódása két lehetőséget is nyújt triptofánnal képezett elegyeik kvantitatív elemzésére. Goodwin és Morton klasszikus módszerében [16] 0,1 M nátrium-hidroxidos közegben két hullámhosszon mérünk: 280 nm-nél (a triptofán spektrumának maximumában), valamint 294,4 nm-nél, a két spektrum izoabszorpciós pontján. Ez utóbbi értékből 2465-ös molekuláris abszorpciós koefficiens segítségével tirozin és triptofán moláris koncentrációinak összegét, míg a két hullámhosszhoz tartozó két abszorbancia, valamint a három moláris abszorpciós koefficiens segítségével a tirozin/triptofán mólarányt határozhatjuk meg. Bár az ismertetett mérési elv szigorúan véve csak a két aminosav elegyére érvényes (spektrofotometriásan inaktív aminosavak jelenlétében is), a gyakorlatban azonban széles körben alkalmazzák kisebb peptidek hatóanyag-tartalmának, valamint tirozin/triptofán arányának meghatározására, sőt hasonló mérések elvégzésére fehérjékben is. Ez utóbbi esetben a két spektrumnak a fehérjeláncban bekövetkező bizonyos mértékű torzulása miatt az így nyert adatok csak korlátozott értékűek.

Demeester és munkatársai [7] csak a 294,4 nm-es izoabszorpciós pontban mérnek, de itt két mérést végeznek: a 0,1 M nátrium-hidroxidos oldatot 0,1 M nátrium-hidroxiddal szemben, valamint a 0,1 M nátrium-hidroxidos oldatot az azonos koncentrációjú 0,1 M sósavas oldattal szemben. A mért abszorbanciából és differencia-abszorbanciából kétismeretlenes egyenletrendszer segítségével a tirozin- és a triptofánkoncentráció kiszámítható.

Az ismertetett módszereknek és számos további változatuknak [8] az a hátrányuk, hogy csupán az említett két aminosavra korlátozódnak, valamint a hosszúhullámú sávok kis intenzitása miatt érzékenységük szerény. Ennek ellenére a 280 nm körüli egyszerű spektrofotometriás módszert széles körben alkalmazzák olyan esetekben, amikor spektrofotometriásan aktív aminosavakat, fehérjéket (enzimeket) vagy fehérjehidrolizátumokat kell meghatározni olyan mintákban, ahol azok megfelelő koncentrációban vannak jelen és nem kell zavaró hatásokkal számolni. A gyógyszeranalitikai, sőt gyógyszerkönyvi alkalmazások közül megemlítjük pl. levodopa meghatározását kapszulában 0,1 M sósavban 280 nm-nél végzett spektrofotometriás mérés segítségével [51a], metildopa etilészter mérését injekcióban oldószer-extrakciós tisztítás után és 283 nm-es mérés után [51b], enzimek nem specifikus mérési módszerei közül pl. hyaluronidase enzim mérését kúpokban vizes extrakció és 280 nm-es mérés alapján [29], valamint a triptofántartalmú pentapeptid, a pentagasztrin meghatározását ugyanezen a hullámhosszon. [3a].

Enzimek specifikus mérése során is szerephez jut fehérjék 280 nm-es mérése. Így pl. pankreatin enzim proteáz aktivitását készítményeiben is úgy határozzák meg, hogy kazeinoldatot 40 °C hőmérsékleten 60 percig emésztik az enzimmel. Az emésztetlen fehérje triklór-ecetsavas kicsapása után a felülúszó 280 nm-nél mért abszorbanciája arányos lesz az elbontott fehérje koncentrációjával, vagyis az enzim aktivitásával [51c].

Rövidebb hullámhossznál (210 nm körül), ahol az aromás aminosavaknak nagyobb intenzitású sávjuk van, valamint jelentős intenzitással részt vesz a fényelnyelésben a peptidkötésben levő -NH-CO-csoport is, jobb érzékenység érhető el. Ezt fel is használják fehérjék gyors mérésére biológiai mintákban. Demchenko monográfiája számos ilyen módszert ismertet [8]. Az így nyert eredmények értéke azonban a rövidhullámú mérések általános problémái, valamint számos anyag (elsősorban nukleinsavak) zavaró hatása miatt korlátozott. Meg kell azonban jegyezni, hogy amennyire korlátozott a jelentősége fehérjék és peptidek analitikájában a direkt rövidhullámú mérésnek, annyira nagy a fontossága aminosavak és származékaik, peptidek és fehérjék nagynyomású folyadék-kromatográfiás analízisében a 210 nm tájékán végzett ultraibolya spektrofotometriás detektálásnak.

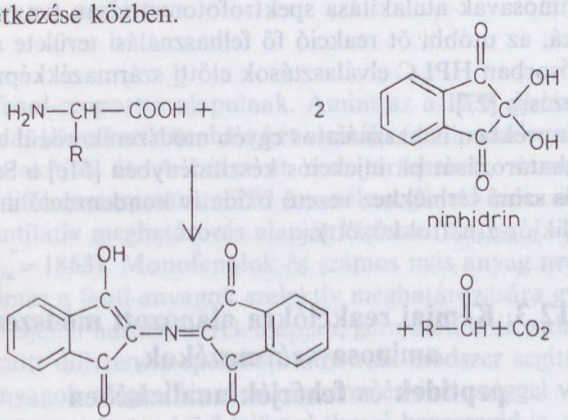
További kitűnő lehetőséget jelent aromás aminosavak (ez esetben az eddig tárgyalt kettőn kívül fenil-alanin is) egymás melletti mérésére, háttérproblémák kiejtésére a derivatív spektrofotometria (lásd 4.5. fejezet), amit sikerrel alkalmaztak fehérjék [12] és enzimek [11] vizsgálatára, de leírták a második derivált spektrumok segítségével arginin és az antibiotikum aztreonam egymás melletti meghatározását is [34].

Ami az enzimkészítmények hatóértékének meghatározását illeti, megállapíthatjuk, hogy a spektrofotometria a legáltalánosabban alkalmazott módszer az ilyen típusú feladatok megoldására. Az általános munkamenet a következő: olyan szubsztrátot

keresnek, amelynek fényelnyelése az enzimatikus reakció hatására egy adott hullámhosszon jelentősen és jellemző módon megváltozik. Ezután a szubsztrátot megfelelő koncentrációjú és optimális pH-ra pufferolt oldatban bevisszük a tized fok pontossággal termosztált küvettába, s az enzim hozzáadása után mérjük az abszorbancia változásának sebességét, ami jellemzője az enzimkészítmény aktivitásának. Ezeknek a módszereknek akárcsak vázlatos ismertetése is messze túllépné könyvünk kereteit. A gyógyszerkönyvekben is hivatalos módszerek közül jellemző példaként megemlítjük tripszinkészítmények analízisét. Itt a szubsztrát *N*-benzoil-L-arginin-etilészter, a pH 7,6, a hőmérséklet pedig 25 °C. Az enzimatikus reakciót (benzoesav hidrolitikus lehasadása a szubsztrát molekulájáról) 253 nm-nél monitorozzuk [51d].

10.12.2. Kémiai reakciókra alapozott módszerek aminosavak analízisében

Mivel az aminosavak döntő többsége spektrofotometriásan inaktív, spektrofotometriás analízisükben döntő fontossága van a színes termékekhez vezető kémiai reakciók alkalmazásának. Jelentőségét tekintve az aminosavak fotometriás analízisét szolgáló számos módszer közül messze kiemelkedik a klasszikus ninhidrines módszer [45]. A módszer alapját képező reakciósor lényege az, hogy a ninhidrin reagens (trioxo-hidrindén-hidrát) oxidatív dezaminálási (és dekarboxilezési) reakcióba lép az α-aminosavakkal. A reakció során felszabaduló ammónia kondenzációs reakcióba lép 1—1 molekula redukált és redukálatlan ninhidrinnel, színes reakciótermék (Ruhemann-bíbor) keletkezése közben.



A (10/12) reakciót általában szerves oldószer (izopropanol, butanol, celloszolv stb.) és víz pH 5 körüli értékre pufferolt elegyében rövid melegítéssel hajtják végre. A mérési hullámhossz a mérési körülményektől függően általában 550—580 nm. Ez alól kivételt képeznek a α-iminosavak (prolin, hidroxiprolin), amelyek más reakciómechanizmus szerint 440 nm-nél elnyelő terméket adnak. A módszer érzékenysége kielégítő: a módszer különböző változatainak során keletkező reakciótermékek moláris abszorpciós koefficiensei 5000 körüli értékek, és ezek az értékek többé-kevésbé azonosak a különböző aminosavaknál. A módszer szelektivitásának megítélésénél figyelembe

kell venni, hogy az adott körülmények között színes termékek keletkezése közben reagálnak aminok, szabad aminocsoportot tartalmazó peptidek, sőt a szabad ammónia is.

A módszer mechanizmusára, optimalizálására és számtalan gyakorlati alkalmazására vonatkozó korai irodalom összefoglalását illetően KAKAC és VEJDELEK monográfiájára utalunk [24a]. A ninhidrines reakció a mai napig is a legfontosabb reakció aminosavak spektrofotometriás analízisében, detektálásuk és denzitometriás mérésük (pl. [10]) fontos módszere a vékonyréteg-kromatográfiás analízisben. A módszer könnyű automatizálhatósága lehetővé teszi az egyes aminosavak oszlopkromatográfiás elválasztás utáni mennyiségi mérését peptid- és fehérjehidrolizátumokban: a ninhidrines módszer képezi az alapját a mennyiségi értékelésnek az automatikus aminosavanalizátorokban.

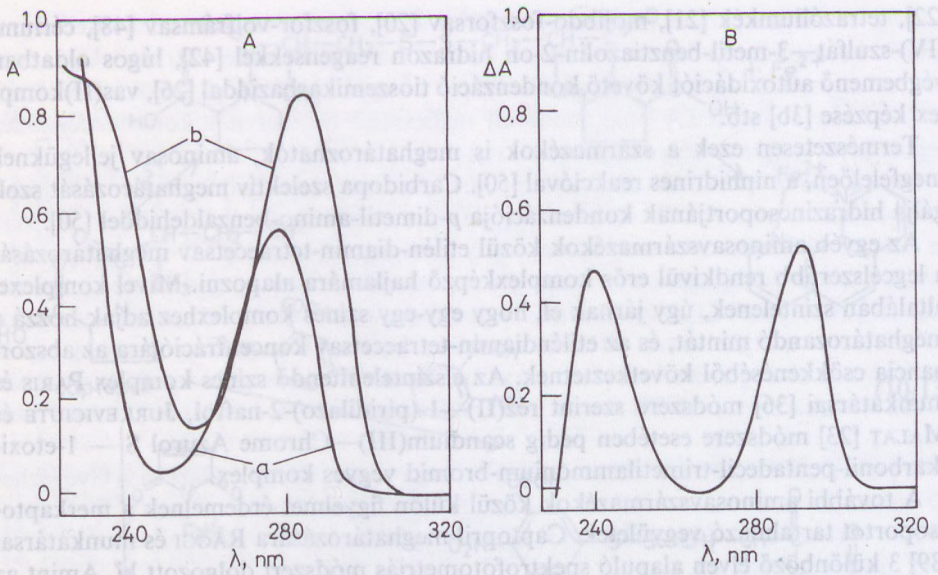
A ninhidrines reakció mellett számos más reakció is alkalmas aminosavak átalakítására spektrofotometriásan aktív származékokká. Így pl. reakció 1,2-naftokinon-4-szulfonsavval, amellyel az aminosavak a 7. fejezet (7/7) reakcióegyenlete szerint alakulnak át 1,2-naftokinon-származékká [13,24b], lúgos közegben réz(II)ionokkal végrehajtott és intenzív kék színű komplexekhez vezető reakció [24c], töltésátviteli komplex képzése klóranillal [1], 2,4-dinitro-fluor-benzolos reakció, ami *N*-2,4-dinitro-fenil-származékokká alakítja az aminosavakat [47], fenil-tio-hidantoin-származékokká való átalakítás fenil-izotiocianát reagenssel [9], kondenzáció *o*-ftálaldehiddel [44], *N*-danzilezés [17], ill. dabzilezés [30] végrehajtása danzil-, ill. dabzil-kloriddal (1-dimetil-amino-naftalin-5-szulfonsav-klorid, ill. 4-dimetil-amino-azobenzol-4'-szulfonsav-klorid) stb. Bár a felsorolt és számos további reagenssel végrehajtott reakciók egyik célja az aminosavak átalakítása spektrofotometriásan (vagy fluorimetriásan) aktív származékká, az utóbbi öt reakció fő felhasználási területe a kromatográfiás analízis, ahol elsősorban HPLC elválasztások előtti származékképzési reakciókként kerülnek alkalmazásra [27].

A gyógyszerkönyvekben is használatos egyéb módszerek közül megemlítjük arginin szelektív meghatározását pl. injekciós készítményben [51e] a Sakaguchi-reakció segítségével (vörös színű termékhez vezető oxidatív kondenzáció arginin guanidinocsoportja és 2,4-diklór-α-naftol között).

10.12.3. Kémiai reakciókra alapozott módszerek aminosavszármazékok, peptidek és fehérjék analízisében

Aminosavak származékai, valamint a peptidek és fehérjék általában tartalmazzák azokat a funkciós csoportokat, amelyek az előző alfejezetben, valamint a 7. fejezetben leírt számos módszer alapját képezik, s így ezek a származékok spektrofotometriás analízisében is nagyszámú kémiai reakcióra alapozott módszert találunk.

Az egyszerű (α-helyzetben, ill. az aromás magban szubsztituált) tirozinszármazékok közül levodopa, metildopa és carbidopa meghatározására számos kémiai reakción alapuló spektrofotometriás módszert írtak le. DAVIDSON módszerei [4, 5, 6] nem a származékok aminosav jellegét megadó funkciós csoportjaira, hanem fő jellegzetessé-



10/9. ábra. Spektrumok levodopa differencia-spektrofotometriás meghatározásához bórsavas komplexképződés alapján. Koncentráció: 4,0 mg/100 ml.

A) Alapspektrumok *a)* Oldószer: foszfát puffer; pH 7. *b)* Oldószer: foszfát-borát puffer; pH 7. *B)* Differenciaspektrum (*b* oldat *a*-val szemben)

(A. G. Davidson, J. Pharm. Biomed. Anal. **2**, 45 (1984) [4])

gükre, az 1,2-difenol-csoportra alapulnak. Amint az a 10/9. ábrán látható, jelentős batokróm eltolódás következik be, ha a két vicinális fenolos hidroxilcsoportot gyűrűs bórsav-észterré alakítjuk át. A bórsavat nem tartalmazó, azonos pH-jú oldattal szemben felvett differenciaspektrum 292 nm-nél megfelelő intenzitással rendelkezik ahhoz, hogy kvantitatív meghatározás alapját képezze ($\Delta\varepsilon_{levodopa} = 2544$, $\Delta\varepsilon_{metildopa} = 2622$, $\Delta\varepsilon_{carbidopa} = 1863$). Monofenolok és számos más anyag nem adják a reakciót, s így az alkalmas a fenti anyagok szelektív meghatározására gyógyszerkészítményekben [4,54]. Teljesen hasonló elvek alapján, germánium-dioxiddal képzett gyűrűs észterekre alapozott differencia-spektrofotometriás módszer segítségével 292,5 nm-nél ugyanezen anyagok meghatározása kétszeres érzékenységgel végezhető el [5]. A reakciót természetesen adja az 1,2,3-trifenol típusú benserazid is, a differenciaspektrum más alakja alapján azonban más hullámhosszon (238 és 292,5 nm) végzett differencia-spektrofotometriás mérés segítségével a két anyag egymás melletti meghatározása gyógyszerkészítményekben elvégezhető [6]. Ha reagensként nátrium-volframátot használunk, a mérést 300 nm körül végezhetjük el [41].

Az eddig ismertetett ultraibolya spektrofotometriás módszereken túlmenően számos színreakció is ismeretes levodopa és származékai kvantitatív analízisében, így töltésátviteli komplex képzése klóranillal [28], a vicinális difenolgyűrű redukáló sajátságain alapuló módszerek ammónium-vanadát [46, 49], vas(III)—1,10-fenantrolin

[22], tetrazóliumkék [21], molibdo-foszforsav [20], foszfor-volfrámsav [48], cérium-(IV)-szulfát—3-metil-benztiazolin-2-on hidrazon reagensekkel [42], lúgos oldatban végbemenő autoxidációt követő kondenzáció tioszemikarbaziddal [26], vas(II)komplex képzése [3b] stb.

Természetesen ezek a származékok is meghatározhatók, aminosav jellegüknek megfelelően, a ninhidrines reakcióval [50]. Carbidopa szelektív meghatározását szolgálja hidrazincsoportjának kondenzációja *p*-dimetil-amino-benzaldehiddel [50].

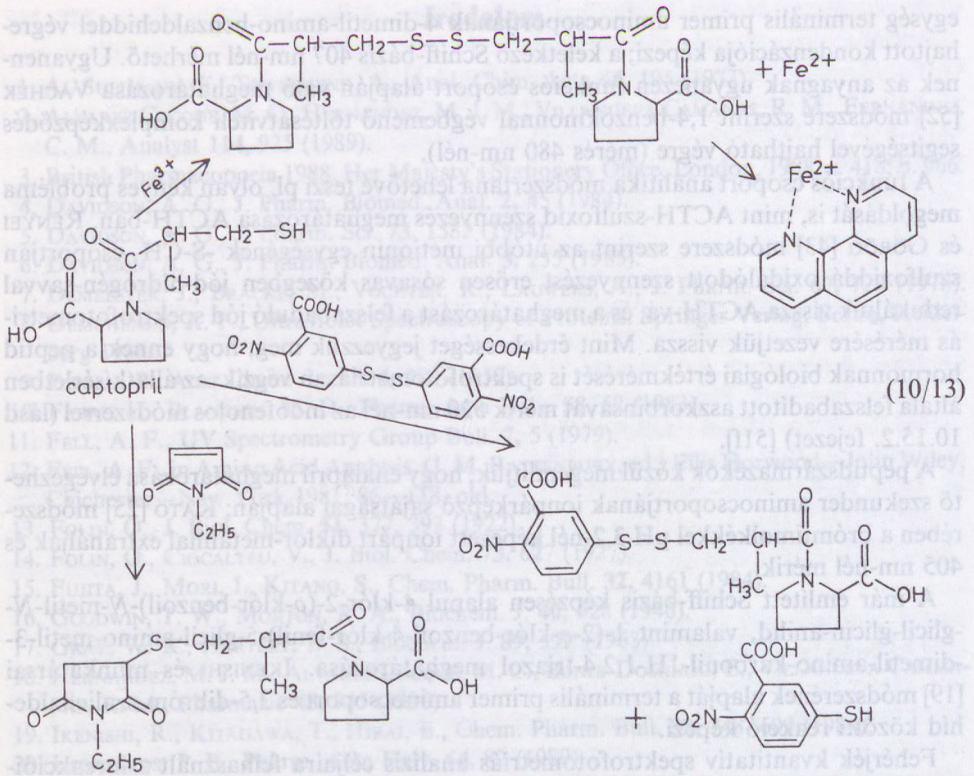
Az egyéb aminosavszármazékok közül etilén-diamin-tetraecetsav meghatározását a legcélszerűbb rendkívül erős komplexképző hajlamára alapozni. Mivel komplexei általában színtelenek, úgy járnak el, hogy egy-egy színes komplexhez adják hozzá a meghatározandó mintát, és az etiléndiamin-tetraecetsav koncentrációjára az abszorbancia csökkenéséből következtetnek. Az elszíntelenítendő színes komplex PARIS és munkatársai [36] módszere szerint réz(II)—1-(piridilazo)-2-naftol, JURKEVICIUTE és MALAT [23] módszere esetében pedig scandium(III)—Chrome Azurol S — 1-etoxi--karbonil-pentadecil-trimetilammónium-bromid vegyes komplex.

A további aminosavszármazékok közül külön figyelmet érdemelnek a merkaptocsoportot tartalmazó vegyületek. Captopril meghatározására RAGGI és munkatársai [39] 3 különböző elven alapuló spektrofotometriás módszert dolgozott ki. Amint az a (10/13) reakciósémán látható, mindhárom módszer az -SH-csoport reakcióin alapul. Az egyik módszer alapja az -SH-csoport vas(III)ionokkal diszulfiddá való oxidációja és a keletkező vas(II)ionok mérése 1,10-fenantrolin-komplex alakjában 515 nm-nél. Ez a reakció képezi az alapját MOHAMED módszerének is [33].

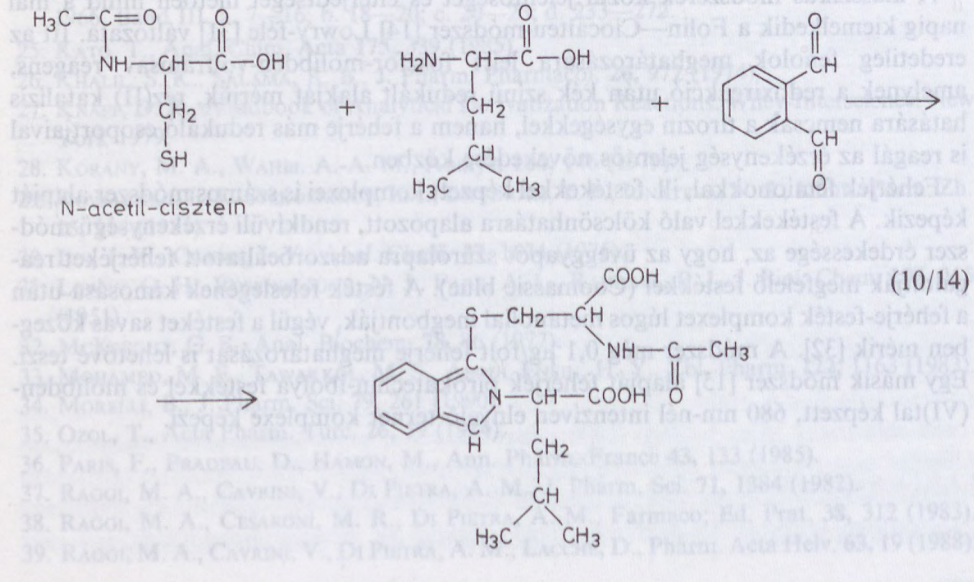
A másik módszer reagense 5,5′-ditio-bisz-(2-nitro-benzoesav), amely redoxi kicserélődési reakcióba lép captoprillel, amelynek során felszabaduló 2-nitro-5-merkaptobenzoesav pH 8-nál 412 nm-nél mérhető. A harmadik, indirekt és a fenti kettőnél lényegesen gyengébb érzékenységű módszer captopril szulfhidrilcsoportjának *N*-etil--maleimid kettős kötésre való addícióján alapul. Ez utóbbi abszorbanciájának 300 nm-nél bekövetkező csökkenésének méréséből következtethetünk a captopril koncentrációjára.

A fenti három módszer közül a vas(III)—1,10-fenantrolinos módszert sikerrel alkalmazták acetil-cisztein és merkapto-propionil-glicin készítmények meghatározására [37]. Ez utóbbi meghatározását kidolgozták a korábban ugyancsak említett 5,5′-ditio-bisz-(2-nitro-benzoesav) reagenssel való reakcióra [38], valamint palládium(II)ionokkal való komplexképzésre [40] alapozva is. Az *o*-ftálaldehid — izoleucin reagenssel végrehajtott kondenzáció (lásd 10/14 reakcióséma) terméke 355 nm-nél rendelkezik abszorpciós maximummal [2]. A módszer FIA változatát is kidolgozták gyógyszerkészítmények hatóanyag-tartalmának meghatározására [18].

A gyógyászatban alkalmazott peptidek spektrofotometriás analízisében igen sok esetben alkalmazhatók a peptidlánc oldalláncain levő, az egyes aminosavakhoz tartozó funkciós csoportokra jellemző reakciók. Hypertensin meghatározása során pl. az oktapeptidben levő tirozin egység fenolgyűrűje azo-kapcsolási reakcióba vihető diazotált 4-klór-anilinnel. A 420 nm-nél maximummal rendelkező intenzív spektrum ($\varepsilon = 17\,000$) alapján VOGT és munkatársai [53] igen érzékeny módszert dolgoztak ki a fenti peptid gyógyszer meghatározására. Aspartam (L-aszparaginil-L--fenil-alanin-metilészter) OZOL [35] szerinti meghatározásának alapját az aszparaginil



(10/13)



(10/14)

egység terminális primer aminocsoportjának 4-dimetil-amino-benzaldehiddel végrehajtott kondenzációja képezi; a keletkező Schiff-bázis 407 nm-nél mérhető. Ugyanennek az anyagnak ugyanezen funkciós csoport alapján való meghatározása VACHEK [52] módszere szerint 1,4-benzokinonnal végbemenő töltésátviteli komplexképződés segítségével hajtható végre (mérés 480 nm-nél).

A funkciós csoport analitika módszertana lehetővé teszi pl. olyan kényes probléma megoldását is, mint ACTH-szulfoxid szennyezés meghatározása ACTH-ban. RÉNYEI és GÖRÖG [43] módszere szerint az utóbbi metionin egységének -S-CH_3-csoportján szulfoxiddá oxidálódott szennyezést erősen sósavas közegben jód-hidrogén-savval redukáljuk vissza ACTH-vá, és a meghatározást a felszabaduló jód spektrofotometriás mérésére vezetjük vissza. Mint érdekességet jegyezzük meg, hogy ennek a peptid hormonnak biológiai értékmérését is spektrofotometriásan végzik: az állatkísérletben általa felszabadított aszkorbinsavat mérik 520 nm-nél az indofenolos módszerrel (lásd 10.15.2. fejezet) [51f].

A peptidszármazékok közül megemlítjük, hogy enalapril meghatározása elvégezhető szekunder aminocsoportjának ionpárképző sajátságai alapján; KATO [25] módszerében a brómtimolkékkel pH 3,2-nél képezett ionpárt diklór-metánnal extrahálják és 405 nm-nél mérik.

A már említett Schiff-bázis képzésen alapul 4-klór-2-(*o*-klór-benzoil)-*N*-metil-*N*--glicil-glicin-anilid, valamint 1-(2-*o*-klór-benzoil-4-klór-fenil)-5-glicil-amino-metil-3--dimetil-amino-karbonil-1H-1,2,4-triazol meghatározása. IKENISHI és munkatársai [19] módszerének alapját a terminális primer aminocsoport és 3,5-dibróm-szalicilaldehid közötti reakció képezi.

Fehérjék kvantitatív spektrofotometriás analízis céljaira felhasznált színreakcióinak részletes ismertetése túllépné gyógyszer-analitikai jellegű könyvünk kereteit. A nagyszámú klasszikus módszer összefoglalását illetően KAKAC és VEJDELEK könyvére utalunk [24d].

A klasszikus módszerek közül jelentőségét és elterjedtségét illetően mind a mai napig kiemelkedik a Folin—Ciocalteu-módszer [14] Lowry-féle [31] változata. Itt az eredetileg fenolok meghatározására leírt foszfor-molibdén-volfrámsav reagens, amelynek a redoxireakció után kék színű redukált alakját mérjük, réz(II) katalízis hatására nemcsak a tirozin egységekkel, hanem a fehérje más redukáló csoportjaival is reagál az érzékenység jelentős növekedése közben.

Fehérjék fémionokkal, ill. festékekkel képzett komplexei is számos módszer alapját képezik. A festékekkel való kölcsönhatásra alapozott, rendkívüli érzékenységű módszer érdekessége az, hogy az üveggyapot szűrőlapra adszorbeáltatott fehérjéket reagáltatják megfelelő festékkel (Coomassie blue). A festék feleslegének kimosása után a fehérje-festék komplexet lúgos metanollal megbontják, végül a festéket savas közegben mérik [32]. A módszer még 0,1 μg/folt fehérje meghatározását is lehetővé teszi. Egy másik módszer [15] alapját fehérjék pirokatechin-ibolya festékkel és molibdén-(VI)tal képzett, 680 nm-nél intenzíven elnyelő terner komplexe képezi.

Irodalom

1. Al-Sulimany, F., Townshend, A., Anal. Chim. Acta **66,** 195 (1973).
2. Alvarez Cocque, M. C., Hernandez, M. J. M., Villanueva Camanas, R. M., Fernandez, C. M., Analyst **114,** 975 (1989).
3. British Pharmacopoeia 1988, Her Majesty's Stationery Office, London, 1988. a. 418; b. 966.
4. Davidson, A. G., J. Pharm. Biomed. Anal. **2,** 45 (1984).
5. Davidson, A. G., J. Pharm. Sci. **73,** 1582 (1984).
6. Davidson, A. G., J. Pharm. Biomed. Anal. **3,** 235 (1985).
7. Demeester, J., Bracke, M., Vochten, R., Lauwers, A., J. Pharm. Sci. **67,** 729 (1978).
8. Demchenko, A. P., Ultraviolet Spectroscopy of Proteins. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1986.
9. Edman, P., Acta Chem. Scand. **4,** 283 (1950).
10. Fabre, H., Blanchin, M. D., Pharm. Acta Helv. **58,** 52 (1983).
11. Fell, A. F., UV Spectrometry Group Bull. **7,** 5 (1979).
12. Fell, A. F., in Amino Acid Analysis. (J. M. Rattenbury, ed.) Ellis Horwood—John Wiley, Chichester—New York 1981. 86—118. old.
13. Folin, O., J. Biol. Chem. **51,** 377, 393 (1922).
14. Folin, O., Ciocalteu, V., J. Biol. Chem. **73,** 627 (1927).
15. Fujita, J., Mori, I., Kitano, S., Chem. Pharm. Bull. **32,** 4161 (1984).
16. Goodwin, T. W., Morton, R. A., Biochem. J. **40,** 628 (1946).
17. Gray, W. R., Hartley, B. S., Biochem. J. **89,** 59P (1963).
18. Hernandez, M. J. M., Alvarez Cocque, M. C., Bonet Domingo, E., Villanueva Cammanas, R. M., Pharmazie **45,** 745 (1990).
19. Ikenishi, R., Kitagawa, T., Hirai, E., Chem. Pharm. Bull. **32,** 748, 609 (1984).
20. Issopoulos, P. B., Pharm. Acta Helv. **64,** 82 (1989).
21. Issopoulos, P. B., Pharm. Weekblad, Sci. E. **11,** 213 (1989).
22. Issopoulos, P. B., J. Anal. Chem. **366,** 124 (1990).
23. Jurkeviciute, J., Malat, M., Cesk. Farm. **29,** 78 (1980).
24. Kakac, B., Vejdelek, Z. J., Handbuch der Kolorimetrie. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1966. Band III. a. 7—16; b. 18—20; c. 20—23; d. 233—272.
25. Kato, T., Anal. Chim. Acta **175,** 339 (1985).
26. Khalil, S. K., Salama, R. B., J. Pharm. Pharmacol. **26,** 972 (1974).
27. Knapp, D. R., Handbook of Analytical Derivatization Reactions. Wiley-Interscience, New York 1979.
28. Korany, M. A., Wahbi, A.-A. M., Analyst **104,** 146 (1979).
29. Kovalenko, L. I., Stekolnikov, L. I., Litvinova, T. P., Ignateva, N. S., Khim.-Farm. Zh. **15,** 114 (1981).
30. Lin, J.-K., Chang, J.-Y., Anal. Chem. **47,** 1634 (1975).
31. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, P. J., J. Biol. Chem. **193,** 265 (1951).
32. McKnight, G. S., Anal. Biochem. **78,** 86 (1977).
33. Mohamed, M. E., Tawakkol, M. S., Aboul-Enein, H. Y., Zbl. Pharm. **122,** 1163 (1983).
34. Morelli, B., J. Pharm. Sci. **79,** 261 (1990).
35. Ozol, T., Acta Pharm. Turc. **26,** 59 (1984).
36. Paris, F., Pradeau, D., Hamon, M., Ann. Pharm. France **43,** 133 (1985).
37. Raggi, M. A., Cavrini, V., Di Pietra, A. M., J. Pharm. Sci. **71,** 1384 (1982).
38. Raggi, M. A., Cesaroni, M. R., Di Pietra, A. M., Farmaco; Ed. Prat. **38,** 312 (1983).
39. Raggi, M. A., Cavrini, V., Di Pietra, A. M., Lacché, D., Pharm. Acta Helv. **63,** 19 (1988).

40. Raggi, M. A., Nobile, L., Cavrini, V., Di Pietra, A. M., Boll. Chim. Farm. **125,** 295 (1986).
41. Rao, G. R., Avadhanulu, A. B., Indian Drugs **23,** 699 (1986).
42. Rao, G. R., Raghuveer, S., Khadgapathi, P., Indian Drugs **22,** 579 (1985).
43. Rényei M., Görög S., Gyógyszerészet **23,** 346 (1979).
44. Roth, M., Anal. Chem. **43,** 880 (1971).
45. Ruhemann, S., J. Chem. Soc. **97,** 1438, 2025 (1910); **99,** 792, 1111, 1486 (1911); **101,** 780 (1912).
46. Sane, R. T., Bhounsule, G. J., Sawant, S. V., Indian Drugs **24,** 207 (1987).
47. Sanger, F., Biochem. J. **39,** 507 (1945).
48. Scott, S., Behrman, E. J., Anal. Letters **21,** 183 (1988).
49. Shukla, S., Pathak, V. N., Shukla, I. C., J. Inst. Chem. **57,** 115 (1985).
50. Steup, A., Metzner, J., Voll, A., Pharmazie **41,** 739 (1986).
51. The United States Pharmacopoeia XXII. USP Convention Inc., Rockville, Md., 1985. a. 757; b. 869; c. 1007; d. 1430; e. 109; f. 354.
52. Vachek, J., Cesk. Farm. **33,** 217 (1984).
53. Vogt, W., Koczorek, Kh. R., Vogt, H.-H., Knedel, M., Reindfleisch, G., Z. Anal. Chem. **269,** 187 (1974).
54. Yücesoy, C., J. Fac. Pharm. Gazi **7,** 43 (1990).

10.13. Szteroid hormonok [28,29,30,35,36]

10.13.1. Meghatározás saját fényelnyelés alapján

A természetes és szintetikus szteroid hormonok túlnyomó többsége spektrofotometriásan aktív vegyület. A spektrofotometriás aktivitást hordozó funkciós csoportokról a 10/8. táblázat nyújt áttekintést. Részletesebb adatokat illetően néhány fontos spektrumgyűjteményre utalunk [22, 23, 57, 61, 69].

10/8. táblázat. UV-aktív szteroid hormonok fontosabb kromoforcsoportjai (oldószer: etanol)

Csoport	λ_{max}, nm	ε	Előfordulás	Tipikus származék
Δ^4-3-keto	240	17 000	androgének	tesztoszteron
			anabolikumok	19-norteszteron észterek
			gesztagének	progeszteron
			kortikoszteroidok	hidrokortizon
$\Delta^{1,4}$-3-keto	243	16 000	anabolikumok	metándienon
			kortikoszteroidok	prednizolon
$\Delta^{4,6}$-3-keto	285	25 000	gesztagének	megesztrol acetát
3-aciloxi vagy alkoxi-3,5--dién	238	20 000	intermedierek	
1,3,5(10)-trién-3-ol				
semleges	280	2 000	ösztrogének	ösztron, ösztradiol,
lúgos	300	2 800		etinil-ösztradiol
1,3,5(10)-trién-3-alkoxi	278	1 900	ösztrogének	mesztranol
	287	1 750		
1,3,5(10)-trién-3-aciloxi	268	800	ösztrogének	ösztradiol-dipropionát

A 10/8. táblázat adataiban tükröződő spektrofotometriás aktivitás számos kvantitatív analitikai feladat megoldását teszi lehetővé elsősorban alapanyagok és kiszerelt készítmények körében; biológiai minták analízisére ez a módszer csekély szelektivitása és nem kielégítően nagy érzékenysége miatt nem alkalmas.

Az androgének, anabolikumok, gesztagének és kortikoszteroidok körében is általánosan előforduló telítetlen 3-keto-csoport abszorpciós maximumának mérését a legtöbb gyógyszerkönyv elvégezteti a gyógyszer-alapanyagok vizsgálata során. Csekély szelektivitása miatt ez a mérés inkább tekinthető kiegészítő adatnak, s így a 240 nm tájékán mért abszorbanciából csak ritkán számítanak hatóanyag-tartalmat (pl. metiltesztoszteron esetében) [12a]. Számos 4-én-3-ketoszteroid alapanyag tartalmi meghatározása szerepel azonban az USP XXII-ben vékonyréteg-kromatográfiás elválasztás, elúció majd 240 nm környékén végrehajtott mérés alapján [76a], mint pl. prednizolon-hemiszukcinát [76b], nandrolon-dekanoát [76c] és tesztoszteron [76d] esetében.

Speciális alkalmazási területe a 240 nm körüli abszorbancia mérésének kortikoszteroid-21-foszfátok szabad kortikoszteroid szennyezésének meghatározása az utóbbiak vizes közegből végzett szelektív kloroformos vagy diklór-metános extrakciója, az oldószer bepárolása és metanolos oldás után. Ezzel a módszerrel végzik a USP XXII szerint egyebek között betametazon-nátrium-foszfát szabad betametazon-tartalmának meghatározását [76e].

Nagyobbak a lehetőségei a módszernek kiszerelt készítmények vizsgálatánál, hiszen a viszonylag nagy moláris abszorpciós koefficiens lehetővé teszi a forgalomban levő legkisebb hatóanyag-tartalmú tabletta, injekció, kenőcs stb. készítmények vizsgálatát is. A nagyszámú ilyen gyógyszerkönyvi módszer közül megemlítjük metiltesztoszteron tabletta és kapszula [76f] és tesztoszteron szuszpenzió [76d] hatóanyag-tartalmának meghatározását. A vékonyréteg-kromatográfiás elválasztás a nehezebben analizálható készítmények esetén (pl. prednizolon kenőcs [48]) is eredményes lehet a szelektivitási problémák megoldásában.

Kombinációs készítmények vizsgálatában is kitűnőek a lehetőségei a vékonyréteg-kromatográfiás elválasztásnak és az elúció utáni közvetlen mérésnek. Egy ilyen módszert részletesen is ismertetünk az 5. fejezet [43] irodalmi hivatkozásában.

Kedvező esetben a meghatározást el lehet végezni két hullámhosszon való mérés és kétismeretlenes egyenletrendszer segítségével, mint pl. hidrokortizon (241 nm) és kloramfenikol (273 nm) [65] vagy spironolakton (239 nm) és hidroklorotiazid (318 nm) [63] egymás melletti meghatározásánál. Alkalmazható összetett készítmények analízisére az ortogonális polinomok módszere is (lásd 4.3.3. fejezet) pl. prednizolon, ill. hidrokortizon meghatározásánál neomicin, ill. fenilefrin mellett szolúciós készítményekben [2].

Akár háttér jellegű fényelnyeléseket, akár összetett készítmények másik komponensének spektrumát akarjuk eltávolítani a készítmény telítetlen ketoszteroid komponensének spektruma mellől, sikerrel alkalmazható a nátrium-bór-hidrides redukciójukon alapuló differencia-spektrofotometriás módszer (lásd 273. oldal). A 8/2. táblázatban összefoglalt közlemények olyan feladatok megoldását írják le, mint nandrolon-fenilpropionát meghatározása olajos injekciókban, progeszteron meghatározása hasonló készítményben benzil-alkohol és ösztradiol-benzoát mellett, prednizolon meghatározása kenőcsben metilparabén, ill. tabletta készítményben fenilbutazon mellett [31],

norgesztrel meghatározása fogamzásgátló tablettában [34], kis mennyiségű fluorokortikoid meghatározása kenőcsben [19] stb.

Amint erre a 4.5.2. fejezetben rámutattunk, 4-én-3-ketoszteroidok spektrofotometriás analízisében fellépő szelektivitási, ill. háttérproblémák megoldására a derivatív spektrofotometria is lehetőséget nyújt, s ott a 4/14. ábrán be is mutattuk a spironolakton tabletta analízisével kapcsolatos spektrumokat. Leírták különböző gesztagének meghatározását ösztrogének mellett [21], tesztoszteron és progeszteron mérését olajos injekciókban [25], kortikoszteroidok kombinációs készítményeinek mérését [26] is.

Közel egy nagyságrenddel kisebb intenzitásuk miatt lényegesen kényesebb feladatot jelent ösztrogének 280 nm körül megjelenő sávjának felhasználása kvantitatív meghatározásukra, annál is inkább, mivel ezek általában igen kis mennyiségben kerülnek terápiás alkalmazásra mind az injekciós, mind pedig a tabletta készítményekben. Az egyszerű spektrofotometriás módszer minden további nélkül csupán ösztrogén gyógyszer-alapanyagok vizsgálatára alkalmas, csekély szelektivitása folytán azonban az így nyert eredmények értéke erősen kérdéses (pl. ösztriol tartalmi meghatározása 281 nm-nél [76g]).

Kiszerelt készítmények vizsgálata esetén mindenképpen háttérproblémákat kell megoldani. Mivel a nagy feleslegben jelenlevő másik komponens általában valamilyen ketoszteroid (gesztogén, androgén hormon), nagyban növeli a meghatározás szelektivitását és pontosságát, ha az utóbbiak ketocsoportját nátrium-bór-hidrides redukcióval spektrofotometriásan inaktívvá tesszük [6, 37, 60].

Szabad fenolos hidroxilt tartalmazó ösztrogénkészítmények vizsgálatára jól alkalmazható a fenolos hidroxilcsoport erősen lúgos közegben (pH ~ 13) bekövetkező ionizációjára alapozott differencia-spektrofotometriás módszer. Ez a módszer a fenolészterek könnyű hidrolizálhatósága következtében 3-acil-oxi ösztrogénekre is alkalmazható [33], éterszármazékokra azonban természetesen nem.

Finomszerkezettel rendelkező spektrumuknak köszönhetően ösztrogének derivatív spektrofotometriás meghatározásának lehetőségei jobbak, mint a 4-én-3-keto-szteroidok esetében. Ezt ki is használták egyebek között ösztradiol észterek [25], etinilösztradiol és mesztranol [21] meghatározására gyógyszerkészítményekben ketoszteroidok mellett, konjugált ösztrogének meghatározására [62], 0,1%-nyi mesztranol szennyezés meghatározására noretiszteronban [39]. Etinilösztradiol meghatározására noretiszteron nagy feleslege mellett differencia-derivatív spektrofotometriás módszert is leírtak [55] lásd 4.5.3. fejezet.

Az eddig tárgyalt két kromofor csoport egyikét sem tartalmazó szteroidok spektrofotometriás vizsgálati módszerei közül megemlítjük danazol alapanyag hatóanyagtartalmának meghatározását 285 nm-nél, ill. a kapszuláét kloroformos közegben 287 nm-nél [76h], oxymetholon alapanyag és tabletta mérését 315 nm-nél [76i] és megesztrol acetát alapanyag meghatározását 287 nm-nél [12b]. Itt említjük meg stanozolol meghatározását tabletta készítményben derivatív spektrofotometriás módszerrel $^1D_{239}$ vagy $^2D_{247,231}$ mérése alapján [17].

Az eddig ismertetett vizsgálatok oldószere az esetek többségében etanol vagy metanol volt. Említést érdemel, hogy különösen a szteroid analitika klasszikus korszakában, az 1950-es években széles körű vizsgálat tárgyát képezték szteroidok spektrumai koncentrált kénsavban; még az ilyen adatokat tartalmazó spektrum atlasz is

forgalomba került [70]. Mind a kvalitatív, mind pedig a kvantitatív analízisben nagy jelentősége volt annak a körülménynek, hogy ezek a spektrumok még olyan rokon szerkezetű szteroidok (pl. epimer párok) között is jelentős különbséget mutattak, amelyeknek alkoholos közegben felvett ultraibolya spektrumai teljesen megegyeztek. Mivel azonban itt az oldás során kémiai reakció játszódik le, és ezért a spektrum alakja és intenzitása függ az oldástól a mérésig eltelt időtől és számos más nehezen kézben tartható tényezőtől, reprodukálhatósági problémák miatt ez a módszer mára már nagymértékben kiszorult az analitikai gyakorlatból.

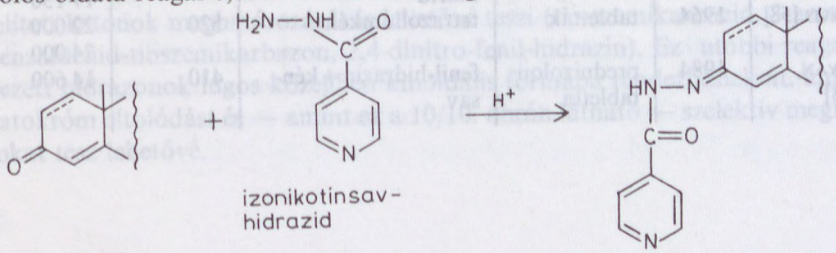
10.13.2. Kémiai reakciókra alapozott módszerek

A saját fényelnyelésre alapozott spektrofotometriás meghatározás korlátozott érzékenysége és szelektivitása miatt számos gyakorlati feladat spektrofotometriás megoldásához feltétlenül szükség van a spektrofotometriás aktivitást növelő, ill. a spektrumot a mérés szempontjából kedvezőbb hosszúhullámú tartományba eltoló kémiai reakció alkalmazására. Ezekkel a módszerekkel külön monográfia foglalkozik [5]. Megemlítünk még néhány monográfiát, amelyek számos adatot tartalmaznak a módszer klasszikus irodalmának gyógyszerészeti [27], ill. biológiai-klinikai [52] és az újabb irodalom gyógyszerészeti [28], általános [29], ill. gyógyszeripari [30] vonatkozásaival.

A szteroidhormonok funkciós csoportjai közül a leggyakrabban a következők képezik spektrofotometriás reagensek támadási pontját: ketoncsoport, ezek közül is leginkább a Δ^4-3-keto-, ill. $\Delta^{1,4}$-3-keto-csoport, ill. a szomszédságukban levő aktív metiléncsoport (Δ^4-3-ketonok esetében a 2-, 17-ketonok esetében pedig a 16-metilén-csoport), ösztrogének fenolgyűrűje, kortikoidok redukáló tulajdonságú 17-es odallánca. Megemlítendők még szteroidok színreakciói különböző, többé-kevésbé tömény ásványi savakkal (elsősorban kénsavval); ezek általában nem rendelhetők egyértelműen egy-egy funkciós csoporthoz.

A 10/9. táblázatban bemutatunk néhányat a fenti funkciós csoportok derivatizálásán alapuló, gyógyszer-analitikai szempontból fontosabb módszerekből. (Olyan, a klinikai diagnosztikában nagy fontosságú módszereket, amelyek endogén szteroidok meghatározására szolgálnak biológiai mintákban, mint pl. a 17-ketoszteroidok meghatározására szolgáló 1,3-dinitro-benzolos Zimmermann-módszer [90] vagy a Kober—Haenni—Ittrich-módszer [46, 49, 50, 54] számtalan változata ösztrogének meghatározására kénsav-hidrokinon reagenssel, amelyek kívül esnek könyvünk célkitűzésein, nem tárgyaljuk.)

A ketocsoport derivatizálására szolgáló módszerek közül gyógyszer-analitikai jelentőségét tekintve kiemelkedik az izonikotinsav-hidrazidos módszer. A reakció során (10/15 egyenlet), az eredeti Umberger-módszer [81] szerint a reagens 0,05%-os metanolos oldata reagál 0,007 M sósavas közegben a 3-keto-csoporttal.



izonikotinsav-hidrazid

(10/15)

10/9. táblázat. Néhány fotometriás módszer szteroid hormonok meghatározása

Szerző	Év	Minta	Reagens	Maximum, nm	ε
			A ketocsoport reakciói		
Umberger [81]	1955	gyógyszerkészítmények	izonikotinsav hidrazid — HCl	380—405	11 000—18 000
Walash [86]	1987	tabletták, szemkenőcs	szemikarbazid	269	25 000—30 000
Talbot [75]	1955	biol. minták	tioszemikarbazid	299—325	34 000—39 000
Belal [7]	1986	tabletták	hidroxil-amin + jód	300	5000—
			hidroxil-amin + klóranil	430	5500 6200—6300
Woodson [87]	1971	tabletták	2,4-dinitro-fenil-hidrazin	370—410	22 000—50 000
Görög [32]	1970	gyógyszerkészítmények	dietil-oxalát + Na-terc.-butilát	289—324	5 000—15 000
Zivanov–Stakic [91]	1989	mesterolon-tabletta	3-acetilamino-benzaldehid-tioszemikarbazon	544	7900
			A 17-etinilcsoport reakciói		
Szepesi, Görög [73]	1974	alapanyagok	Na-terc.-butilát + dietil-oxalát	294	10 600—10 800
Walash [85]	1985	tabletták	Na-terc.-butilát + 1,3-dinitro-benzol	512	11 300—17 700
			A fenoltípusú A gyűrű reakciói		
Tsilifonis, Chafetz [80]	1967	gyógyszerkészítmények	kénsav-metanol 7 : 3 elegy (v/v)	540	36 000 (etinilösztradiol)
Szabó [72]	1977	tabletták	kénsav-etanol 65 : 35 elegy (v/v)	532	53 000 (etinilösztradiol)
Urbányi, Mollica [82]	1968	gyógyszerkészítmények	diazotált 4-NH_2-6-Cl-*m*-benzol-diszulfonamid	500	8050
Eldawy [24]	1975	tabletták	diazotált 5-Cl-2,4-dinitro-anilin	450	11 300
			A kortikoszteroid oldallánc reakciói		
Callahan [15]	1962	tabletták	trifenil-tetrazólium-klorid	485	16 500 17 150
Kunze, Davis [58]	1964	tabletták	tetrazóliumkék	520	22 000—24 000
Chong Kwan, Schott [18]	1984	prednizolon tabletta	fenil-hidrazin + kénsav	410	14 600

10/9. táblázat. Folytatása

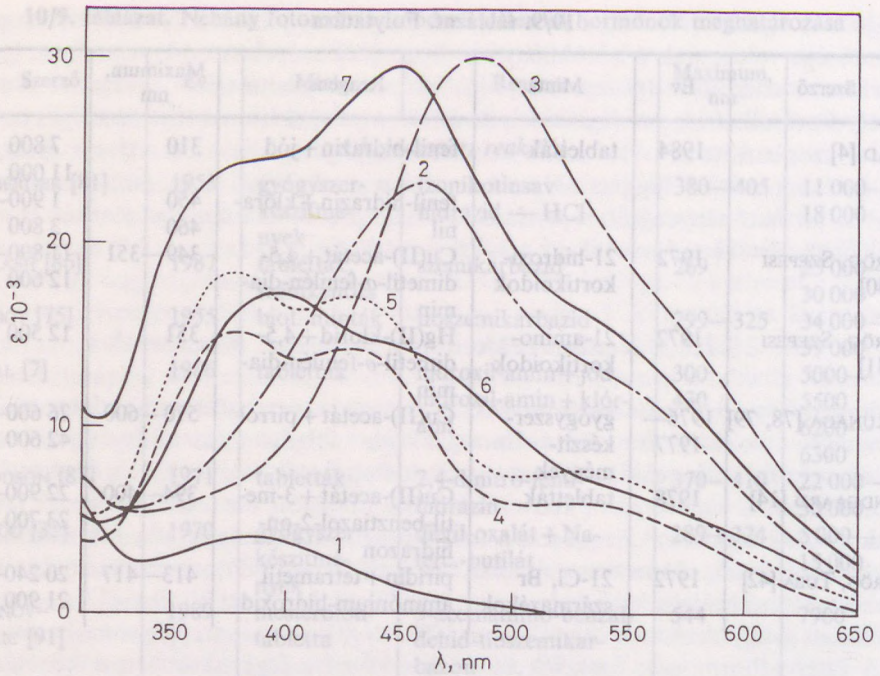
Szerző	Év	Minta	Reagens	Maximum, nm	ε
AYAD [4]	1984	tabletták	fenil-hidrazin + jód	310	7 800 11 000
			fenil-hidrazin + klóranil	450 460	1 900— 3 800
GÖRÖG, SZEPESI [40]	1972	21-hidroxi-kortikoidok	Cu(II)-acetát + 4,5-dimetil-*o*-fenilén-diamin	349—351	11 800— 12 600
GÖRÖG, SZEPESI [41]	1972	21-amino-kortikoidok	Hg(II)-klorid + 4,5-dimetil-*o*-fenilén-diamin	351	12 500
TOKUNAGA [78, 79]	1976— 1977	gyógyszer-készít-mények	Cu(II)-acetát + pirrol	570—600	26 600— 42 600
BUNDGAARD [14]	1978	tabletták	Cu(II)-acetát + 3-metil-benztiazol-2-on-hidrazon	394—400	22 900— 23 700
GÖRÖG, TUBA [42]	1972	21-Cl, Br származékok	piridin + tetrametil ammónium-hidroxid	413—417	20 240— 21 900

A Δ^4-3-ketonok reakciója ilyen körülmények között szobahőmérsékleten 20 perc alatt lejátszódik. A keletkezett hidrazon protonált alakja 380 nm-nél rendelkezik megfelelő intenzitású sávval ($\varepsilon \sim 11\,500$). $\Delta^{1,4}$-3-ketonok és $\Delta^{4,6}$-3-ketonok hosszabb hullámnál nyelnek el ($\lambda_{max} = 405$ és 415 nm között) és a sáv intenzitása is nagyobb ($\varepsilon \sim 18\,000$), $\Delta^{1,4}$-3-ketonokkal szemben azonban a reagens reakciókészsége kisebb: vagy a hőmérsékletet kell megemelni (1 óra reakcióidő 50 °C-on [67]), vagy töményebb reagenst kell alkalmazni (0,8% izonikotinsav-hidrazid 0,1 M sósavban [16]).

Előnyös tulajdonsága a reakciónak, hogy lejátszódik más oldószerek (etanol, kloroform) jelenlétében is, sőt kisebb mennyiségben még az injekciókészítésnél használt olaj sem zavarja a reakciót. Így a módszer alkalmas tabletta [1,88] és kenőcs [1] készítmények mellett olajos injekciók közvetlen vizsgálatára is [81, 86], az olaj oszlopkromatográfiás elválasztására csak igen kis hatóanyag-tartalmú injekciók esetén van szükség [81].

A módszer ma is használatos gyógyszerkönyvi módszerként telítetlen ketoszteroid alapanyagok és készítmények vizsgálatára [76j, 76k, 76l]. Számos automatizált változatát is leírták [3, 15, 68, 77].

Az izonikotinsav-hidrazidos módszer csak telítetlen ketoszteroidok meghatározására alkalmas. Ezzel szemben a 10/9. táblázatban felsorolt másik három reagens telített ketonok meghatározását is lehetővé teszi (tio-szemikarbazid, 3-acetil-aminobenzaldehid-tioszemikarbazon, 2,4-dinitro-fenil-hidrazin). Ez utóbbi reagenssel képezett hidrazonok lúgos közegben kinoidális formába rendeződnek át, ami további batokróm eltolódást és — amint ez a 10/10. ábrán látható — szelektív meghatározásokat tesz lehetővé.

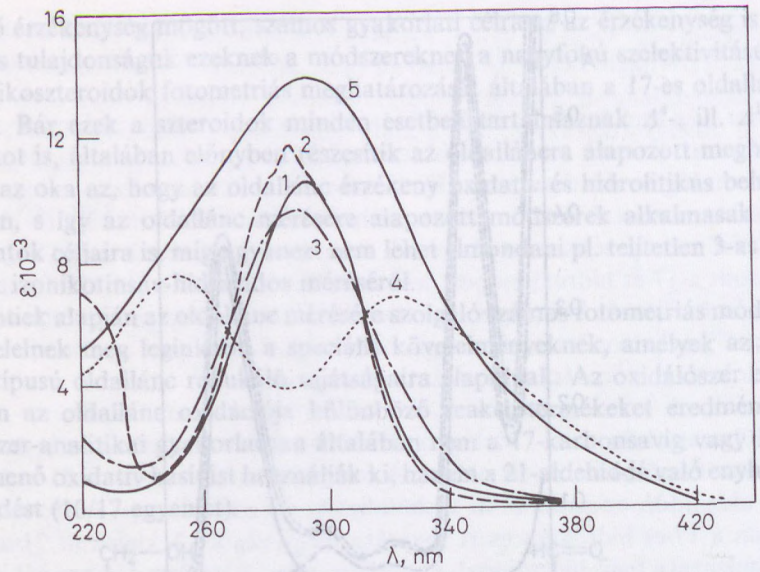


10/10. ábra. Ketoszteroid-2,4-dinitro-fenil-hidrazonok spektrumai. Oldószer: 0,1 M nátrium-hidroxid metanol és víz 4 : 1 elegyében.

1. 2,4-dinitro-fenil-hidrazin; *2.* noretiszteron (4-én-3-keton); *3.* metándienon (1,4-dién-3-keton); *4.* dehidro-epiandroszteron (17-keton); *5.* 3β,17-dihidroxi-5-pregnén-20-on-3-acetát (20-keton); 6. 3β-hidroxi-5,16-pregnadién-20-on-acetát (16-én-20-keton); *7.* progeszteron (4-én-3,20-dion). (S. Görög, Gy. Szász, Analysis of Steroid Hormone Drugs. Akadémiai Kiadó, Budapest — Elsevier, Amsterdam 1978, 294. old. [28])

Más mechanizmus szerint játszódik le a dietil-oxaláttal végbemenő kondenzációs reakció, itt ui. a reagens támadási pontja az oxocsoport szomszédságában levő aktív metiléncsoport. A 10/11. ábrán látható spektrumok már önmagukban is lehetőséget kínálnak szelektív meghatározásokra, további lehetőségeket jelent azonban, hogy pl. a 20-keto-csoport csak akkor adja a reakciót, ha szabad a 21-es szénatom, a Δ^4-3-ketocsoport pedig akkor, ha nincs kettős kötés a Δ^1 helyzetben. (A módszernek a 8. fejezetben leírt differencia-spektrofotometriás változata ezen az alapon lehetővé teszi Δ^4-3-keto szennyezés meghatározását $\Delta^{1,4}$-3-ketonokban [32].)

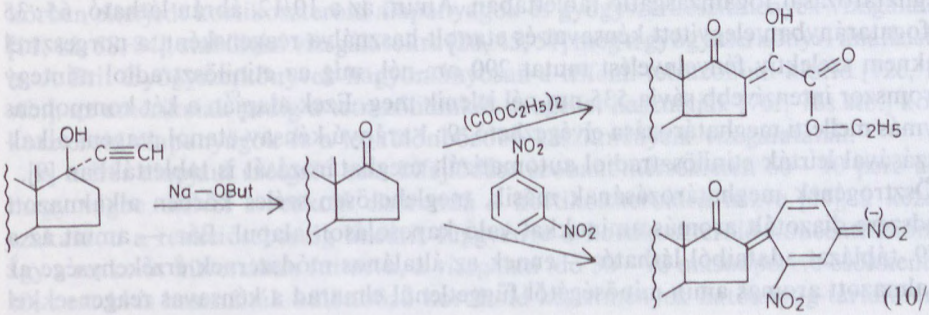
17α-etinil-17-hidroxi szteroidok nátrium-butilátos melegítéssel 17-keto-szteroidokká dezetinilezhetők, s mivel nátrium-butilát a keletkező ketocsoport dietil-oxalátos Claisen-kondenzációjának is reagense, lehetőség nyílik a 16-glioxalil-származék formájában történő indirekt meghatározásra [73]. Amint az a (10/16) reakciósémán látható, a dezetinilezés módot ad az 1,3-dinitro-benzolos Zimmermann-reakció alkalmazására is 17-etinil-szteroidok indirekt meghatározására [85].



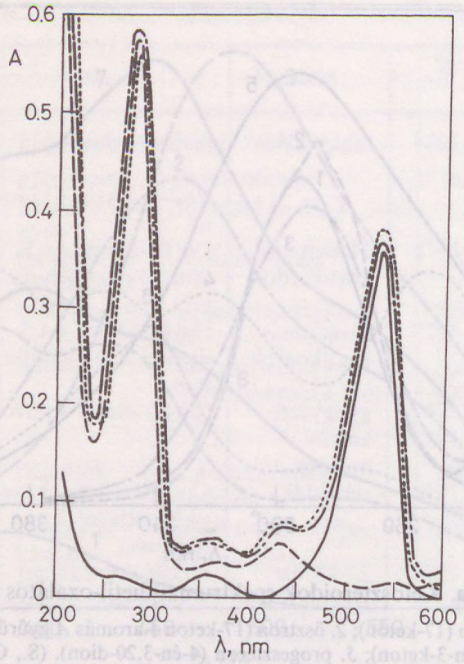
10/11. ábra. Ketoszteroidok spektrumai dietil-oxalátos reakció után.

1. dehidroepiandroszteron (17-keton); *2.* ösztron (17-keton + aromás *A* gyűrű); *3.* pregnenolon (20-keton); *4.* metiltesztoszteron (4-én-3-keton); *5.* progeszteron (4-én-3,20-dion). (S., Görög, Anal. Chem. **42,** 560 (1970) [32])

A fenolos hidroxilcsoportot tartalmazó ösztrogének meghatározására szolgáló, kémiai reakción alapuló módszerek közül a gyógyszer-analitikában legáltalánosabban az alkoholokkal hígított kénsavat használják. A Tsilifonis és Chafetz [80] által bevezetett 7 : 3 térfogatarányban elegyített kénsav-metanol reagens különösen etinil-ösztradiol és mesztranol kitűnő reagense. Amint az a 10/9. táblázat adataiból látható, a módszer érzékenysége kitűnő, de meglepő a szelektivitása is: a 17-es etinilcsoportot nem tartalmazó ösztron és ösztradiol nem adják a reakciót: a szín létrejöttének tehát az aromás *A* gyűrűn kívül még az etinilcsoport jelenléte is előfeltétele. A módszer gyógyszerkönyvi alkalmazásra is talált pl. etinil-ösztradiol tabletta [76m] és mesztranol alapanyag vizsgálatánál [76n]. A módszernek fogamzásgátló tablettákra való alkalmazása során az ösztrogén komponenst általában kromatográfiásan elválasztják a gesztogén komponenstől [43, 89].



(10/16)



10/12. ábra. Ovidon[R] fogamzásgátló tabletta hatóanyagainak (0,25 mg norgesztrel és 0,05 mg etinilösztradiol/tabletta) spektrumai 65 : 35 térfogatarányú kénsav—etanol elegyben.

– – – – – – – – – – norgesztrel 1 mg/100 ml ———— etinil-ösztradiol 0,2 mg/100 ml –·–·–·–·– a hatóanyagok elegye a fenti koncentrációkban . . . . . tabletta extraktum. (Szabó A., Acta Pharm. Hung. **47**, 24 (1977) [72])

Említést érdemel, hogy a klasszikus Kober—Haenni-féle vas(II)—fenol—kénsavas reagens [46, 54] még az Amerikai Gyógyszerkönyv legújabb kiadásában is alkalmazásra talál ösztradiolszuszpenzió tartalmi meghatározásánál [76 o], norgesztrel—etinilösztradiol tabletta etinilösztradiol-tartalmának meghatározására pedig 80%-os vizes kénsavat használnak reagensként [76p] ($\lambda_{max} = 520$, ill. 536 nm).

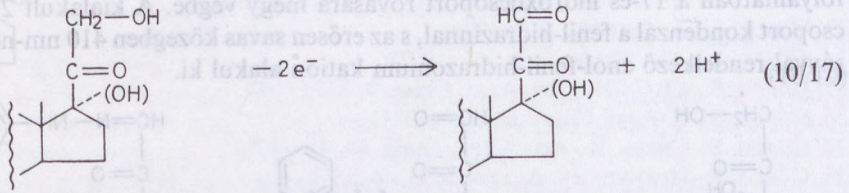
Az ugyancsak meglehetősen kiterjedten használt kénsav-etanol reagens [47, 71, 72] alkalmazásával Szabó [72] megoldotta norgesztrel és etinilösztradiol egymás melletti meghatározását fogamzásgátló tablettában. Amint az a 10/12. ábrán látható, 65 : 35 térfogatarányban elegyített kénsavat és etanolt használva reagensként, a norgesztrel csaknem szelektív fényelnyelést mutat 290 nm-nél, míg az etinilösztradiol mintegy háromszor intenzívebb sávja 535 nm-nél jelenik meg. Ezek alapján a két komponens egymás melletti meghatározása elvégezhető. 9 : 1 arányú kénsav-etanol reagens alkalmazásával leírták etinilösztradiol automatizált meghatározását is tablettákban [9].

Ösztrogének meghatározásának másik, meglehetősen széles körben alkalmazott módszere diazotált aromás aminokkal való kapcsoláson alapul. Bár — amint az a 10/9. táblázat adataiból látható — ennek az általános módszernek érzékenysége az alkalmazott aromás amin minőségétől függetlenül elmarad a kénsavas reagensekkel

elérhető érzékenység mögött, számos gyakorlati célra ez az érzékenység is kielégítő. Előnyös tulajdonságuk ezeknek a módszereknek a nagyfokú szelektivitásuk.

Kortikoszteroidok fotometriás meghatározását általában a 17-es oldalláncra alapozzák. Bár ezek a szteroidok minden esetben tartalmaznak Δ^4-, ill. $\Delta^{1,4}$-3-ketocsoportot is, általában előnyben részesítik az oldalláncra alapozott meghatározást. Ennek az oka az, hogy az oldallánc érzékeny oxidatív és hidrolitikus behatásokkal szemben, s így az oldallánc mérésére alapozott módszerek alkalmasak stabilitási vizsgálatok céljaira is, míg ugyanezt nem lehet elmondani pl. telítetlen 3-as ketoncsoportjuk izonikotinsav-hidrazidos méréséről.

A fentiek alapján az oldallánc mérésére szolgáló számos fotometriás módszer közül azok felelnek meg leginkább a speciális követelményeknek, amelyek az α-hidroxiketon típusú oldallánc redukáló sajátságaira alapulnak. Az oxidálószer erősségétől függően az oldallánc oxidációja különböző reakciótermékeket eredményezhet. A gyógyszer-analitikai gyakorlatban általában nem a 17-karbonsavig vagy 17-ketonig végbemenő oxidatív hasítást használják ki, hanem a 21-aldehiddé való enyhe dehidrogéneződést (10/17 egyenlet).



(10/17)

E szerint a mechanizmus szerint játszódik le a legáltalánosabban alkalmazott tetrazóliumos módszer is [38]. Amint ezt a 7.5. fejezetben részletesebben leírtuk, a meghatározás alapját itt az oxidálószerként használt színtelen tetrazóliumvegyületekből a redukció során keletkező színes formazánok mérése képezi. A gyógyszer-analitikai gyakorlatban egyaránt használják a trifenil-tetrazólium-klorid reagenst és ennek dimer származékát, a tetrazóliumkéket. Amint az a 10/9. táblázat adataiból látható, mindkét reagenssel megfelelő érzékenységgel lehet elvégezni kortikoszteroidok indirekt meghatározását. A trifenil-tetrazólium-kloridos módszer hátránya, a reagens oxigénérzékenysége, ami miatt a reakciót nitrogénatmoszférában hajtják végre. Ez nem áll fenn a tetrazóliumkék reagenssel, erős fényérzékenysége miatt viszont ennek a reagensnek a használata esetén a reakciót fénytől elzárva kell lefuttatni [58]. A két reagens előnyei és hátrányai egyensúlyban vannak: így mindkettő meglehetősen széles körben elterjedt kortikoszteroid alapanyagok és gyógyszerkészítmények vizsgálatára [11, 15, 58, 84], stabilitási vizsgálatokra [20, 45, 51] még a gyógyszerkönyvi analízisben is. A Brit Gyógyszerkönyvek hagyományosan a trifenil-tetrazólium-klorid [12c, 12d stb.], az amerikaiak pedig a tetrazóliumkék reagenst használják [76r, 76s stb.] kortikoszteroid alapanyagok és a legkülönbözőbb készítményeik vizsgálatánál.

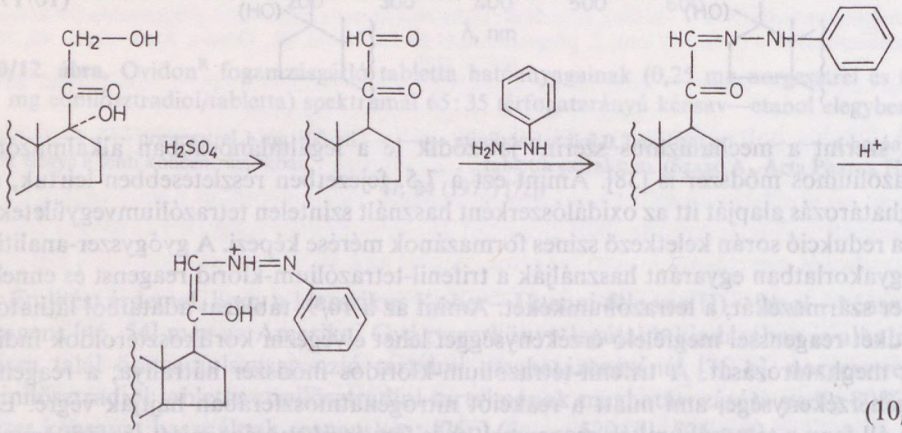
A mérés alapjául szolgáló szín kifejlődése szobahőmérsékleten 60—90 perc alatt megy végbe. Mivel a reakció elsőrendű a kortikoszteroidra nézve [44], a kezdeti szakaszon a reakciósebesség lineáris függvénye a kortikoszteroid-koncentrációnak. Így a reakciót küvettában futtatva, a vizsgálati idő 30—90 másodpercre csökkenthető, s ezt ki is használták különböző kortikoid készítmények hatóanyag-tartalmának

meghatározására [56, 64]. A reakció sebessége természetesen a hőmérséklet mérsékelt emelésével növelhető: ezt használják ki a módszer automatizált változatainál [8, 10, 13, 59].

A módszer nem szelektív a szabad 21-hidroxil-csoportot tartalmazó származékokra: 21-karbonsav-észterek — ha kisebb sebességgel is — adják a reakciót, mivel a reakció erősen lúgos oldatban játszódik le, ahol az észter hidrolízise is lejátszódik; (21-foszfátokat viszont előzetesen enzimesen hidrolizálni kell [8, 76, 83]). Ez utóbbiak szabad foszfát szennyezését a molibdénkék reakcióval határozzák meg [76e].

Ami viszont a 17-es hidroxilcsoport jelenlétét illeti, látható a (10/18) egyenletben, hogy ez nem feltétlenül szükséges a reakció lejátszódásához; így a tetrazóliumos módszerek a 17-es hidroxilt tartalmazó glukokortikoidok, ill. nem tartalmazó mineralokortikoidok meghatározására egyaránt alkalmasak.

Glukokortikoidok meghatározásának szelektív módszere a Porter—Silber-módszer [66], amit elsősorban a biológiai-klinikai analízisben alkalmaznak. A reagens itt fenil-hidrazin erősen kénsavas oldata. A reakció első lépése itt is a 21-es hidroxil oxidációja aldehiddé, ez azonban itt savkatalizálta intramolekuláris oxido-redukciós folyamatban a 17-es hidroxilcsoport rovására megy végbe. A kialakult 21-aldehid-csoport kondenzál a fenil-hidrazinnal, s az erősen savas közegben 410 nm-nél intenzív sávval rendelkező enol-fenil-hidrazonium kation alakul ki.



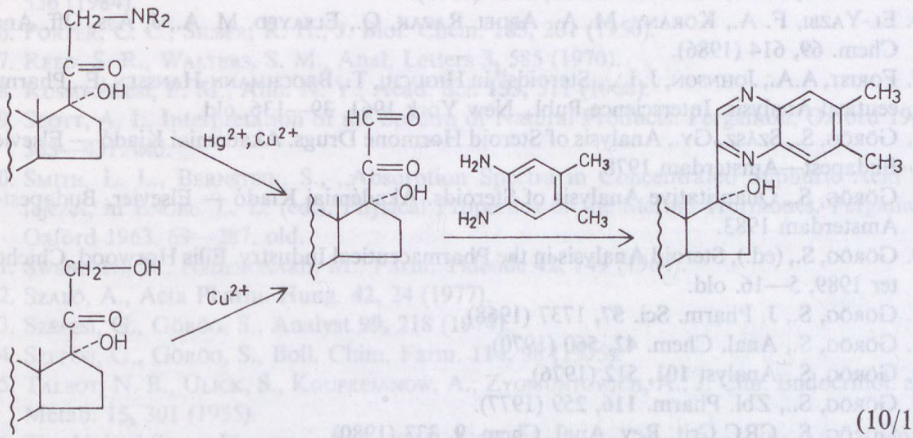
(10/18)

A módszert újabban sikerrel alkalmazták prednizolon tabletta kioldódási vizsgálatainál [18], (lásd 10/9. táblázat), sőt hidrokortizon-nátrium-foszfát injekció gyógyszerkönyvi vizsgálatánál is [76t].

Kevésbé drasztikus körülmények között (kénsav nélkül) végezve a kondenzációt, kortikoszteroidok 20-as (esetleg 11-es) ketonja reagál. Az így képződő fenil-hidrazonok jóddal, ill. klóranillal képezett töltésátviteli komplexei is alapját képezik szelektív spektrofotometriás módszereknek [4].

A 21-es alkoholcsoport réz(II)-acetáttal is aldehiddé oxidálható. Amint az a 10/9. táblázat utolsó példáiból látható, a kialakuló 20-keto-21-aldehid rendszer különböző amin típusú reagensekkel szelektív meghatározásukat lehetővé tevő származékokká kondenzálható [14, 40, 41, 74, 78]. A reakciók közül kiemeljük a 21-hidroxi-vegyületek szelektív meghatározását lehetővé tevő réz(II)-acetát—4,5-dimetil-*o*-fenilén-

-diaminos módszert kortikoidok kinoxalinszármazék alakban való mérésére [40, 74]. Ezzel kapcsolatban megjegyezzük, hogy ha oxidálószerként higany(II)-kloridot használunk, mód nyílik 21-amino-kortikoszteroidok szelektív meghatározására a 4,5-dimetil-*o*-fenilén-diaminos kondenzáció után, a 21-hidroxi-származékok ui. nem oxidálhatók higany(II)-kloriddal [41, 74].



(10/19)

Irodalom

1. Agbaba, D., Zivanov-Stakic, D., Vladimirov, S., Zubac, K., Acta Pol. Pharm. Drug. Res. **47,** 15 (1990).
2. Amer, M. M., Hassan, S. M., Mostafa, A. A., Pharmazie **33,** 344 (1978).
3. Angermann, B., Sonderdruck Nr. 952, Technicon Symposium, 1971.
4. Ayad, M. M., Belal, S., El Adl, S. M., Al Kheir, A. A., Analyst **108,** 1417 (1984).
5. Bartos, J., Pesez, M., Colorimetric and Fluorimetric Analysis of Steroids. Academic Press, London 1976.
6. Bastow, R. A., J. Pharm. Pharmac. **19,** 41 (1967).
7. Belal, S., El Kheir, A. A., Ayad, M. M., Al Adl, S. A., Analyst **111,** 1039 (1986).
8. Beyer, W. F., J. Pharm. Sci. **55,** 200 (1966).
9. Beyer, W. F., J. Pharm. Sci. **57,** 1415 (1968).
10. Beyer, W. F., Smith, E. W., J. Pharm. Sci. **59,** 248 (1970).
11. Bracey, A., Garrett, L., Weiss, P. J., J. Pharm. Sci. **55,** 1113 (1966).
12. British Pharmacopoeia 1988, Her Majesty's Stationery Office, London, 1988. a. 372; b. 355; c. 73; d. 290.
13. Brower, J. F., J. Ass. Off. Anal. Chem. **60,** 27 (1977).
14. Bundgaard, H., Arch. Pharm. Chem. Sci. Ed. **6,** 127 (1978).
15. Callahan, J. J., Litterio, F., Britt, E., Rosen, B. D., Owens, J., Pharm. Sci. **51,** 333 (1962).
16. Cavina, G., Cingolani, E., Amormino, V., Giraldez, H., Farmaco, Ed. Pr. **17,** 393 (1962).
17. Cavrini, V., Di Pietra, M., Raggi, M., A., Maioli, M. G., Analyst **112,** 1671 (1987).
18. Chong Kwan, L., Schott, H., J. Pharm. Sci. **73,** 157 (1984).
19. Coda, L., Timallo, L., Boll. Chim. Pharm. **115,** 515 (1976).
20. Comer, J. P., Hartsaw, P. E., J. Pharm. Sci. **54,** 524 (1965).

21. Corti, P., Lencioni, E., Sciarra, G. F., Boll. Chim. Farm. **122,** 281 (1983).
22. Dorfman, L., Chem. Rev. **53,** 47 (1953).
23. Dusza, J. P., Heller, M., Bernstein, S., „Ultraviolet Absorption" in Engel, L. L. (ed.): Physical Properties of the Steroid Hormones. Pergamon, Oxford 1963, 69—287. old.
24. Eldawy, M. A., Tawfik, A. S., Elshabouri, S. R., J. Pharm. Sci. **64,** 1221 (1975).
25. El-Yazbi, F. A., Anal. Letters **18,** 2127 (1985).
26. El-Yazbi, F. A., Korany, M. A., Abdel Razak, O., Elsayed, M. A., J. Ass. Off. Anal. Chem. **69,** 614 (1986).
27. Forist, A.A., Johnson, J. L., „Steroids" in Higuchi, T., Brochmann-Hanssen, E., Pharmaceutical Analysis. Interscience Publ., New York 1961, 39—136. old.
28. Görög, S., Szász, Gy., Analysis of Steroid Hormone Drugs. Akadémiai Kiadó — Elsevier, Budapest—Amsterdam 1978.
29. Görög, S., Quantitative Analysis of Steroids. Akadémiai Kiadó — Elsevier, Budapest—Amsterdam 1983.
30. Görög, S., (ed.), Steroid Analysis in the Pharmaceutical Industry. Ellis Horwood, Chichester 1989, 5—16. old.
31. Görög, S., J. Pharm. Sci. **57,** 1737 (1968).
32. Görög, S., Anal. Chem. **42,** 560 (1970).
33. Görög, S., Analyst **101,** 512 (1976).
34. Görög, S.., Zbl. Pharm. **116,** 259 (1977).
35. Görög, S., CRC Crit. Rev. Anal. Chem. **9,** 333 (1980).
36. Görög, S., Z. Anal. Chem. **309,** 97 (1981).
37. Görög, S., Csizér, É., Acta Chim. Hung. **65,** 41 (1970).
38. Görög, S., Horváth, P., Analyst **103,** 346 (1978).
39. Görög, S., Rényei, M., Herényi, B., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 1527 (1989)
40. Görög, S., Szepesi, G., Anal. Chem. **44,** 1079 (1972).
41. Görög, S., Szepesi, G., Analyst **97,** 519 (1972).
42. Görög, S., Tuba, Z., Analyst **97,** 523 (1972).
43. Graham, J. H., J. Ass. Off. Anal. Chem. **58,** 202 (1975).
44. Graham, R. E., Biehl, E. R., Kenner, C. T., J. Pharm. Sci. **65,** 1048 (1976).
45. Graham, R. E., Williams, P. E., Kenner, C. T., J. Pharm. Sci. **59,** 1472, 1552 (1970).
46. Haenni, E. O., J. Am. Pharm. Ass., Sci. Ed. **39,** 544 (1950).
47. Hassan, S. S. M., Abdel Fattah, M. M., Zaki, M. T. M. Z., Z. Anal. Chem. **281,** 371 (1976).
48. Heyde, R., Schwalbe, R., Illig, G., Pharmazie **45,** 860 (1990).
49. Ittrich, G., Z. Physiol. Chem. **312,** 1 (1958).
50. Ittrich, G., Acta Endrocrinol. **35,** 34 (1960).
51. Jakovljevic, I. M., Hartsaw, P. E., Drummond, G. E., J. Pharm. Sci. **54,** 1771 (1965).
52. Jayle, M.. F. (ed.), Analyse des Steroides Hormonaux. Masson, Paris 1962.
53. Johnson, C. A., King, R., Vickers, C., Analyst **85,** 714 (1960).
54. Kober, S., Biochem. Z., **239,** 209 (1931).
55. Korany, M. A., El-Yazbi, F. A., Abdel-Razak, O., Elsayed, M., Pharm. Weekblad, Sci. Ed. **7,** 163 (1985).
56. Koupparis, M. A., Walczak, K. M., Malmstadt, H. V., J. Pharm. Sci. **68,** 1479 (1979).
57. Krácmar, J., Krácmarová, J., Bokovikova, T. N., Ciciro, V. E., Nesterova, G. A., Suranova, A. V., Trius, N. V., Pharmazie **46,** 253 (1991).
58. Kunze, F. M., Davis, S. J., Pharm. Sci. **53,** 1170, 1259 (1964).
59. Landis, J. B., Anal. Chim. Acta **114,** 155 (1980).
60. Legrand, M., Delaroff, V., Smolik, R., J. Pharm. Pharmac. **10,** 683 (1958).

61. Neudert, W., Röpke, H., Atlas of Steroid Spectra. Springer, Berlin 1965.
62. Novakovic, J., Nemcová, I., Pharmazie **45,** 439 (1990).
63. Nowakowska, Z., Farm. Pol. **45,** 454 (1989).
64. Oteiza, R. M., Krottinger, D. L., McCracken, M. S., Malmstadt, H. V., Anal. Chem. **49,** 1586 (1977).
65. Parmentier, A., Barthélémy, J.-F., Andermann, G., Labo-Pharma—Probl. Techn. **32,** 536 (1984).
66. Porter, C. C., Silber, R. H., J. Biol. Chem. **185,** 201 (1950).
67. Reed, S. R., Walters, S. M., Anal. Letters **3,** 585 (1970).
68. Russo-Alesi, F. M., Ann. N. Y., Acad. Sci. **153,** 511 (1968).
69. Scott, A. I., Interpretation of the Spectra of Natural Products. Pergamon, Oxford 1964, 363—431. old.
70. Smith, L. L., Bernstein, S., „Absorption Spectra in Concentrated Suphuric Acid" c. fejezet, in Engel. L. L. (ed.), Physical Properties of the Steroid Hormones. Pergamon, Oxford 1963, 69—287. old.
71. Swendsen, R., Nedergaard, M., Farm. Tidende **42,** 749 (1964).
72. Szabó, A., Acta Pharm. Hung. **42,** 24 (1977).
73. Szepesi, G., Görög, S., Analyst **99,** 218 (1974).
74. Szepesi, G., Görög, S., Boll. Chim. Farm. **114,** 98 (1975).
75. Talbot, N. B., Ulick, S., Koupreianow, A., Zygmuntowich, A., J. Clin. Endocrinol. and Metab. **15,** 301 (1955).
76. The United States Pharmacopoeia XXII, USP Convention Inc., Rockville, Md., 1990. a. 1545; b. 1132; c. 915; d. 1326; e. 164; f. 880; g. 534; h. 379; i. 993; j. 487; k. 964; l. 1328; m. 547; n. 834; o. 531; p. 965; r. 1532; s. 1545; t. 658—659.
77. Thornton, L. K., FDA Drug Autoanalysis Manual, Method Nr. 22 (1972).
78. Tokunaga, H., Kimura, T., Kawamura, J., Bunseki Kagaku **25,** 392 (1976); **26,** 154 (1977).
79. Tokunaga, H., Tanno, M., Kimura, T., Chem. Pharm. Bull. **35,** 1118 (1987).
80. Tsilifonis, D. C., Chafetz, L., J. Pharm. Sci. **56,** 625 (1967).
81. Umberger, E. J., Anal. Chem. **27,** 768 (1955).
82. Urbányi, T., Mollica, J. A., J. Pharm. Sci. **57,** 1257 (1968).
83. Van Dame, H. C., J. Ass. Off. Anal. Chem. **57,** 731 (1974).
84. Veeman, G. E., Pharm. Weekblad **116,** 109 (1981).
85. Walash, M. I., Rizk, M., Zakhari, N. A., Toubar, S., „Colorimetric Determination of 17-Ethinyl Steroids", in Görög, S. (ed.) Advances in Steroid Analysis '84, Akadémiai Kiadó (Budapest) — Elsevier (Amsterdam) 1985, 563. old.
86. Walash, M. I., Zakhari, N. A., Rizk, M., Touber, S., Farmaco, Ed. Prat. **42,** 81 (1987).
87. Woodson, A. L., J. Pharm. Sci. **60,** 1538 (1971).
88. Wu, J. Y. P., J. Ass. Off. Anal. Chem. **53,** 831 (1970); **54,** 617 (1971); **60,** 922 (1977).
89. Wu, J. Y. P., J. Ass. Off. Anal. Chem. **57,** 747 (1974); **58,** 75 (1975).
90. Zimmermann, W., Chemische Bestimmungsmethoden von Steroidhormonen in Körperflüssigkeiten. Springer, Berlin 1955, 53—57, 63—75. old.
91. Zivanov-Stakic, D., Milosevic, Lj., Agbaba, D., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 1983 (1989).

10.14. Antibiotikumok

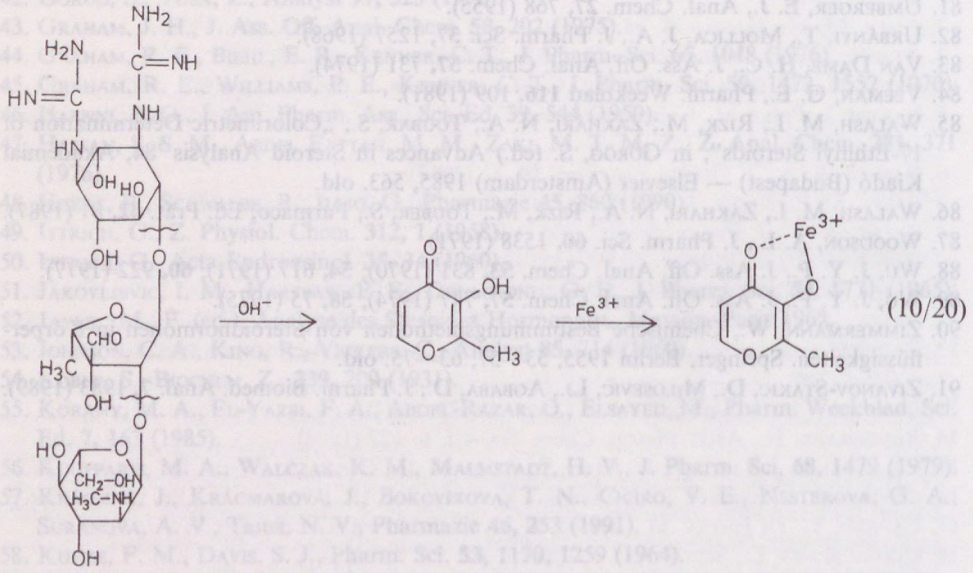
Az antibiotikumok spektrofotometriás meghatározásait több összefoglaló munka részletesen tárgyalja [15, 266,267]. E fejezet keretében a gyógyászatilag legfontosabb antibiotikumokról nyújtunk áttekintést a Bérdy-féle rendszer alapján [23].

10.14.1. Szénhidrát antibiotikumok

Aminoglikozidok

A csoport legfontosabb képviselői: a sztreptomicinek, neomicinek, kanamicinek, tobramicin, gentamicinek. Jellemző UV abszorpciójuk az analitikailag hasznos 200 nm feletti tartományban nincs. Meghatározásukat elsősorban színreakciók alapján végzik.

Wahbi és munkatársai [260] a dihidro-sztreptomicint 0,1 M kénsavval, a sztreptomicint pedig 0,5 M nátrium-hidroxiddal való főzéssel alakítják át spektrofotometriásan aktív vegyületekké, és ezeket az ortogonális polinomok módszerével mérik. Ugyancsak lúgos hidrolízissel kezdődik a klasszikus „maltol reakció" [69] sztreptomicin meghatározására. Amint az a (10/20) reakciósémán látható, a reakcióban a sztreptóz rész alakul át a lúgos hidrolízis során maltollá, ami kénsavas átsavanyítás után vas(III)ionokkal 525 nm-nél mérhető ibolya színű vas(III)komplexszé alakul át. Ezen a reakción alapul a brit gyógyszerkönyv módszere sztreptomicin meghatározására [36a].



sztreptomicin A

(10/20)

Sztreptomicin guanidinocsoportja a módosított Sakaguchi-reakcióval határozható meg (oxidatív kondenzáció α-naftollal vörös színeződék képződése közben) [163].

Ugyancsak oxidáción és azt követő színreakción alapulnak Duda [67] tiobarbitursav reagenst, Sastry és munkatársai [64] brucin reagenst alkalmazó módszerei, vagy a fel nem használt oxidálószer (jód) feleslegét metollal és szulfanil-amiddal mérik [222]. Utóbbi két eljárást alkalmasnak találták tetraciklinek, kloramfenikol [64], penicillinek, cefalosporinok és grizeofulvin [222] meghatározására is. A molekula erősen bázisos csoportjai vesznek részt a tropeolin 000-val kialakuló színes ionpárban [22]. Ezt és a Pr(III)ionnal és ftalexon S-sel [8], valamint az Al(III)ionnal és katechinibolyával [9] képződő vegyes ligandumkomplexeket is felhasználták analitikai mérésre.

Mori és munkatársai [80, 82, 158] azon az alapon mértek aminoglikozid antibiotikumokat, hogy az *o*-hidroxi-hidrokinon-ftalein és fémionok között képződő komplex spektrumában az antibiotikum jelenléte az abszorpciós maximumot a hosszabb hullámhosszak irányába eltolja, és az abszorbancia az antibiotikum koncentrációjával arányos. Sztreptomicint az *o*-hidroxi-hidrokinon-ftalein Mn(II)- [80], neomicint, tobramicint és gentamicint az U(VI)-komplex [82, 158] felhasználásával határoztak meg.

A neomicinek spektrofotometriás meghatározásait Heyes [90] foglalta össze. Ninhidrinnel pH = 5—8-nál az aminoglikozidok — köztük a neomicinek — mérhetők [14, 41, 189]. A savas hidrolízis után képződő ribóz orcinos vas(III)-kloriddal [115] és floroglucinnal [92] reagál. Agrawal és munkatársai [5] a neomicin réz(II)-tartaráttal képzett 1 : 1 összetételű komplexét használták fel meghatározásra.

Doulakas [66] a lúgos oldatban nátrium-hipobromitos oxidáció után képződő aldehidet floroglucinnal reagáltatta. Csiba [53] és Das Gupta [57] a Hantzsch-reakciót (dihidro-lutidin-származékok képződése) használta fel. Rizk és Younis [202] klóranillal reagáltatta a neomicin B-t, a kanamicint, a tobramicint és az amikacint. Marques és munkatársai [136] neomicint, Ryan [207] kanamicint, tobramicint, amikacint és gentamicint mértek 2,4-dinitro-fluor-benzollal.

A már említett [9, 53, 57] és az általános, aminoglikozidok mérésére alkalmas ninhidrines [12] és orcinos [31] reakciókon kívül Yassa és Gad ElRub [268], valamint Bonchev és munkatársai [30] a kanamicin, apramicin, tobramicin és brómtimolkék között pH = 6—6,5-nél létrejövő, kloroformba extrahálható ionpárok képződését használták fel mérésre.

Das Gupta [56] lúgos oldatban, réz(II)-szulfát reagenssel mérte injekciós preparátumokban a tobramicint; a szokásosan használt segédanyagok nem zavartak. Tobramicin primer aminocsoportjai az aminosavak körében általánosan használt reagensekkel, mint *o*-ftálaldehid, danzil-klorid és fluoreszkamin is átalakíthatók spektrofotometriásan mérhető származékokká [216].

Gentamicint réz(II)sókkal végrehajtott reakció [246] mellett dihidro-lutidin-származék formájában is mérték [172]. Ez utóbbi antibiotikum analitikájában említést érdemel még gentamicin C három komponensének denzitometriás meghatározása ninhidrines előhívás után Török és Paál módszerével [248].

Higromicin B-t Bashkovich és munkatársai kénsavas főzés után UV abszorpció alapján (282 nm), kénsavas antronnal történő reakcióval [19], illetve brómtimolkékkel képződő ionpáron keresztül [20] határoztak meg.

Más glikozidok

Vankomicint Fooks és munkatársai [77] Folin—Ciocalteu-reagenssel mértek, mely fenolos vegyületek jelenlétében is szelektívnek bizonyult.

Különféle cukorszármazékok

Linkomicint kénsavas hidrolízis után 5,5′-ditio-bisz(2-nitro-benzoesavval) [188], linkomicint és klindamicint savas hidrolízissel [21] vagy savas hidrolízis után karbazollal, antronnal, 1-naftollal végbemenő reakció [32] alapján határoztak meg. Egutkin és munkatársai [68] linkomicin-hidroklorid vizes oldatát palládium-klorid 1 M-os sósavas oldatával reagáltatták és a képződött komplex fényelnyelését mérték. A módszert fermentlé vizsgálatára is alkalmazták.

10.14.2. Makrociklusos laktám antibiotikumok

Makrolidok

A csoport legfontosabb képviselői az eritromicinek. Ezek spektrofotometriásan inaktívak: spektrumuk mindössze a keton-karbonil-csoportra jellemző gyenge n-π^* sávot tartalmazza 289 nm-nél. Eritromicint először Ford és munkatársai [79] határoztak meg 13,5 M-os kénsavval adott sárga színreakciója alapján. Lúgos hidrolízis után az eritromicin 236 nm-en mérhető termékké alakul. A módszer gyógyszerkönyvi alkalmazásra is talált: így végzik eritromicin tabletta kioldódási vizsgálatát [247a]. Kidolgozták a módszer módosítását is: a ciklikus eritromicin-karbonát esetében a hidrolízist pH = 6,8-as pufferrel végezték [112]. Perlman [181, 182] az eritromicineket savas hidrolízis után Nelson-reagenssel reagáltatta.

Több szerző az eritromicinek és különböző aldehidek között végbemenő, Schiff-bázist eredményező színreakciót használta fel mérésre [10, 219, 220].

Az eritromicinek meghatározott pH-értéken savas színezékekkel kloroformba extrahálható színes ionpárokat képeznek, s ezek készítményei esetében is alkalmasak meghatározásra. A színezékek közül leggyakrabban a metilnarancsot, a tropeolin 00-t [96, 238], a brómtimolkéket [233, 234, 238], a brómfenolkéket [200, 233, 238], a brómkrezolzöldet [233], a brómkrezolbíbort [55, 247a] és az eriokrómfeketét [218, 242] használják.

Az oleandomicin spektrális és kémiai sajátságai hasonlók az eritromicinéihez. Az oleandomicin és a troleandomicin reagál metilnaranccsal [96, 111] és brómtimolkékkel [236]. Vízmentes ecetsavban xanthidrollal színreakciót ad [169]. Savas kezelés és ezt követő lúgos hidrolízis után 236 nm-en jól mérhető abszorpciós maximum alakul ki, a reakciót az eritromicin nem zavarja [45].

A tilozin típusú antibiotikumok jellemző kromofor csoportja: —C=C—(CH_3)—C=C—C=O, az abszorpciós maximum 278—283 nm-nél van, ennek alapján spektrofotometriásan mérhetők [205].

A 17—18 tagú gyűrűt tartalmazó (ansa) makrolidok közé tartoznak a rifamicinek. Jellegzetes UV és látható spektrumuk van, mely a szubsztituált aromás vagy kinoidális kromofor csoportokból ered. A spektrum pH-függő. A különféle rifamicinek kromofor csoportjairól, az abszorpciós maximumokról (220—240, 290—330, 410—450 nm) jó áttekintést ad Rizk és munkatársai [203] munkája. Több direkt, differencia-spektrofotometriás [43, 176, 177, 206] és színreakción alapuló [24, 197, 221] módszer ismert. A hosszúhullámú maximumban való mérés az alapja gyógyszerkönyvi meghatározásuknak kapszulában [36b, 247b] és szuszpenzióban [36c]. Patel és munkatársai [179] a hidrazonképződést, Bergisadi [24] a metilénkékkel képződő ionpárt, Sastry és munkatársai a cirkónium(IV)-, lantán(III)-, nikkel(II)-, cérium(III)-, tórium (IV)- és uranilionokkal [221] történő komplexképződést, Rao és munkatársai [197] pedig a 3,5-diklór-benzokinon-klóriminnel adott színreakciót használták mérésre.

Polién makrolidok

A makrociklusos laktámgyűrű 4—7 konjugált kettős kötést tartalmaz, és a gyűrűhöz szubsztituensként alkil-, alkilén-, hidroxi-, karbonil-, karboxilcsoportok stb. kapcsolódhatnak. A molekula kromofor csoportjainak összetétele alapján megkülönböztetünk tetra-, penta-, hexa és heptaéneket. A polién eknek az UV tartományban általában három abszorpciós sávjuk van. Nayler és Whiting [165] a polién ek moláris abszorpciós koefficiensének számítására empirikus formulát közöltek.

A tetraének gyógyászatilag legfontosabb képviselője a nisztatin. Ennek 291, 305 és 319 nm-en van analitikai méréseket lehetővé tevő abszorpciós maximuma [25, 27, 247c]. A bomlástermékek melletti meghatározásra beváltak az ortogonális függvényt [11, 15, 128] és a spektrum első deriváltját [50] felhasználó eljárások. Ezek némelyike [128] amfotericin B és grizeofulvin mérésére is alkalmas.

Ochab [168] dimetil-formamidban alumínium(III)-kloriddal való főzés után, Amer és Habeeb [10] hidrolízist követő 4-amino-acetofenonnal végbemenő reakcióval, Chowdhury és munkatársai [47] a Lowry-módszer módosításával és vas(III)-klorid—kénsav reagenssel [48] mérték a nisztatint. Sergeev és munkatársai [228] a $HCrO_4^-$ jelenlétében Basic Violet 3 színezékkel képződő ionasszociátumot használták mérésre.

Wahbi és munkatársai [258] az amfotericin B-ben szennyezőként jelenlevő tetraéneket (amfotericin A, nisztatin) a Fourier-függvény koefficiens/ortogonális függvény koefficiens arány alapján mérték dimetil-szulfoxid—metanol oldatban 264 és 294 nm között. A módszer igen egyszerű, gyors és pontos. Ugyanerre a célra a gyógyszerkönyvek [36d, 247d] 282 és 304 nm-nél végzett mérést és egyenletrendszerrel való számolást írnak elő.

Rao és Rao [198] tablettákból az amfotericin B-t dimetil-szulfoxid—metanolos kioldás és triklór-ecetsavas reakció után 430 nm-en mérték. Biológiai mintákban való meghatározására alkalmas saját spektruma is: szérumban való mérését a 408 nm-es maximumban való mérés [229], szövetmintákban való meghatározását pedig a negyedik derivált spektrum alapján [42] végezték el.

10.14.3. Kinon antibiotikumok

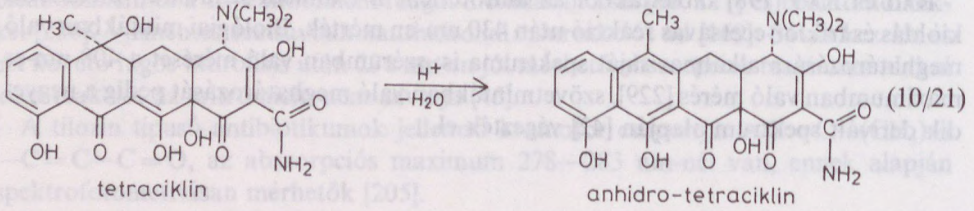
Lineárisan kondenzált policiklikus vegyületek

A csoport legfontosabb képviselői a tetraciklinek és antraciklinek (daunomicin, adriamicin). A tetraciklinek naftacénvázat tartalmazó, amfoter sajátságú vegyületek. A molekulában két különálló kromofor egység található. Savas oldatban (pH 2) 260—280 és 350—380 nm-en van abszorpciós maximumuk. Ezek intenzitása elég magas ahhoz, hogy széles körben fel lehessen használni kvantitatív meghatározásukra. Oxitetraciklin esetében pl. $\varepsilon_{269} = 19\,900$ és $\varepsilon_{352} = 13\,500$. Az utóbbi hullámhosszon való mérés részét képezi az USP XXII vizsgálati előírásának, és felhasználják oxitetraciklin tabletták kioldódási vizsgálatainál is [247e]. Doxiciklin kapszula kioldódási vizsgálata során a 345 nm-nél megjelenő maximumban mérnek [247f]. Tetraciklinek főbb bomlási irányai közül az epimerizáció a fenti két abszorpciós sáv közül az elsőt, míg az anhidro-tetraciklinné történő dehidratálódás mindkét sávot érinti [142, 240]. Ez utóbbi 430 nm-nél mérhető [63].

Pernarowski és munkatársai [183] az abszorpcióarányok alapján, Regosz és Zuk [201] abszorpciókülönbségek alapján határoztak meg tetraciklint a bomlástermékek jelenlétében. A Pernarowski-módszert oxitetraciklin esetében is használták [98]. Hrdy és Beyrodtova [94] az anhidroszármazékokat kloroformos extrakció után mérte.

A derivatív spektrofotometria természetesen a tetraciklinek saját fényelnyelésre alapozott spektrofotometriás meghatározásának lehetőségeit is messzemenően kiterjesztette. A módszer már a kvalitatív analízisben is jól használható: az egymástól alig megkülönböztethető spektrummal rendelkező származékok második derivált spektrumában számottevő különbségek mutatkoznak [91]. Wahbi és munkatársai [259] a pH hatását vizsgálták a tetraciklin és oxitetraciklin első derivált spektrumára, és ennek alapján dolgoztak ki meghatározást. Tetraciklin alapanyagban és tetraciklint tartalmazó készítményekben az anhidro-tetraciklint és 4-epianhidro-tetraciklint együttesen az első derivált spektrum [261] és az első derivált spektrofotometriát alkalmazó kompenzációs technikával mérték 0,01 M-os sósavas oldatban 460 nm-en [257]. Ugyanerre a célra Vetuschi és Ragno [255] etanolos, ill. dioxános közegben a harmadik és negyedik derivált spektrumokat használta. Salinas és munkatársai [215] pH = 3,8-nál oxitetraciklint és doxiciklint mértek az első derivált spektrum alapján különböző gyógyszerkészítményekből és vizeletből.

Amint azt már említettük, sav katalízis hatására a tetraciklinek anhidroszármazékká alakulnak (lásd 10/21 reakcióegyenlet). Ez a 430 nm-nél mérhető bomlástermék tetraciklinek mérésére is alkalmas, ha a dehidratálási reakciót teljessé tesszük. Ezt elsőként Levine [124] írta le klórtetraciklinre. A módszert még ma is használják [71].



tetraciklin — anhidro-tetraciklin (10/21)

Chiccarelli [46] a 6-demetil-tetraciklint határozta meg klórtetraciklinben salétromsavas melegítés, majd butanolos extrakció után. Monastero és munkatársai [145] lúgos kezelés után, 440 nm-en mérték az oxitetraciklint.

A tetraciklinek meghatározására sokféle színreakció ismert, ezek között fontos helyet foglalnak el a komplexképződési reakciók.

Weygand és Csendes [265] klórtetraciklint és oxitetraciklint reagáltattak titán(III)-kloriddal. Oxford [171] a klórtetraciklin több fémkomplexét vizsgálta, és a kalcium- és kobalt(III)komplexeket találta mérésre alkalmasnak. Sakaguchi és munkatársai [97, 212, 213, 214] a tetraciklinek magnézium-, kobalt(III)-, réz(II)-, uranil-, cirkónium- és tórium(IV)komplexeit tanulmányozták. A Sakaguchi-féle reakciókat több készítmény tetraciklintartalmának mérésére használják [129, 187]. Agrawal és Patel [6] oranzsvörös—U(VI)—tetraciklin komplexek képződését használták ki tabletták, kapszulák, injekciók, cseppek, kenőcsök tetraciklintartalmának mérésére. Lúgos oldatban az oxitetraciklin [105] és a klórtetraciklin [120, 121] 1 : 1 arányú komplexet képeznek cérium(III)sókkal, mely meghatározásukra alkalmas. Savas oldatban a tetraciklin vas(III)ionokkal is komplexet képez, s ez mérésére felhasználható. Az oxitetraciklin vas(III)- és réz(II)komplexeit, a spektrofotometriás mérés körülményeit Amer és munkatársai [89] vizsgálták részletesen. A vas(III)ionokkal savas közegben képződő és 435 nm-nél abszorpciós maximummal rendelkező komplex spektrofotometriás mérésére alapozva Alwarthan és munkatársai [7] FIA módszert is leírtak oxitetraciklin meghatározására (lásd 9.10. fejezet). Lúgos oldatban réz(II)-kloriddal adott reakció alapján Saha [209] mért tetraciklint kapszulákból, tablettákból, kenőcsökből, injekciókból és szirupokból. Veselinovic és Jelikic-Stankov [107, 254], valamint Rao és munkatársai [194] tetraciklint és oxitetraciklint preparátumokból volframátionokkal képzett komplexeik alapján mértek.

Hidrolízis után a fenolos hidroxilcsoport arzén-molibdáttal [181, 182], foszfor-molibdénsavval [199] és ammónium-, ill. nátrium-molibdáttal [110] reagál. E módszerek közül az utóbbi használata terjedt el a gyakorlatban [108, 157, 243].

A kondenzációs reakciók közül a diazotált szulfanil-amiddal [87] és a kálium-ferri-cianid jelenlétében 4-amino-antipirinnel [17] végbemenő reakciókat kell megemlítenünk.

Krasnov és Fominykh [118] a tetraciklint lúgos oldatban hidroxil-aminnal reagáltatták, a keletkező hidroxámsav vas(III)komplexe spektrofotometriásan mérhető. Mikromennyiségű tetraciklin meghatározására alkalmas az a tény, hogy a molibdén(VI)ionok katalizálják az Azorubin S hidrogén-peroxidos oxidációját, és ezt a reakciót a tetraciklinek gátolják [224]. Ottis és Malat [170] a dioktil-szulfoborostyánkősavval pH = 2,1-nél kialakuló ionpárt használták fel mérésre. Szergejev és munkatársai [228] a kristályibolya $-SbCl_6^-$ ionasszociátum abszorpciócsökkenése alapján határoztak meg tetraciklineket.

Ganescu és munkatársai [83] indirekt titrimetriás és spektrofotometriás meghatározást dolgoztak ki tetraciklinre a tiocianáto-króm(VI)-komplexekkel: $K_3Cr(NCS)_6$, $NH_4[Cr(NCS)_4(anilin)_2]$ és $NH_4[Cr(NCS)_4(morfolin)_2]$ sók képződésére alapozva.

Félszintetikus tetraciklinszármazék a doxiciklin. Néhány színreakciója ismert: Rao és munkatársai [196] a módosított Folin—Ciocalteu-reagenssel, Emmanuel és Naik

nátrium-kobalti-nitrittel [74], 4-amino-antipirinnel és kálium-ferri-cianiddal [75], SANE és munkatársai [217] benzokainnal, szulfanilamiddal és 4-amino-acetofenonnal adott reakciói alapján mérték. JELIKIC-STANKOV és VESELINOVIC [106] molibdátionokkal alkotott komplexe formájában határozták meg.

Minociklint MORI és munkatársai nátrium-lauril-szulfát jelenlétében cirkónium(IV)ionok, *o*-hidroxi-hidrokinon-ftalein és fluoridionokkal adott komplexe [81], valamint a minociklin-eozin-gallium hármas komplex felhasználásával mértek [159].

Az antraciklin-glikozidok közül a daunomicin és adriamicin (doxorubicin) emelhetők ki mint terápiásan fontos rákellenes szerek. Jellegzetes vörös színük az antrakinon szerkezetből következik. A daunomicinnek és adriamicinnek 236, 255, 293, 482 és 498 nm-en van abszorpciós maximuma etanolban [267]. PLUMIER—VANDENBUSSCHE és DRYON [184] lúgos oldatban a daunorubicin réz(II)- és vas(III)sókkal végbemenő reakcióit találták alkalmasnak mérésre. Az adriamicin meghatározási módszereit BOSANQUET [35] foglalta össze.

10.14.4. Aminosav, peptid antibiotikumok

β-Laktám antibiotikumok

A csoport legfontosabb képviselői a különféle természetes és félszintetikus penicillinek és cefalosporinok.

A penicillinek általában nem rendelkeznek intenzív és jellemző UV spektrummal. Ha az acil-amido oldalláncon izolált fenil szubsztituens van, 255 nm környékén jelenik meg gyengébb intenzitású sáv. Ha a szubsztituensben fenol-éter-csoport van, akkor valamivel intenzívebb sávot találunk 270 nm körül. Ennek mérésén alapul pl. az USP XXII módszere fenoximetil-penicillin kapszula vizsgálatára (A_{268}) [247g].

DAVIDSON és STENLAKE [61] ampicillint és kloxacillint 275 nm-en a pH = 5 és pH = 9 értékeken mért abszorpciókülönbségek alapján határoztak meg. (A módszert a 270. oldalon ismertetjük részletesebben.) WAHBI és munkatársai [262] a benzil-penicillint (247—269 nm) és ampicillint (249—271 nm) mérték pH = 7-nél polinomiális koefficiens alapján.

A finomszerkezettel rendelkező gyenge aromás sávok analitikai alkalmazásának lehetőségeit a derivatív spektrofotometria jelentősen megnöveli. Így pl. MURILLO és munkatársai [162] amoxicillin és cefalexin kombináció mindkét komponensének meghatározását írták le második derivált spektrofotometriával. Ugyancsak a második derivált spektrofotometriát alkalmazta MORELLI ampicillin és kloxacillin [152], valamint ampicillin és dikloxacillin [153] keverékeket tartalmazó gyógyszerkészítmények hatóanyag-tartalmának meghatározására. Összetett készítmények hatóanyagtartalmának meghatározásán túlmenően a módszer speciális feladatok megoldását is lehetővé teszi. Így pl. DI GIULIO és munkatársai [62] számos penicillin és cefalosporin származékot határoztak meg liposzóma kapszulákban elválasztás nélkül, opálos oldatban. A meghatározásra használt amplitúdók a következők voltak: ampicillin $^3D_{232,238}$; karbenicillin $^3D_{232,237}$; ceftriaxon $^2D_{255,280}$; cefaloridin $^2D_{273,260}$; cefalexin $^2D_{277,265}$. KOVÁCS-HADADY és munkatársai [117] a fenoximetil-penicillin *p*-hidroxi-

-fenoximetil-penicillin szennyezőjét* mérték pH = 7,2 pufferben a negyedik derivált spektrum segítségével.

Penicillinek mérésére sokféle változatos színreakciót fejlesztettek ki, ezekről azonban e fejezet keretein belül csak vázlatos képet nyújthatunk.

A penicillinek hidroxil-aminnal a β-laktám-gyűrű nyitásával hidroxámsavvá alakulnak, mely vas(III)-sókkal vörös színeződést ad [78]. E reakció az alapja több automatikus penicillinmeghatározásnak [123, 126, 161]. Az USP XXII AutoAnalyzeres módszerének [247h] reagense vas(III)-nitrát, és a mérést 480 nm-nél végzik. Használatos vas(III)-perklorát reagens is [33].

Cressman és munkacsoportja [51, 52, 166] tanulmányozták részletesen a β-laktám antibiotikumok és réz(II)ionok komplexképződési reakcióit. Smith és munkatársai [237] az ampicillint réz(II)nyomok jelenlétében savasan hidrolizálták. A hidrolitikus bomlástermékek réz(II)komplexének mérésén alapuló módszert karbenicillin [113], benzil-penicillin [269], mecillinam [137], pivampicillin [131, 132, 137], amoxicillin [65, 100, 191] és ampicillin [100, 137, 140] mérésére használták. Az ampicillin és réz(II)ionok közötti, lúgos oldatban végbemenő komplexképzést Patel és munkatársai [178] írták le. Rogic és Herak [204] penicillin-szulfoxidokat és azok észtereit mérték pH = 12,3-nél, réz-szulfát jelenlétében. Saha [208] benzil-penicillint határozott meg réz(II)-acetáttal képződő zöld színű komplexe alapján.

Baker [18] módszerének reagense is réz(II)-szulfát. Ez a módszer penicillinekben levő penicillosav szennyezés meghatározására szolgál. Azon alapul, hogy az utóbbi sokkal gyorsabban redukálja a réz(II)iont, mint a bomlatlan penicillinek. A keletkező réz(I)-ionok neokuproin komplex formában mérhetők 450 nm-nél. A módszert felhasználták penicillinek stabilitásvizsgálatában.

Az imidazol – higany(II)-klorid módszert Bundgaard és Ilver [37] írták le, és talán a legszélesebb körben alkalmazott spektrofotometriás eljárás természetes és félszintetikus penicillinek mérésére, mert bomlás- és polimerizációs termékek jelenlétében is használható [38, 39]. Pujol és munkatársai [192] vizsgálatai szerint azlocillin esetében, ha bomlástermékek is vannak jelen, célszerű a penicillint előzetesen vékonyrétegkromatográfiásan elválasztani. Bundgaard és munkatársai a módszert pivampicillin, bacampicillin [40], mecillinam és pivmecillinam [122] mérésére is kidolgozták. Az eljárás a BP-88-ban [36e] is hivatalos. Haginaka és munkatársai [88] a penicillinek és az 1,2,4-triazol és higany(II)-klorid reakcióját használták fel mérésre.

A savas hidrolízis hatására képződő penicillénsav közvetlen spektrofotometriás mérését több szerző használta penicillinek meghatározására [114, 116, 180, 244, 245]. Nunez-Vergara és munkatársai [167] epicillint savas hidrolízis hatására képződő bomlásterméke alapján mértek kapszulákból, plazmából.

A penicillinek savas hidrolízisének terméke 4-dimetil-amino-benzaldehiddel [84, 179] és 4-dimetil-amino-fahéjaldehiddel [195] színreakciót ad. Squella és munkatársai [239] formaldehid—sósavas hidrolízis után mérték kapszulák amoxicillin-tartalmát. Ibrahim és munkatársai [95], valamint Morelli [154] magas hőmérsékleten, erősen savas oldatban ammónium-vanadáttal oxidálták a penicillineket. Morelli és

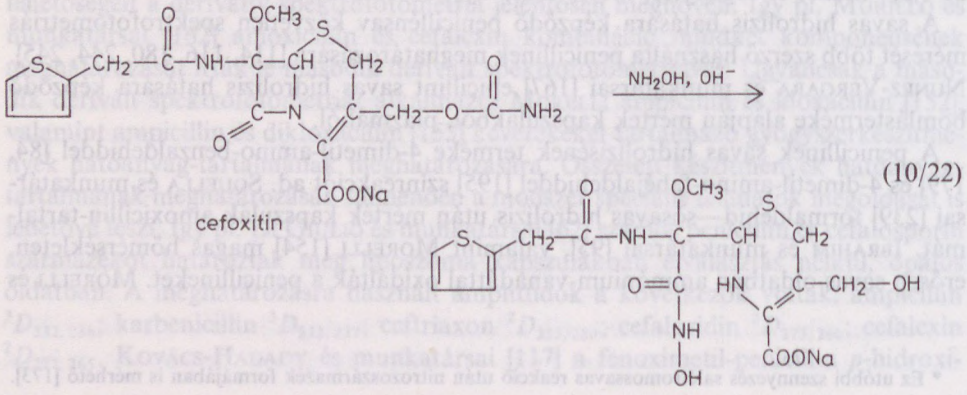
* Ez utóbbi szennyezés salétromossavas reakció után nitrozoszármazék formájában is mérhető [173].

MARIANI [155] kevésbé drasztikus kísérleti körülmények között az ammónium-molibdátot is alkalmasnak találták penicillinek mérésére. ISSOPOULOS [99] a paramolibdát anion molibdénkékké alakulását kihasználva dolgozott ki spektrofotometriás módszert néhány cefalosporin, ampicillin és amoxicillin meghatározására. SAHA és ROAY [210], SINGH és munkatársai [235] kromotropsavas nátriumot, SHINGBAL és munkatársai [230, 232] 1-fluor-2,4-dinitro-benzolt használtak penicillinek mérésére. DAVE és BANERJEE [59, 60] az amoxicillint diazotált primer aromás aminokkal reagáltatták. Legjobb eredményt szulfanilsavval és szulfanilamiddal értek el. A klasszikus módszerek modern alkalmazásai között megemlítjük még a ninhidrines reakció alkalmazását β-laktám antibiotikumok automatikus analízisére [44].

LI és WU [125] a klóranillal adott stabil vörös komplexe alapján mérték a benzilpenicillint, de leírták más töltésátviteli komplex képző reagensek felhasználását is [13]. SASTRY és munkatársai [223] az előzetesen savval hidrolizált penicillineket és cefalosporinokat semleges oldatban klóramin-T jelenlétében hematoxilinnel reagáltatták.

BONCHEV és PAPAZOVA [29] kristályibolyával, NAYAK és munkatársai Azure A-val [164], GOWDA és munkatársai [86] Azure C-vel képződő ionpárokon keresztül határoztak meg különféle penicillineket.

A cefalosporinok, ellentétben a penicillinekkel, 260 nm környékén jellemző, erős abszorpciós sávval rendelkeznek, amelyet azonban meghatározásukra csak ritkán alkalmaznak. Az USP XXII pl. 264 nm-nél méreti cefadroxil abszorbanciáját [247i]. PAPAZOVA és munkatársai [175] a savas hidrolízis során keletkező 2-merkapto-5-metiltiadiazol 320 nm-nél való mérésével határoztak meg cefazolint. WAHBI és UNTERHALT [264] lúgos hidrolízis előtt és után, a 261 nm-en mért abszorpciókülönbség alapján, EL-YAZBI és BARARY [72] a derivált spektrumok felhasználásával határozták meg a cefalexint, cefalotin-nátriumot és cefaridint, lúg hatására képződő bomlástermékeik mellett. MORELLI [147—151] több cefalosporin-származék keverékére (cefacetril-ceftezol, cefoperazon-cefamandol, cefapirin-cefuroxim, cefaloridin-cefalotin) tiszta formában és gyógyszerkészítmények esetében is az első és a második derivált spektrum felhasználásával dolgozott ki mérési módszereket a „zero-crossing" technika alkalmazásával (lásd 4.5.2. fejezet). MARELLI [133] 7-amino-cefalosporánsavat, PAPAZOVA [174] cefalexint, MARINI és DI COCCO [134] cefadroxilt, MAHROUS és ABDEL-KHALEK [130] különféle cefalosporinokat mértek ninhidrinnel.



(10/22)

A penicillinekhez hasonlóan a cefalosporinok β-laktám-gyűrűje is hidroxilamonolízist szenved. Ezt a reakciót cefoxitin példáján mutatjuk be a (10/22) reakcióséman.

A reakció következtében eltűnik a spektrumból a már említett, 266 nm körüli abszorpciós sáv. Erre alapozta differencia-spektrofotometriás módszerét POSPISILOVÁ és KUBES [186]. Ezt a reakciót azonban elsősorban a keletkező hidroxámsav vas(III)-komplexének mérése segítségével hasznosítják. Említést érdemel itt nikkel(II)ionok bevitele a reakcióelegybe; ezek ui. katalizálják a reakciót [141]. A hidroxil-amin—vas(III) módszert (lásd 7.7. fejezet) az USP XXII automatizált változatban használja cefalosporinok mérésére [247h]. További alkalmazásait is [144] leírták cefadroxil [135, 211], cefatriaxon [227], aztreonam [209] és egyéb cefalosporinok [34, 249] mérésére.

BODNÁR és munkatársai [28] imidazollal, MARINI és PASCUCCI [135], valamint SENGUN és FEDEL [225] imidazol-higany(II)-klorid reagenssel, ULAS és SENGUAN [250] módosított higany(II)—imidazol módszerrel határoztak meg cefalosporinokat.

MATOUSOVA és PETERKOVA [139] ammóniás ezüst-szulfáttal cefalexint, CSIBA és CZÉHNÉ [54] dihidro-lutidin-származékok formájában különféle félszintetikus cefalosporinokat mértek. SAKAGUCHI és munkatársai [160] cefalexint és ampicillint azon az alapon határoztak meg, hogy e vegyületek kénatomja csökkenti az *o*-hidroxi-hidrokinonftalein—Pd(II) komplex 630 nm-es maximumban mért abszorbanciáját.

Közöltek még a molibdénkék képződésen alapuló ammónium-molibdát [3, 156], molibdofoszforsav [101, 102] és paramolibdát anion [99, 103] oxidálószert felhasználó módszereket is. ABDEL GAWAD és munkatársai [1] cefadroxilt és cefalexint koncentrált kénsavas oldatban ammónium-vanadáttal mértek.

Megemlítendők még a nitroprusszid-nátriummal [76], nátrium-nitrittel [252, 253], az Ellman-reagenssel [226], 1,4-dinitro-benzollal [231], 1-fluor-2,4-dinitro-anilinnel [73] és a higany(II)-klorid—molibdo-arzénsavval [127] lejátszódó reakciók, melyek cefalosporinok mérésére alkalmasak.

A penicillineknél és cefalosporinoknál kisebb jelentőségű aminosav antibiotikum a cikloszerin. Rövidhullámú, nem jellemző abszorpciós maximuma csak olyan szerényebb analitikai feladatok megoldását teszi lehetővé, mint pl. kapszula készítményének kioldódási vizsgálata 219 nm-nél [247j]. A kapszula hatóanyag-tartalmának meghatározását a BP 1988 nitroprusszid-nátriumos színreakció után 625 nm-nél végezteti [36f]. WAHBI és munkatársai pH = 9-nél klóranillal képzett komplexe alakjában [263], illetve *p*-benzokinonnal lejátszódó reakciója [70] alapján mérték. STEWART és YOO [241] 9-metoxi-akridinnel reagáltatták a cikloszerint; a képződött 9-(d-4--imino-3-izoxazolidin)-akridinnak 438 nm-en van abszorpciós maximuma.

A peptid antibiotikumok csoportjába tartozó gramicidineknek jellegzetes UV-abszorpciójuk nincs. RAMACHANDRAN [193] a gramicidin A-t hidrazinolízis után, *N*-formil-*N'*-2,4-dinitro-fenil-hidrazon formájában mérte.

IVASHKIV [104] ciklikus polipeptid antibiotikumokat fermentléből pH = 7,5-nél brómtimolkékkel kialakuló, kloroformba extrahálható ionpárok felhasználásával mért. A módszer kisebb módosításokkal alkalmas polimixin B, gramicidin, tirocidin mérésére is.

HORODECKA és munkatársai [93] viomicint fermentléből lúgos oldatban réz(II)ionokkal, VOIGT és BARED [256] kapreomicint biacetil-monoximmal, 50%-os kénsav jelenlétében határoztak meg.

Kachani [109] az aktionomicin C-t vízben, fiziológiás konyhasóban és pH = 7,8 glicin pufferben 436 nm-en mérte.

Audhya és Russel [16] enniatin A-t és valinomicint gomba-extraktumokból diklór-etános pikrát reagenssel határoztak meg.

10.14.5. Aromás antibiotikumok

Benzolszármazékok

Legjelentősebb képviselőjük, a kloramfenikol 274 nm-nél mutat abszorpciós maximumot aromás nitrocsoportjának köszönhetően. (A spektrum a 3/12. ábrán látható.) Ezt használják ki a gyógyszerkönyvek meghatározására különböző készítményeiben [36, g, h, i, j, 247k], valamint szabad kloramfenikol extrakció utáni mérésére kloramfenikol-palmitátban [36g, 247 l]. Abdel-Hamid és Abuirjeie [2] közvetlen spektrofotometriás módszert közöltek kloramfenikol mérésére lúg hatására képződő bomlástermékei mellett az ortogonális polinomokat felhasználva. Az abszorpciót 248—314 nm tartományban mérték, a módszer stabilitási vizsgálatokra is alkalmas.

Glombitza [85] savas oldatban cinkkel redukálta a kloramfenikolt, a képződött terméket 1-naftil-etilén-diaminnal kapcsolta. Miram [143] lúgos oldatban nátrium-ditionittal redukált. Masterson [138] lúgos oldatban 1-naftollal, Plourde és Braun [185] piperidin— 8-hidroxi-kinolin— vanadát reagenssel határoztak meg kloramfenikolt. Przyborowski [190] hidrolízis után a hidroxámsavas reakciót használta. Cieszynski és munkatársai [49] a redukált kloramfenikolt pH = 9,6-os értéken gvajakollal, Devani és munkatársai [58] redukció után nitroprusszid-nátriummal reagáltatták. Krzek és Lechniak [119] a lúgos oldatban képződő 2 : 1 összetételű réz(II)komplexét használták mérésre. Morelli [146] a kloramfenikolt lúggal hidrolizálta, és a képződött bomlástermékek, valamint az ammónium-molibdát között végbemenő reakciót alkalmasnak találta a tiszta alapanyag és különböző készítményekben levő kloramfenikol meghatározására.

Kondenzált aromás vegyületek

Legfontosabb képviselőjük a grizeofulvin; 236, 291—292 és 324 nm-en van abszorpciós maximuma. A 191—292 nm-nél megjelenő sávot használják fel az alapanyag tartalmi meghatározására [36k], kapszula és tabletta készítményeinek vizsgálatára [247m]. Ilyen célra a szelektívebb semleges—savas differencia-spektrofotometriás módszert is alkalmazzák [36 l]. Unterman [251] lúgos oldatban izoniaziddal való főzés után határozott meg grizeofulvint. Abdel-Moety és Moustafa [4] az izoniazidos reakciót és a kénsav hatására lejátszódó színreakciót hasonlították össze, és az utóbbit találták érzékenyebbnek. Bhatkar és Madkaiker [26] szerint lúgos oldatban tioszemikarbaziddal származékokat képez, amely készítmények grizeofulvin-tartalmának mérésére alkalmas.

Irodalom

1. Abdel-Gawad, F. M., El-Guindi, N. M., Ibrahim, M. M., Egypt. J. Pharm. Sci. **29,** 63 (1988).
2. Abdel-Hamid, M. E., Abuirjeie, M. A., Analyst **112,** 895 (1987).
3. Abdel-Khalek, M. M., Mahrous M. S., Talanta **31,** 635 (1984).
4. Abdel-Moety, E. M., Moustafa, A. A., Zbl. Pharm. Pharmakother. Laboratoriumsdiagn. **127,** 61 (1988).
5. Agrawal, J. K., Halmalkar, S. G., Vijayavargiya R., Microchem. J. **21,** 202 (1976).
6. Agrawal, Y. K., Patel, D. R., Indian J. Pharm. Sci. **48,** 92 (1986).
7. Alwarthan, A. A., Al-Tamrah, S. A., Sultan, S. M., Analyst **116,** 183 (1991).
8. Alykov, N. M., Zh. Anal. Khim. **36,** 1706 (1981).
9. Alykov, N. M., Zh. Anal. Khim. **39,** 1425 (1984).
10. Amer, M. M., Habeeb, A. A., Talanta **22,** 605 (1975).
11. Amer, M. M., Wahbi, A. M., Habeeb, A. A., J. Pharm. Pharmacol. **27,** 377 (1975).
12. Andrásiné Bárány, Zs., Gergelyné Zobin, Á., Szász, Gy., Acta Pharm. Hung. **49,** 265 (1979).
13. Askal, H. F., Saleh, G.A., Omar, N.M., Analyst **116,** 387 (1991).
14. Astrakhanova, M. M., Kovalenko, L. I., Farmatsiya **31,** 33 (1982).
15. Aszalós, A. (ed.): Modern Analysis of Antibiotics. Marcel Dekker, New York—Basel 1986.
16. Audhya, T. K., Russel, D. W., Anal. Lett. **6,** 265 (1973).
17. Ayad, M., El-Sadek, M., Mostaffa, S., Anal. Lett. **19,** 2169 (1986).
18. Baker, W. L., Analyst **114,** 1137 (1989).
19. Bashkovich, A. P., Prokopovich, A. V., Alekseeva, L. E., Antibiotiki **13,** 695 (1968).
20. Bashkovich, A. P., Zimnukhova, E. S., Antibiotiki **17,** 814 (1972).
21. Baudet, M., J. Pharm. Belg. **31,** 247 (1976).
22. Beltagy, Y. A., Issa, A., Rida, S. M., Pharmazie **31,** 258 (1976).
23. Bérdy, J.: ICIA Information Bulletin, No. 10. Etud'imprim, Liege, 1972.
24. Bergisadi, N., Eczacilik Bul. **21,** 40 (1979).
25. Bershtein, I. Ya., Antibiotiki **25,** 444 (1980).
26. Bhatkar, R. G., Madkaiker, D. C., Indian. J. Pharm. Sci. **42,** 139 (1980).
27. Binder, K., Muenchow, P., Thonke, M., Zentralbl. Pharm., Pharmakother. Laboratoriumsdiagn. **110,** 833 (1971).
28. Bodnar, J. E., Evans, V. G., Mays, D. L., J. Pharm. Sci. **66,** 1108 (1977).
29. Bonchev, P. R., Papazova, P., Mikrochim. Acta **II,** 503 (1975).
30. Bonchev, P. R., Papazova, P., Confino, M., Dimova, D., Microchim. Acta **III,** 459 (1984).
31. Borowiecka, B., J. Pharm. Pharmacol. **28,** 353 (1976).
32. Borowiecka, B., Chojnowski, W., Pajchel, G., Farm. Pol. **40,** 147 (1984).
33. Borowiecka, B., Pajchel, G., Chojnowski, W., Acta Pol. Pharm. **43,** 47 (1986).
34. Borowiecka, B., Pajchel, G., Chojnowski, W., Acta Pol. Pharm. **46,** 463 (1989).
35. Bosanquet, A. C., Cancer Chemother. Pharmacol. **17,** 1 (1986).
36. British Pharmacopoeia 1988. Her Majesty's Stationery Office, London, 1988. a. 539; b. 647; c. 750; d. 39; e. 625; f. 632; g. 118; h. 628; i. 669; j. 927; k. 278; l. 951.
37. Bundgaard, H., Ilver, K., J. Pharm. Pharmacol. **24,** 790 (1972).
38. Bundgaard, H., J. Pharm. Pharmacol. **26,** 385 (1974).
39. Bundgaard, H., Arch. Pharm. Chemi, Sci. Ed. **5,** 141 (1977).
40. Bundgaard, H., Arch. Pharm. Chemi, Sci. Ed. **6,** 607 (1979).
41. Burns, D. T., Lloyd, G. H., Watson-Walker, J., Lab. Pract. **17,** 448 (1968).

42. Casaccia, P., Ladogana, A., Xi, Y. G., Ingrosso, L., Pocchiari, M., Silvestrini, M. C., Antimicrob. Agents Chemotherap. **35,** 1486 (1991).
43. Cavatorta, L., Rangone, R., Calanni, C., Casa, M., Farmaco. Ed. Prat. **25,** 303 (1970).
44. Celletti, P., Moretti, G. P., Petrangeli, B., Farmaco, Ed. Part. **27,** 688 (1972).
45. Chatterjee, N. R., Badve, V. M., Indian J. Pharm. Sci. **48,** 18 (1986).
46. Chiccarelli, F. S., J. Pharm. Sci. **57,** 1046 (1968).
47. Chowdhury, M. K. R., Goswami, R., Chakrabarti, P., Indian J. Exp. Biol. **20,** 909 (1982).
48. Chowdhury, M. K. R., Goswami, R., Chakrabarti, P., Indian J. Exp. Biol. **22,** 447 (1984).
49. Cieszynski, T., Adamski, R., Gill, M., Farm. Pol. **32,** 1023 (1976).
50. Coutts, A. G., Anal. Proc. **22,** 111 (1985).
51. Cressman, W. A., Sugita, E. T. Doluisio, J. T., Niebergall, P. J., J. Pharm. Pharmacol. **18,** 801 (1966).
52. Cressman, W. A., Sugita, E. T., Doluisio, J. T., Niebergall, P. J., J. Pharm. Sci. **58,** 1471 (1969).
53. Csiba, A., Magy. Kém. Foly. **85,** 166 (1979).
54. Csiba, A., Czéhné, I., Acta Pharm. Hung. **49,** 68 (1979).
55. Dabrowska, D., Regosz, A., Tamkun, L., Kaminska, E., Sci. Pharm. **52,** 220 (1984).
56. Das Gupta, V., J. Clin. Pharm. Ther. **13,** 195 (1988).
57. Das Gupta, V., Stewart, K. R., Gunter, J. M., J. Pharm. Sci. **72,** 1470 (1983).
58. Devani, M., Shishoo, C. J., Doshi, K. J., Shah, A. K., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **64,** 557 (1981).
59. Dave, J. B., Banerjee, S. K., Indian J. Pharm. Sci. **48,** 73 (1986).
60. Dave, J. B., Banerjee, S. K., Indian J. Pharm. Sci. **48,** 112 (1986).
61. Davidson, A. G., Stenlake, J. B., Analyst **99,** 476 (1974).
62. Di Giulio, A., Maurizi, G., Saletti, A., Amicosante, G., Mazzeo, P., Oratore, A., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 1159 (1989).
63. Dijkhuis, I. C., Pharm. Weekbl. **102,** 1308 (1967).
64. Divakar, T. E., Tummura, M. K., Sastry, C. S. P., Indian Drugs **22,** 28 (1984).
65. Doadrio, J. C., Doadrio, A., An. R. Acad. Farm. **49,** 61 (1983).
66. Doulakas, J., Pharm. Acta Helv. **51,** 391 (1976).
67. Duda, E., Anal. Biochem. **51,** 651 (1973).
68. Egutkin, N. L., Maidanov, V. V., Nikitin, Yu. E., Khim.-Pharm. Zh. **18,** 241 (1984).
69. Eisenmann, W., Bricker,C. E., Anal. Chem. **21,** 1507 (1949).
70. El-Sayed, L., Mohamed, Z. H., Wahbi, A. A., Analyst **111,** 915 (1986).
71. Elsayed, M. A., Barary, M., Mahgoub, H., Anal. Lett. **18,** 1357 (1985).
72. El-Yazbi, F. A., Barary, M. H., Anal. Lett. **18,** 629 (1985).
73. Emmanuel, J., Dias, E. S., Indian Drugs **24,** 357 (1987).
74. Emmanuel, J., Naik, P. N., Indian Drugs **20,** 389 (1983).
75. Emmanuel, J., Shetty, A. R., Indian Drugs **21,** 167 (1984).
76. Fogg, A. G., Abdalla, M. A., J. Pharm. Biomed. Anal. **3,** 315 (1985).
77. Fooks, J. R., McGliveray, I. J., Strickland, R. D., J. Pharm. Sci. **57,** 314 (1968).
78. Ford, J. H., Anal. Chem. **19,** 1004 (1947).
79. Ford, J. H., Prescott, G. C., Ninman, J. W., Caban, E. L., Anal. Chem. **25,** 1195 (1953).
80. Fujita, Y., Mori, I., Kitano, S., Chem. Pharm. Bull. **31,** 1289 (1983).
81. Fujita, Y., Mori, I., Kitano, S., Chem. Pharm. Bull. **31,** 4016 (1983).
82. Fujita, Y., Mori, I., Kitano, S., Chem. Pharm. Bull. **32,** 1214 (1984).
83. Ganescu, I., Pleniceanu, M., Preda, M., Várhelyi, Cs., Chem. Anal. (Warsaw) **23,** 891 (1978).
84. Gasper, T., Kolsek, J., Perpar, M., Z. Anal. Chem. **154,** 98 (1957).

85. Glombitza, K.-W., Pharm. Zentralhalle Dtl. **106,** 441 (1967).
86. Gowda, A. T., Z. Anal. Chem. **334,** 710 (1989).
87. Gupta, R. P., Tiwari, O. P., Yadav, B. N., Srivastava, A. A., Chem. Era **16,** 161 (1980).
88. Haginaka, J., Wakai, J., Yasuda, H., Uno, T., Anal. Sci. **1,** 73 (1985).
89. Hassan, S. S. M., Amer, M. M., Ahmed, S. A., Mikrochim. Acta **III,** 165 (1984).
90. Heyes, W. F., Analytical Profiles of Drug Substances **8,** 399 (1979).
91. Hon Ping-kay, Fung Wai-kwong, Analyst **116,** 751 (1991).
92. Hoodless, R. A., Analyst **91,** 333 (1966).
93. Horodecka, M., Oskierko, H., Roslik, D., Kowszyk-Gindifer, Z., Chem. Anal. (Warsaw) **12,** 827 (1967).
94. Hrdy, O., Beyrodtova, H., Cesk. Farm. **23,** 122 (1974).
95. Ibrahim, E. A., Beltagy, Y. A., Abd El-Khalek, M. M., Talanta **24,** 328 (1977).
96. Ibrahim, E. A., Beltagy, Y. A., Issa, A. S., Pharmazie **27,** 651 (1972).
97. Ishidate, M., Sakaguchi, T., Pharm. Bull. Japan **3,** 147 (1955).
98. Issar, M. M., Singh, H., Indian J. Technol. **20,** 198 (1982).
99. Issopoulos, P. B., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 97 (1988).
100. Issopoulos, P. B., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 321 (1988).
101. Issopoulos, P. B., Analyst **113,** 1083 (1988).
102. Issopoulos, P. B., Analyst **114,** 237 (1989).
103. Issopoulos, P. B., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 619 (1989).
104. Ivashkiv, E., J. Pharm. Sci. **64,** 1401 (1975).
105. Janik, B., Holiat, D., Acta Pol. Pharm. **29,** 169 (1972).
106. Jelikic-Stankov, M., Veselinovic, D., Pharmazie **43,** 49 (1988).
107. Jelikic-Stankov, M., Veselinovic, D., Analyst **114,** 719 (1989).
108. Jelikic-Stankov, M., Veselinovic, D., Malesev, D., Radovic, Z., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 1565 (1989).
109. Kachani, Z. F. C., Z. Analyt. Chem. **213,** 427 (1965).
110. Kakemi, K., Uno, T., Samejima, M., J. Pharm. Soc. Japan **75,** 194 (1955); **75,** 970 (1955).
111. Kazenko, O., Sorenson, O. J., Wolf, L. M., Dill, W. A., Galbraith, M., Glazko, A. J., Antibiot. Chemother. **7,** 410 (1957).
112. Knapczyk, J., Siedlanowska-Krowczynska, H., Acta Pol. Pharm. **43,** 481 (1986).
113. Kolusheva, A., Papazova, P., Antibiotiki **16,** 1064 (1971).
114. Koprivc, L., Polla, E., Hranilovic, J., Acta Pharm. Suec. **13,** 421 (1976).
115. Korchagin, V. B., Satarova, D. E., Kochetkova, E. V., Vakulenko, N. A., Antibiotiki **20,** 116 (1975).
116. Korobkin, V. M., Korchagin, V. B., Antibiotiki **23,** 178 (1978).
117. Kovács-Hadady, K., Kiss, I. T., Kiss, M., Barna-Katona, K., Analyst **113,** 569 (1988).
118. Krasnov, E. A., Fominykh, Farmatsiya **31,** 75 (1982).
119. Krzek, J., Lechniak, A., Chem. Anal. (Warsaw) **22,** 755 (1977).
120. Labza, D., Acta Pol. Pharm. **35,** 335 (1978).
121. Labza, D., Janik, B., Acta Pol. Pharm. **34,** 63 (1977).
122. Larsen, C., Bundgaard, H., Arch. Pharm. Chemi, Sci. Ed. **5,** 1 (1977).
123. LeMoigne, B., Barthes, D., Fourtillan, J. B., Hazane, C., Ann. Farm. Fr. **36,** 381 (1978).
124. Levine, J., Garlock, E. E., Fishbach, H., J. Amer. Pharmac. Assoc., Sci. Ed. **38,** 473 (1949).
125. Li, Z., Wu, L., Shenyang Yaoxueyuan Xuebao **5,** 94 (1988).
126. Lin, S.-L., Sutton, V. J., Quraishi, M., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **62,** 989 (1979).
127. Luebbe, C., Shem, Y., Demain, A. L., Appl. Biochem. Biotechnol. **12,** 31 (1986).

128. Lupashevskaya, D. P., Bershtein, I. Ya., Raigorodskaya, V. Ya., Birman, G. Sh., Antibiotiki **22,** 33 (1977).
129. Mahgoub, A. E., Khairy, E. M., Kasem, A., J. Pharm. Sci. **63,** 1451 (1974).
130. Mahrous, M. S., Abdel-Khalek, M. M., Analyst **109,** 611 (1984).
131. Marchi, E., Mascellani, G., Boccali, D., Farmaco, Ed. Prat. **28,** 523 (1973).
132. Marchi, E., Mascellani, G., Boccali, D., J. Pharm. Sci. **63,** 1299 (1974).
133. Marelli, L. P., J. Pharm. Sci. **57,** 2172 (1968).
134. Marini, D., Di Cocco, M. E., Rass. Chim. **32,** 231 (1980).
135. Marini, D., Pascucci, E., Boll. Chim. Farm. **119,** 52 (1980).
136. Marques, M. R. C., Hackmann, E. R. N., Saito, T., Anal. Lett. **22,** 621 (1989).
137. Martínez, P. J., Gutiérrez, P., Martínez, M. I., Thomas, J., Cienc. Ind. Farm. **4,** 325 (1985).
138. Masterson, D. S., J. Pharm. Sci. **57,** 305 (1968).
139. Matousova, O., Peterkova, M., Cesk. Farm. **28,** 382 (1979).
140. Matousova, O., Peterkova, M., Kakac, B., Cesk. Farm. **32,** 153 (1983).
141. Mays, D. L., Bangert, F. K., Cantrell, W. C., Evans, W. G., Anal. Chem. **47,** 2229 (1975).
142. McCormick, J. R. D., Fox, S. M., Smith, L. L., Bitler, B. A., Reichental, J., Origoni, V. E., Muller, W. H., Winterbottom, R., Doerchuk, J., J. Am. Chem. Soc. **79,** 2849 (1957).
143. Miram, R., Pharm. Prax., Berl. 108 (1972).
144. Mohamed, M. E., Abounassif, M. A., Al-Khamees, Kandil, H., Aboul-Enein, H. Y., J. Pharm. Belg. **43,** 429 (1988).
145. Monastero, F., Means, J. A., Grenfell, T. C., Hedger, F. M., J. Amer. Pharm. Assoc., Sci. Ed. **40,** 241 (1951).
146. Morelli, B., J. Pharm. Biomed. Anal. **5,** 577 (1987).
147. Morelli, B., Anal. Lett. **21,** 43 (1988).
148. Morelli, B., Anal. Lett. **21,** 759 (1988).
149. Morelli, B, Analyst **113,** 1077 (1988).
150. Morelli, B., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 199 (1988).
151. Morelli, B., J. Pharm. Sci. **77,** 615 (1988).
152. Morelli, B., Anal. Chim. Acta **209,** 175 (1988).
153. Morelli, B., J. Pharm. Sci. **77,** 1042 (1988).
154. Morelli, B., Anal. Lett. **20,** 141 (1987).
155. Morelli, B., Mariani, M., Gesmundo, M., Anal. Lett. **20,** 1429 (1987).
156. Morelli, B., Peluso, P., Anal. Lett. **18,** 1113 (1985).
157. Morelli, B., Peluso, P., Anal. Lett. **18,** 1865 (1985).
158. Mori, I., Fujita, Y., Fujita, K., Tanaka, T., Kawabe, H., Koshiyama. Y., Bull. Chem. Soc. Jpn. **59,** 2585 (1986).
159. Mori, I., Fujita, Y., Kawabe, H., Fujita, K., Tanaka, T., Kishimoto, A., Analyst **111,** 1409 (1986).
160. Mori, I., Fujita, Y., Sakaguchi, K., Chem. Pharm. Bull. **30,** 2599 (1982).
161. Munson, J., W., Papadimitriou, D., DeLuca, P. P., J. Pharm. Sci. **68,** 1333 (1979).
162. Murillo, J. A., Rodriguez, J., Lemus, J. M., Alanon, A., Analyst **115,** 1117 (1990).
163. Natarjan, R., Tayal, J. N., J. Pharm. Pharmacol. **9,** 326 (1957).
164. Nayak, A. N., Ramappa, P. G., Yathirajan, H. S., Manjappa, S., Anal. Chim. Acta **134,** 411 (1982).
165. Nayler, P., Whiting, M. C., J. Chem. Soc. 3038 (1955).

166. Niebergall, P. J., Husar, D. A., Cressman, W. A., Sugita, E. T., Doluisio, J. T., J. Pharm. Pharmacol. **18,** 729 (1966).
167. Nunez-Vergara, L. J., Roa, A., Squella, J. A., Gonzalez-Barbagelata, R. V., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **69,** 188 (1986).
168. Ochab, S., Dissnes Pharm. Warsz. **17,** 323 (1965).
169. Ochab, S., Borowiecka, B., Dissnes Pharm. Warsz. **19,** 423 (1967).
170. Ottis, M., Malat, M., Cesk. Farm. **35,** 119 (1986).
171. Oxford, A. E., Nature **172,** 395 (1953).
172. Palmer, A., Anal. Proc. **22,** 139 (1985).
173. Palotás, B., Szászhegyessy, V., Horváth, M., Anal. Biochem. **179,** 288 (1989).
174. Papazova, P., Bonchev, P. R., Kacharova, M., Mikrochim. Acta **II,** 185 (1976).
175. Papazova, P., Bonchev, P. R., Kacharova, M., Talanta **30,** 51 (1983).
176. Pasqualucci, C. R., Vigevani, A., Radaelli, P., Gallo, G. G., J. Pharm. Sci. **59,** 685 (1970).
177. Pasqualucci, C. R., Vigevani, A., Radaelli, P., Maggi, N., Farmaco, Ed. Prat. **24,** 46 (1969).
178. Patel, A. A., Gandhi, T. P., Patel, P. R., Patel, M. R., Patel, V. C., Indian J. Pharm. Sci. **40,** 64 (1978).
179. Patel, A. A., Gandhi, T. P., Patel, P. R., Patel, M. R., Patel, V. C., Indian J. Pharm. Sci. **41,** 40, 229 (1979).
180. Pawelczyk, E., Hermann, T., Smilowski, B., Borowitz, P., Acta Pol. Pharm. **36,** 315 (1979).
181. Perlman, D., Antibiot. Chemother. **4,** 859 (1954).
182. Perlman, D., Science **118,** 628 (1959).
183. Pernarowski, M., Searl, R. O., Naylor, J., J. Pharm. Sci. **58,** 470 (1969).
184. Plumier-Vandenbussche, D., Dryon, L., Farm. Tijdschr. Belg. **53,** 133 (1976).
185. Plourde, J. R., Braun, J., J. Pharm. Belg. **26,** 591 (1971).
186. Pospisilová, B., Kubes, J., Cesk. Farm. **38,** 136 (1989).
187. Pradeau, D., Dauphin, C., Hamon, M., Ann. Pharm. Fr. **37,** 369 (1979).
188. Prescott, G. C., J. Pharm. Sci. **55,** 423 (1966).
189. Prodhan, A., Majumdar, M. K., Indian Drugs **19,** 358 (1982).
190. Przyborowski, L., Acta Pol. Pharm. **33,** 223 (1976).
191. Przyborowski, L., Hopkala, H., Misztal, G., Farm. Pol. **39,** 527 (1983).
192. Pujol, M., Girona, V., de Bolós, J. Castillo, M., Pharm. Acta Helv. **62,** 269 (1987).
193. Ramachandran, L., K., Indian J. Biochem. **4,** 137 (1967).
194. Rao, R. G., Avadhanulu, A. B., Giridhar, R., Indian Drugs **26,** 298 (1989).
195. Rao, G. R., Kanjilal, G., Mohan, R., Indian Drugs **19,** 326 (1982).
196. Rao, G. R., Kanjilal, G., Mohan, R., Indian J. Pharm. Sci. **42,** 129 (1980).
197. Rao, G. R., Murty, S. S. N., Rao, V., Indian Drugs **22,** 484 (1985).
198. Rao, L. N., Rao, M. N., Indian Drugs **22,** 548 (1985).
199. Ravin, L. J., James, A. E., J. Amer. Pharm. Assoc., Sci. Ed. **44,** 215 (1955).
200. Regosz, A., Dabrowska, D., Babilec, H., Nestoruk, H., Sci. Pharm. **50,** 17 (1983).
201. Regosz, A., Zuk, G., Pharmazie **35,** 24 (1980).
202. Rizk, M., Younis, F., Anal. Lett. **17,** 1803 (1984).
203. Rizk, M., Walash, M. I., Abou-Ouf, A. A., Belal, F., Anal. Lett. **14,** 1407 (1981).
204. Rogic, D., Herak, J. J., Acta Pharm. Jugosl. **37,** 135 (1987).
205. Roudebush, H. E., Ann. N. Y. Acad. Sci. **120,** 582 (1965).
206. Ruczaj, D., Szawlowska, H., Lendzion, B., Chem. Anal. (Warsaw) **21,** 1371 (1976).
207. Ryan, J. A., J. Pharm. Sci. **73,** 1301 (1984).

208. Saha, U., Analyst **111,** 1179 (1986).
209. Saha, U., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **70,** 686 (1987); **72,** 242 (1989).
210. Saha, U., Roay, D. K., J. Inst. Chem. **54,** 92 (1982).
211. Said, S. A., El Bayoumy, T., J. Drug. Res. **17,** 147 (1987).
212. Sakaguchi, T., Taguchi, K., Pharm. Bull. Japan **3,** 166, 303 (1955).
213. Sakaguchi, T., Taguchi, K., Japan Analyst **6,** 787 (1957).
214. Sakaguchi, T., Taguchi, K., Suzuki, A., Japan Analyst **6,** 782 (1957).
215. Salinas, F., Nevado, J. J. B., Espinosa, A., Analyst **114,** 1141 (1989).
216. Sampath, S. S., Robinson, D. H., J. Pharm. Sci. **79,** 428 (1990).
217. Sane, R. T., Kamat, R. P., Gijare, A. S., Deshpande, D. S., Indian Drugs **20,** 331 (1983).
218. Sane, R. T., Vaidya, U. M., Nayak, V. G., Dhamankar, P. Z., Joshi, S. K., Doshi, V. J., Sawant, S. V., Malkar, V. B., Pandit, U. R., Sathe, A. Z., Jukar, S., Nadkarni, A. D., Indian Drugs **19,** 398 (1982).
219. Sanghavi, N. M., Chandramohan, H. S., Can. J. Pharm. Sci. **10,** 59 (1965).
220. Sanghavi, N. M., Katdare, A. V., Indian J. Pharm. Sci. **35,** 87 (1973).
221. Sastry, C. S. P., Divakar, T. E., Prasad, U. V., Indian Drugs **22,** 604 (1985).
222. Sastry, C. S. P., Divakar, T. E., Prasad, U. V., Talanta **33,** 164 (1986).
223. Sastry, C. S. P., Satyanarayana, P., Rao, A. R., Singh, N. R. P., Microchim. Acta **I,** 17 (1989).
224. Sekheta, M. A. F., Milovanovic, G. A., Janjic, T. J., Glas. Hem. Drus. Beograd **44,** 447 (1979).
225. Sengun, F. I., Fedai, I., Chim. Acta Turc. **13,** 205 (1985).
226. Sengun, F. I., Fedai, I., Talanta **33,** 366 (1986).
227. Sengun, F. I., Ulas, K., Talanta **33,** 363 (1986).
228. Sergeev, G. M., Dorofeeva, I. V., Stepanova, L. G., Zh. Anal. Khim. **41,** 1694 (1986).
229. Shihabi, Z. K., Wasilauskad, B. L., Peacock, J. E., Therap. Drug Monit. **10,** 486 (1988).
230. Shingbal, D. M., Agni, R. M., Indian Drugs **22,** 383 (1985).
231. Shingbal, D. M., Bhangle, S. R., Indian Drugs **24,** 367 (1987).
232. Shingbal, D. M., Naik, R. R., Indian Drugs **22,** 271 (1985).
233. Shirokova, L. M., Charykov, A. K., Zh. Anal. Khim. **36,** 547 (1981).
234. Siedlanowska-Krowczynska, H., Knapczyk. J., Acta Pol. Pharm. **43,** 140 (1986).
235. Singh, M. P., Basu, N., Roy, D. K., Mandal, S. K., Indian J. Exp. Biol. **22,** 39 (1984).
236. Slavin, A. A., Etingov, E. D., Prokopovich, A. V., Brunshtein, I. Z., Bashkovich, A. P., Pyshnyi, S. P., Berhstein, E. M., Antibiotiki **26,** 253 (1981).
237. Smith, J. W. G., De Grey, G. E., Patel, V. J., Analyst **92,** 247 (1967).
238. Smith, R. V., Harris, R. G., Sanchez, E., Maness, D. D., Martin, A., Microchem. J. **22,** 168 (1977).
239. Squella, J. A., Nunez-Vergara, L. J., Aros, M., J. Assoc Off. Anal. Chem. **63,** 1049 (1980).
240. Stephens, C. R., Conover, L. H., Pasternack, R., Hochstein, F. A., Moreland, W. T., Regna, P. P., Pilgrim, F. J., Brunigs, K. J., Woodward, R. B., J. Am. Chem. Soc. **76,** 3568 (1954).
241. Stewart, J. T., Yoo, G. S., J. Pharm. Sci. **77,** 452 (1988).
242. Sulkowska, J., Budych, A., Staroscik, R., Chem. Anal. (Warsaw) **30,** 387 (1985).
243. Sultan, S. M., Analyst **111,** 97 (1986).
244. Szász, Gy., Budaváriné Bárány, Zs., Gergely, A., Dávid, Á., Tóth, A., Acta Pharm. Hung. **46,** 248 (1976).
245. Szawlowska, H., Borowitz, P., Chem. Anal. (Warsaw) **23,** 821 (1978).
246. Tarbutton, P., Am. J. Hosp. Pharm. **44,** 115 (1987).

247. The United States Pharmacopoeia XXII. USP Convention Inc. Rockville, Md. 1990. a. 521; b. 1227; c. 972; d. 86; e. 998; f. 480; g. 646; h. 1474; i. 240; j. 371; k. 271; l. 277; m. 616.
248. Török, I., Paál, T., J. Chromatogr. **246,** 356 (1982).
249. Ulas, K., Sengun, F. I., Chim. Acta Turc. **13,** 491 (1985).
250. Ulas, K., Sengun, F. I., Arch. Pharm. Chemi, Sci. Ed. **15,** 91 (1987).
251. Unterman, W. H., Rev. Chim. (Bucharest) **16,** 286 (1965).
252. Uri, J. V., Jain, T. C., J. Antibiot. **39,** 669 (1986).
253. Uri, J. V., Acta Chim. Hung. **128,** 89 (1991).
254. Veselinovic, D., Jelikic-Stankov, M., Pharmazie **42,** 199 (1987).
255. Vetuschi, C., Ragno, G., Farmaco **45,** 757 (1990).
256. Voigt, R., Maa Bared, A. G., Pharmazie **25,** 471 (1970).
257. Wahbi, A.-A. M., Al-Khamees, H. A., Yousef, A. M. A., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **71,** 768 (1988).
258. Wahbi, A.-A. M., Al-Khamees, H. A., Youssef, A. M. A., Analyst **113,** 563 (1988).
259. Wahbi, A.-A. M., Barary, M., Mahgoub, H., Elsayed, M. A., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **68,** 1045 (1985).
260. Wahbi, A. M., Abdine, H., Sadek, A. R. H., Pharmazie **32,** 690 (1977).
261. Wahbi, A. M., Abounassif, M. A., Al-Kahtani, H. M. G.,Analyst **111,** 777 (1986).
262. Wahbi, A. M., Belal, S., Bedair, M., Abdine, H., Pharmazie **37,** 641 (1974).
263. Wahbi, A. M., Mohamed, M. E., Abounassif, M., Gad-Kariem, E., Anal. Lett. **18,** 261 (1985).
264. Wahbi, A. M., Unterhalt, B., Z. Anal. Chem. **284,** 128 (1977).
265. Weygand, F., Csendes, E., Ber. Dtsch. Chem. Ges. **85,** 45 (1952).
266. Zalkovski, S. H., Sinkula, A. A., Valvani, S. C., Physical-Chemical Properties of Drugs. Marcel Dekker, New York 1980.
267. Zechmeister, L. (ed.): Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Springer Verlag, Wien 1963.
268. Yassa, D. A., Gad ElRub, L. N., Pharmazie **31,** 257 (1976).
269. Yusim, R. S., Nys, P. S., Kolygina, T. S., Antibiotiki **16,** 39 (1971).

10.15. Vitaminok [37, 108]

10.15.1.A-vitamin

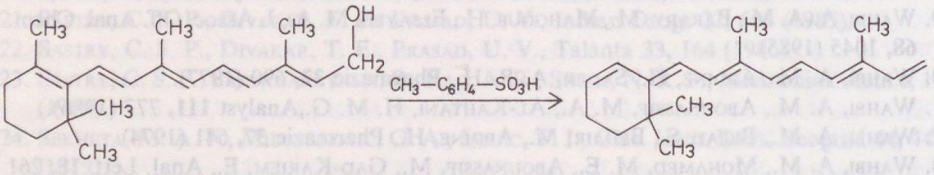
Az *all-trans* pentaen típusú A_1-vitamin spektrumát a 3. fejezet 3/5. ábráján mutattuk be. Az izopropanolos közegben 325 nm-nél megjelenő intenzív abszorpciós sáv kitűnő alapot nyújt A-vitamin spektrofotometriás meghatározására. Természetes anyagokban, elsősorban fő forrásában, a csukamájolajban ezt az abszorpciós sávot háttér-abszorbancia kíséri, amit a mérés megbízhatósága érdekében korrekcióba kell venni. Érdekes megjegyezni, hogy a (a 4.3.2. fejezetben részletesen tárgyalt) klasszikus, de mind a mai napig használt háttér-korrekciós módszert Morton és Stubbs éppen A-vitaminnak csukamájolajban való meghatározására vezették be [69, 70]. Az elszappanosítást, éteres extrakciót, bepárlást majd izopropanolos oldás utáni 3 hullámhosszas mérést több gyógyszerkönyv, köztük még az USP XXII is [112a] használ-

ja A-vitamin mérésére. A hatóanyag-tartalom kiszámítására szolgáló korrigált abszorbanciát a (10/23) képlettel lehet kiszámítani:

$$A_{325,\,korr} = 6{,}815 \cdot A_{325} - 2{,}555 \cdot A_{310} - 4{,}260 \cdot A_{334} \qquad (10/23)$$

A háttér kiejtését természetesen el lehet végezni pl. kenőcs készítményből előzetes oszlopkromatográfiás elválasztással is [90], de Wahbi és munkatársai [123] sikerrel alkalmazták a derivatív spektrofotometriát is olajos kapszulák vizsgálatára ($^1D_{306,\,348}$). Hasonlóképpen végezte el Abdel Hamid [1] A-vitamin palmitát meghatározását oxidatív bomlástermékei jelenlétében.

A kémiai reakcióra alapozott módszerek közül elsőként egy sztöchiometrikus reakción alapuló eljárást említünk meg: amint azt a (10/24) egyenlet jelzi, erős sav katalízis hatására benzolos közegben víz hasad le, és a keletkező anhidro-A-vitamin a katalizátor semlegesítése után 399 nm-nél mérhető [20].



A-vitamin (10/24)

Ennél a módszernél sokkal jelentősebb az antimon-triklorid kloroformos oldatával való kölcsönhatás során keletkező kék színű komplex ($\lambda_{max} = 620$ nm) mérésén alapuló klasszikus Carr—Price-módszer [23]. A módszer rendkívül érzékeny: az A-vitamin-koncentrációt a mért oldatban 0,5—1 μg/ml értékre célszerű beállítani. Nagy hátránya viszont a módszernek a szín nagyfokú instabilitása; az abszorbanciát a reagens hozzáadása után 5—10 másodperccel kell megmérni. A szín stabilizálására irányuló számos kísérlet közül megemlítjük Blake és Moran [16] módszerét, akik 1,2-diklór-etán és 2,3-diklór-propanol elegyében végezve el a mérést és 555 nm-nél maximummal rendelkező stabilis reakciótermékhez jutottak. Ezt a reakciót a láncvégi primer hidroxil-, ill. aldehidcsoportot tartalmazó analógok adják, a karbonsavszármazék nem. Ez utóbbi mérésére 85%-os foszforsavas kezelésen és a termék 453 nm-nél való mérésén alapuló rendkívül érzékeny módszer nyújt lehetőséget [103].

A leírtakénál lényegesen kisebb az érzékenysége az A-vitamin redukáló sajátságain alapuló foszfor-molibdénsavas, foszfor-volfrámsavas és sziliko-volfrámsavas [98] indirekt módszereknek.

10.15.2. B-vitaminok

B_1-vitamin (tiamin)

Tiamin ultraibolya spektrumában (semleges közeg) két, analitikai mérést lehetővé tevő sáv található: $\varepsilon_{232\,nm} = 11\,640$, $\varepsilon_{266\,nm} = 8\,600$. Erősen savas közegben — az amino-pirimidin rész protonálódása miatt — csak egyetlen széles sáv jelenik meg ($\varepsilon_{246\,nm} = 14\,300$). A spektrofotometriás módszer nemcsak egykomponensű B_1-vita-

min készítmények hatóanyag-tartalmának meghatározására alkalmas, hanem B-vitamin-komplexek vizsgálatára is széles körben alkalmazzák. B_2- és B_6-vitaminok zavaró hatását megfelelő hullámhosszakon való méréssel és korrekciós faktorok [72], a 4.6.1. fejezetben tárgyalt Pernarowski-féle rációmódszer alkalmazásával [104], egyenletrendszerek megoldásával [10, 51] vagy előzetes kromatográfiás elválasztással [52] küszöbölik ki, ill. nyernek adatokat a többi komponens meghatározására is.

A korszerűbb eljárások közül a Wahbi által alkalmazott ortogonális polinom módszert alkalmazták (lásd 4.3.3. fejezet). 0,1 M sósavas közegben a 226—292 nm között 6 nm-enként meghatározott abszorbanciák segítségével tiamin meghatározása bomlástermékei jelenlétében is elvégezhető [122]. Elsayed és munkatársai [30] a spektrum pH-függésére alapozott differencia-spektrofotometriás módszert közöltek tiamin meghatározására tolbutamid és piridoxin mellett. A meghatározás alapjául a 0,01 M nátrium-hidroxidos oldattal szemben 265 nm-nél mért 0,1 M sósavas oldat differencia-abszorbanciája képezte. A derivatív spektrofotometria is szelektív meghatározásokat tesz lehetővé. Abdel-Hamid és munkatársai [2] pl. a második derivált görbe 254 nm-nél levő negatív csúcsának mérése alapján megoldották tiamin meghatározását bomlástermékei jelenlétében; ez utóbbiak spektrumának második deriváltja ui. ezen a hullámhosszon zéró.

A kémiai reakciókra alapozott módszerek közül — valószínűleg az oxidáció után tiokróm formájában fluorimetriás módszerrel való meghatározási módszer széles körű elterjedtsége miatt — a spektrofotometriás módszerek jelentősége viszonylag kisebb. Első helyen az ionpár-extrakción alapuló módszer érdemel említést. Das Gupta és Cadwallader [26] pH 6,6-nál brómtimolkékkel végrehajtott ionpárképzés és kloroformos extrakció után 420 nm-nél végzi el a mérést. A módszer jelentőségét az adja meg, hogy valamennyi vitamin közül a tiamin a legerősebb bázis, és így az extrakció multivitamin készítményekből szelektíven elvégezhető. A módszer automatizált változatát is kidolgozták [82]. Ugyancsak ionpár-extrakción alapul Mitsui és Fujimura [68] módszere, akik a szelektivitás növelése céljából előzetesen a primer aminocsoportot átalakítják 2,4-dinitro-fenil-származékká. A tropeolin 00 festékkel pH 3,29-nél végrehajtott ionpárképzés után a kloroformos fázis 10%-os metanolos sósavas savanyítása majd 543 nm-nél spektrofotometriás mérés következik.

Az egyéb módszerek közül a diazotált aromás aminokkal, mint pl. 6-amino-timollal [41] és fenil-hidrazin-4-szulfonsavval [120] való kapcsoláson alapuló módszereket, a klóranilos töltésátviteli komplex képzésére alapozott módszert [6] (lásd 7. fejezet) és 4-amino-fenol reagenssel való kapcsolási reakció termékének 429 nm-nél elvégzett mérését említjük meg [97]. Végül — inkább csak kuriózumként — teszünk említést Ciesielski [25] kinetikus módszeréről, ahol a mérés alapja a jód-azid-reakcióban elfogyott jód, amelynek koncentrációja arányos a reakciót katalizáló tiamin koncentrációval.

B_1-vitamin gyógyászatban használatos származékai közül tiamin-propil-diszulfid és tiamin-diszulfid meghatározására 2,6-diklór-*p*-benzokinon-4-klórimin reagens felhasználásával Krishnan és munkatársai közöltek módszert [57].

B_2-vitamin (riboflavin)

A sárga színű riboflavin ultraibolya-látható spektruma kitűnő lehetőséget kínál szelektív és érzékeny meghatározására még összetett vitaminkészítményekben is. Analitikai célokra alkalmas három abszorpciós sávja vizes közegben: $\varepsilon_{267\,nm} = 32\,900$, $\varepsilon_{372\,nm} = 10\,400$ és $\varepsilon_{445\,nm} = 12\,200$. Ha a meghatározásnál a legfontosabb szempont a nagy érzékenység, akkor az első, legintenzívebb sávot használhatjuk [52], ha azonban a szelektivitás a fontosabb, akkor az utolsó, a sárga színt hordozó sávon mérhetünk, ami szelektív mérési lehetőséget biztosít minden színtelen komponens jelenlétében. Így BURGER [21] ezzel a módszerrel határozta meg a B_2-vitamint, B_1, B_2, B_6, nikotinsav-amid és C-vitamin elegyében. A két hosszúhullámú sávra és a háttér algebrai módszerekkel való kiejtésére alapozták módszerüket AHMED és RAPSON riboflavin meghatározására fotokémiai bomlástermékeik jelenlétében [5].

Mivel a direkt ultraibolya-látható spektrofotometria széles körben alkalmazható, kitűnő lehetőséget jelent riboflavin meghatározására (s erre a natív fluoreszcencia mérésén alapuló, széles körben használt módszer is lehetőséget biztosít), a színreakciókon alapuló módszerek jelentősége riboflavin analitikájában viszonylag csekély. Megemlítjük az oldallánc perjodátos hasításán és a hasítás során keletkező formaldehid kromotrópsavas vagy 3-metil-benztiazolin-2-on-hidrazonos mérésén alapuló módszert [99].

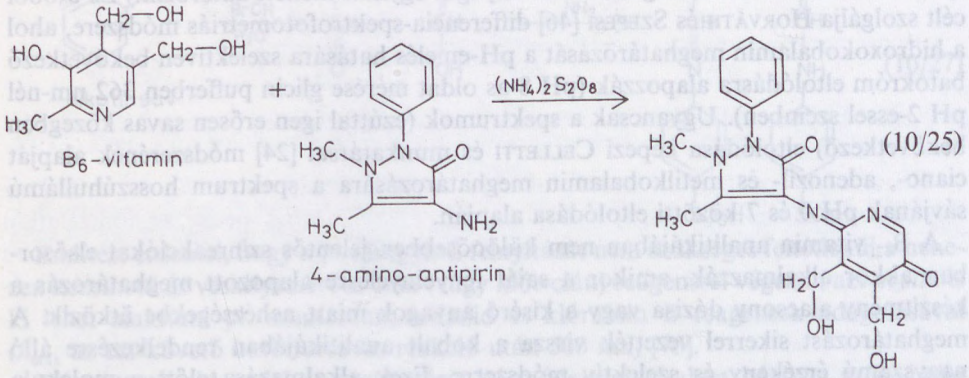
B_6-vitamin (piridoxin)

A 3-hidroxi-piridin típusú spektrummal rendelkező piridoxin spektruma erős pH-függést mutat. Erősen savas közegben (pH 2 alatt) a protonált forma van jelen ($\varepsilon_{291\,nm} = 7470$), míg pH 6 és 8 között a zwitterionos forma ($\varepsilon_{254\,nm} = 3090$ és $\varepsilon_{324\,nm} = 5830$). Az erősen lúgos közeg alkalmazása, ahol az anionos forma van jelen, problematikus, mivel itt a piridoxin meglehetősen bomlékony.

A fenti lehetőségek közül a 0,1 M sósavban végzett mérés alapján végezteti el a BP 1988 piridoxin tabletta tartalmi meghatározását [18a]. Ugyanilyen oldatban JAN és munkatársai [51], SETHI és munkatársai [104] egyenletrendszer segítségével, JARZEBINSKI és munkatársai [52] vékonyréteg-kromatográfiás elválasztás után végezte el piridoxin meghatározását gyógyszerkészítményekben. Alkalmazzák a semleges oldatban 324 nm-nél lévő sávot is [21, 72]; BURGER [21] a pontosság növelése céljából standard addíciós módszert alkalmazott, a B_2- és K-vitaminok zavaró hatását pedig megfelelő korrekciós számításokkal eliminálta.

A spektrum fent ismertetett pH-függésén alapul az a módszer, amelyben a semleges oldatnak a 0,1 M sósavashoz viszonyítva 328 nm-nél észlelhető abszorbancianövekedése képezi a meghatározás alapját [37]. Ugyancsak differencia-spektrofotometriás módszerrel végzi el ELSAYED [30] a meghatározást tiamin jelenlétében (0,01 M nátrium-hidroxidos oldat a 0,1 N kénsavassal szemben). A számítás alapját itt a 310 és 300 nm-nél mért differencia-abszorbanciák különbsége képezi; ilyen módon sikerült ui. teljesen eliminálni a tiamin hatását. A derivatív spektrofotometriás módszer (0,1 N kénsavas oldat első deriváltja 296 nm-es maximumán való mérés) lehetővé teszi piridoxin szelektív mérését meclozin mellett [3].

A piridoxin kvantitatív meghatározására szolgáló színreakciók szinte kivétel nélkül a jól ismert fenolreakciók körébe tartoznak. RAO [89], ill. NIRMALCHANDAR és BALASUBRAMANIAN [77] azokapcsoláson alapuló módszerében a reagens 4-hidrazinobenzol-szulfonsav, ill. diazotált *p*-nitro-anilin, az utóbbi módszerben pedig a mérés alapjául szolgáló színes származék a keletkező azofesték higany(II)-komplexe. A komplexképzés batokróm és hiperkróm eltolódást idéz elő ($\varepsilon_{530\,nm} = 46\,000$), ezenkívül stabilizálja a színt. Aszkorbinsav kivételével (amelynek zavaró hatása ólom(II)-só alakban való előzetes leválasztással eliminálható), más vitaminok nem zavarják a meghatározást, ami így alkalmas piridoxin meghatározására multivitaminkészítményekben. Ugyanezen szerzők másik módszere [78], a 4-amino-antipirinnel való oxidatív kapcsolás (lásd 10/25 reakcióegyenlet) igen stabilis sárga színhez, de kisebb érzékenységhez vezet ($\varepsilon_{420\,nm} = 5410$), és más vitaminok zavaró hatása miatt multivitaminkészítményekben való alkalmazása csak a piridoxin előzetes ioncserélő kromatográfiás módszerrel való elválasztás után lehetséges.



Csakúgy, mint az eddig ismertetett módszerek esetében, a 3,5-diklór-*p*-benzokinon-klórimin reagenssel végrehajtott, kék színű indofenolhoz vezető reakció támadási helye a szubsztituálatlan 6-os pozíció [71].

B_{12}-vitamin és rokon vegyületei

A vörös színű B_{12}-vitamin (cianokobalamin) jellegzetes és intenzív ultraibolyaláthatható spektrumával (lásd 45. oldal) kitűnő lehetőséget biztosít meghatározására gyógyszerkészítményekben. A 278, 361 és 548 nm-nél megjelenő maximumok közül ($\varepsilon = 15\,600$, 28 100 és 8540) általában a legintenzívebb 361 nm-es sávot használják cianokobalamin alapanyag és injekció hatóanyag-tartalmának vizes közegben való meghatározására [18b, 18c, 112b].

Amennyiben a 361 nm-en való mérést az összetett készítmény egyéb komponensei zavarják, mérhetünk a sokkal szelektívebb mérési lehetőséget biztosító 548 nm-es hullámhosszon. Amennyiben ennek a kisebb intenzitású sávnak felhasználása nem biztosít kielégítő érzékenységű vagy szelektivitású (májkészítmények) mérési lehetősé-

get, kromatográfiás és extrakciós módszerek bő választéka [37, 108] segíti a dúsítást, ill. a zavaró komponensektől való megszabadulást.

Lényegesen érdekesebb analitikai problémákat vet fel a B_{12}-vitamin hidroxi analógjának (hidroxokobalamin) analitikája. Ennek spektruma hasonló a cianokobalaminéhoz, fontos különbség az, hogy a (10/26) egyensúly következtében a spektrumnak pH-függése van (ellentétben a cianokobalamin spektrumával).

$$\text{hidroxokobalamin} + H^+ \rightleftharpoons \text{akvokobalamin}^+ \qquad (10/26)$$

Enyhén savas közegben, ahol a meghatározásokat általában végzik, az akvokobalamin alakban jelenlevő anyag fő abszorpciós maximuma 351 nm-nél jelenik meg. Bayer [14] szerint a 351 és 361 nm-nél mért abszorbanciákból a rációmódszer (lásd 4.6.1. fejezet) segítségével lehet cianokobalamin és hidroxokobalamin elegyek összetételét kiszámítani. (Ennek azért van jelentősége, mivel a hidroxokobalamin a cianokobalamin fotokémiai bomlásának terméke, de előbbinek cianokobalaminból történő ipari előállítása során is meg kell a két anyagot egymás mellett határozni.) Ez utóbbi célt szolgálja Horváth és Szepesi [46] differencia-spektrofotometriás módszere, ahol a hidroxokobalamin meghatározását a pH-emelés hatására szelektíven bekövetkező batokróm eltolódásra alapozzák (pH 8-as oldat mérése glicin pufferben 362 nm-nél pH 2-essel szemben). Ugyancsak a spektrumok (ezúttal igen erősen savas közegben bekövetkező) eltolódása képezi Celletti és munkatársai [24] módszerének alapját ciano-, adenozil- és metilkobalamin meghatározására a spektrum hosszúhullámú sávjának pH 0 és 7 közötti eltolódása alapján.

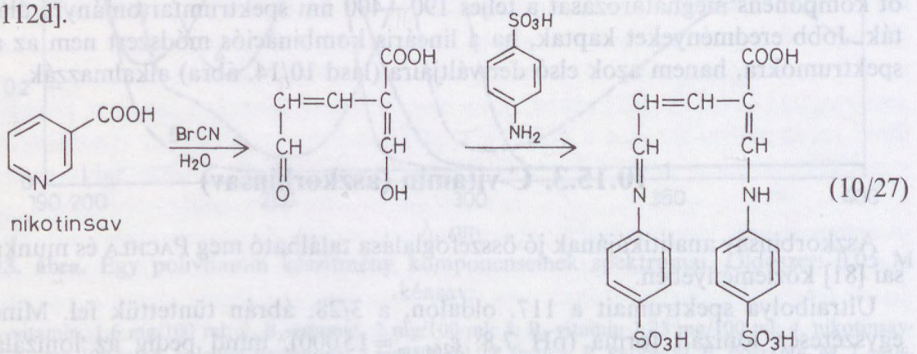
A B_{12}-vitamin analitikájában nem különösebben jelentős színreakciókat elsősorban akkor alkalmazzák, amikor a saját fényelnyelésre alapozott meghatározás a készítmény alacsony dózisa vagy a kísérő anyagok miatt nehézségekbe ütközik. A meghatározást sikerrel vezették vissza a kobalt analitikájában rendelkezésre álló nagyszámú érzékeny és szelektív módszerre. Ezek alkalmazása előtt a molekula szerves részét el kell roncsolni; erre általában hidrogén-peroxid, kénsav, salétromsav és perklórsav különböző elegyeit használják. A szabaddá vált kobalt mérésére egyebek között 1-nitrozo-2-naftol-3,6-diszulfonsavat [37], kálium-rodanidot [17, 19], 4-(5-bromo-2-piridilazo)-1,3-diamino-benzolt [13], di-(2-piridil)-keton-2-piridil-hidrazont [117] használtak, de leírták a katalitikus meghatározást is a kobaltnak a hidrogén-peroxid és a pirogallolvörös közötti reakcióra gyakorolt katalitikus hatása alapján [66].

Nikotinsav és nikotinsavamid

Nikotinsav és nikotinsavamid etanolos, ill. vizes közegben 262 nm körül rendelkezik közepes intenzitású abszorpciós sávval ($\varepsilon = 2910$, ill. 2900). Ez lehetővé teszi szerényebb igényű analitikai feladatok megoldását, mint meghatározásuk egyszerű gyógyszerkészítményekben [18d, 112c]. Erősen savas közegben a maximum helyének változatlanul maradása mellett a piridinszármazékokra jellemző hiperkróm eltolódás következik be (lásd 3/32. ábra) ($\varepsilon = 6900$, ill. 5540), ami további lehetőséget nyújt az érzékenység és a szelektivitás növelésére, összetett készítményekben való meghatáro-

zásukra azonban az ultraibolya spektrofotometria csak előzetes kromatográfiás elválasztás után nyújt lehetőséget [37, 108]. A derivatív spektrofotometria azonban lehetővé teszi a meghatározást a többi B-vitamin jelenlétében is [61, 86].

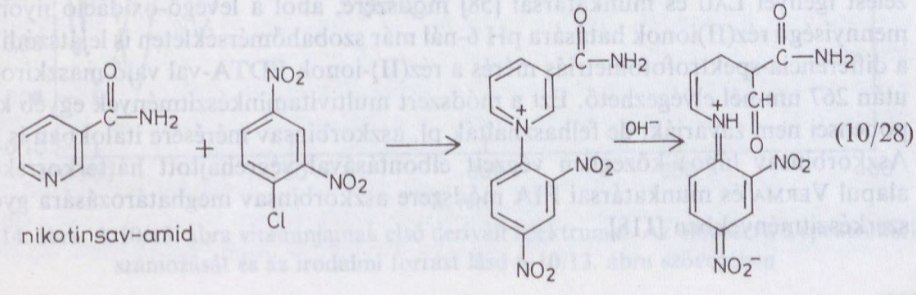
A színes termékhez vezető reakciók közül a legáltalánosabban a piridingyűrű bróm-cianos nyitásán alapuló klasszikus König-reakció valamelyik változatát alkalmazzák. Amint az a (10/27) reakcióegyenletben látható, a reakció során keletkező glutakonaldehid-származék kondenzációja aromás aminokkal színes termékhez vezet. Aromás amin reagensként számos anyagot kipróbáltak (anilin, prokain, *p*-amino-acetofenon, *p*-fenilén-diamin stb.), de kondenzálhat az aldehid barbitursav aktív metiléncsoportjával is [37, 108]. A (10/27) reakcióegyenleten a mind a mai napig legáltalánosabban használt szulfanilsav felhasználását mutatjuk be; $\lambda_{max} = 450$ nm) [80, 112d].



(10/27)

Említést érdemel, hogy a piridingyűrű felnyitását nem szükséges feltétlenül a nehezen kezelhető és veszélyes bróm-cián (vagy klór-cián) reagenssel végezni; azt *in situ* is ki lehet alakítani pl. ammónium-rodanid és klóramin B reagensek adagolásával (λ_{max} az ezt követő barbitursavas reakció után 500 nm) [75].

Nikotinsavamid szelektív meghatározási módszerei részben bázikus sajátságain alapulnak (ionpár-extrakciós módszer brómtimolkék felhasználásával [37]), más részről pedig felhasználták hipobromitos Hoffmann-lebontási reakcióját, ami 3-amino-piridinhez vezet, s így a meghatározás visszavezethető primer aromás aminok mérésére (diazotálás után kapcsolás *N*-fenil-*β*-naftil-aminnal [37] vagy Schiff-bázis képzés 4-dimetil-amino-benzaldehiddel [79]). Ugyancsak nikotonsavamid szelektív meghatározására írta le NUDELMAN [79] 1-klór-2,4-dinitro-benzolos módszerét. Ez a reagens a piridin nitrogénnel reagál, majd a keletkező kvaterner piridiniumgyűrű lúgos közegben a (10/27) reakciónál bemutatott reakcióval analóg módon felnyílik 504 nm-nél jól mérhető származék keletkezése közben (lásd 10/28 reakcióegyenlet).



(10/28)

Már az egyes B-vitaminok tárgyalása során többször érintettük összetett készítmények analízisének problémáját, ahol több (esetenként valamennyi) B-vitamin (esetleg más vitaminokkal is kombinálva) együtt fordul elő. Bár az ilyen készítményeket ma elsősorban folyadék-kromatográfiás módszerrel analizálják, a 4.4.2. fejezetben bemutatott, többkomponensű rendszerek analízésére alkalmas komputeres módszerek is kitűnő lehetőséget nyújtanak ilyen készítmények analízisére.

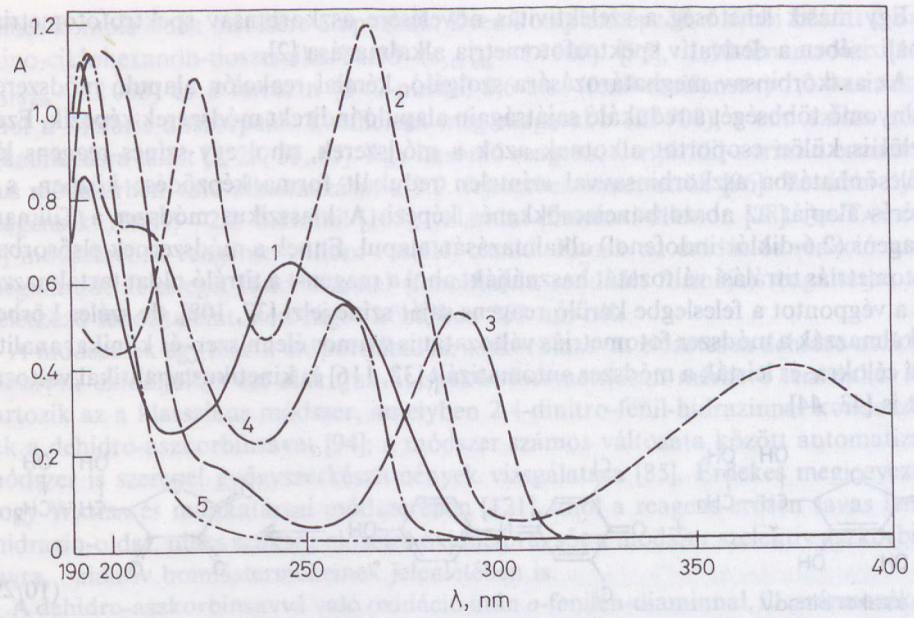
Ennek illusztrálására bemutatjuk PETIOT és munkatársai módszerét B_1-, B_2-, B_6-vitaminok, nikotinsavamid és kalcium-pantotenát kombináció analízisére [86]. A 10/13. ábrán ábrázoltuk a fenti vitaminok spektrumait 0,1 N kénsavas közegben. Az öt komponens meghatározását a teljes 190—400 nm spektrumtartományra alapozták. Jobb eredményeket kaptak, ha a lineáris kombinációs módszert nem az alapspektrumokra, hanem azok első deriváltjaira (lásd 10/14. ábra) alkalmazzák.

10.15.3. C-vitamin (aszkorbinsav)

Aszkorbinsav analitikájának jó összefoglalása található meg PACHLA és munkatársai [81] közleményében.

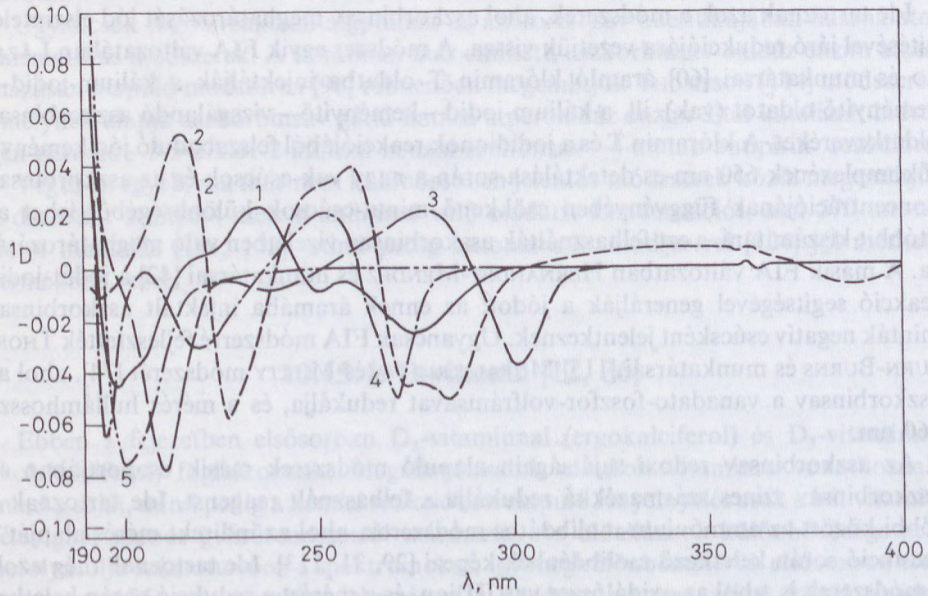
Ultraibolya spektrumait a 117. oldalon, a 3/28. ábrán tüntettük fel. Mind az egyszeresen ionizált forma (pH 7,8; $\varepsilon_{264\,nm} = 15\,000$), mind pedig az ionizálatlan forma (0,01 M sósavas, ill. kénsavas közeg; $\varepsilon_{244\,nm} = 9850$) alapját képezheti nem túlságosan bonyolult feladatok megoldásának, mint pl. egyszerű gyógyszerkészítmények aszkorbinsav-tartalmának mérése [64] stb.

A mérés hibaforrása lehet az aszkorbinsav könnyű oxidálhatósága oldott állapotban a fenti hullámhosszakon elnyeléssel gyakorlatilag nem rendelkező dehidroaszkorbinsavvá. Ezt a reakciókészséget hasznosítani is lehet a mérés szelektivitásának növelésére. Ha ui. differencia-spektrofotometriásan mérünk, és összehasonlító oldatként olyan, a mérendő oldattal azonos összetételű oldatot használunk, ahol gondoskodunk az aszkorbinsav előzetes teljes oxidációjáról, akkor a meghatározást el tudjuk végezni minden olyan jól definiált más anyag vagy háttér-jellegű komponensek mellett is, amelyek az oxidáció körülményei között nem változtatják fényelnyelésüket. 0,001%-os vizes oldatban 2—12 perces 90 °C-os melegítés hatására az oxidációt a vízben oldott oxigén kvantitatíven elvégzi, és ezt BACZYK és SWIDZINSKA[11] felhasználták aszkorbinsav meghatározására gyógyszerkészítményekben. Kíméletesebb kezelést igényel LAU és munkatársai [58] módszere, ahol a levegő-oxidáció nyomnyi mennyiségű réz(II)ionok hatására pH 6-nál már szobahőmérsékleten is lejátszódik, és a differencia-spektrofotometriás mérés a réz(II)-ionok EDTA-val való maszkírozása után 267 nm-nél elvégezhető. Ezt a módszert multivitaminkészítmények egyéb komponensei nem zavarják, de felhasználták pl. aszkorbinsav mérésére italokban is [59]. Aszkorbinsav lúgos közegben végzett elbontásával végrehajtott háttérkorrekción alapul VERMA és munkatársai FIA módszere aszkorbinsav meghatározására gyógyszerkészítményekben [118].



10/13. ábra. Egy polivitamin készítmény komponenseinek spektrumai. Oldószer: 0,05 M kénsav.

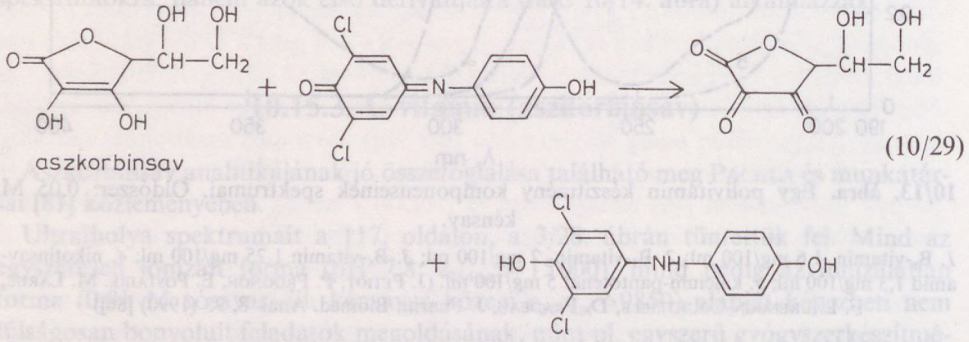
1. B_1-vitamin, 1,6 mg/100 ml; *2.* B_2-vitamin, 2 mg/100 ml; *3.* B_6-vitamin 1,25 mg/100 ml; *4.* nikotinsavamid 1,3 mg/100 ml; *5.* kalcium-pantotenát 5 mg/100 ml. (J. Petiot, P. Prognon, E. Postaire. M. Larue, F. Laurencon-Courteille, D. Pradeau, J. Pharm. Biomed. Anal. **8,** 93 (1990) [86])



10/14. ábra. A 10/13. ábra vitaminjainak első derivált spektrumai. Az oldószert, a spektrumok számozását és az irodalmi forrást lásd a 10/13. ábra szövegében

Egy másik lehetőség a szelektivitás növelésére aszkorbinsav spektrofotometriás analízisében a derivatív spektrofotometria alkalmazása [2].

Az aszkorbinsav meghatározására szolgáló, kémiai reakción alapuló módszerek túlnyomó többségét a redukáló sajátságain alapuló indirekt módszerek képezik. Ezen belül is külön csoportot alkotnak azok a módszerek, ahol egy színes reagens lép kölcsönhatásba aszkorbinsavval színtelen redukált forma képződése közben, s a mérés alapját az abszorbanciacsökkenés képezi. A klasszikus módszer a Tillman-reagens (2,6-diklór-indofenol) alkalmazásán alapul. Ennek a módszernek elsősorban fotometriás titrálási változatát használják, ahol a reagenst a titráló oldat tartalmazza, és a végpontot a feleslegbe kerülő reagens saját színe jelzi [37, 108], de széles körben alkalmazzák a módszer fotometriás változatát is számos élelmiszer- és klinikai analitikai célokra, és leírták a módszer automatizált [32, 116] és kinetikus analitikai változatát is [43, 44].



(10/29)

Ide tartoznak azok a módszerek, ahol aszkorbinsav meghatározását jód elszíntelenítésével járó redukciójára vezetjük vissza. A módszer egyik FIA változatában Lázaro és munkatársai [60] áramló klóramin T oldatba injektálják a kálium-jodid—keményítő oldatot (vak), ill. a kálium-jodid—keményítő—vizsgálandó aszkorbinsav oldatkeveréket. A klóramin T és a jodidionok reakciójából felszabaduló jód keményítőkomplexének 650 nm-es detektálása során a nagy vak-csúcsok és az aszkorbinsav koncentrációjának függvényében csökkenő minta-csúcsok különbségéből lehet az utóbbit kiszámítani, s ezt felhasználták aszkorbinsav vizeletben való meghatározására. A másik FIA változatban Hernandez-Mendez és munkatársai [42] a jodát-jodid reakció segítségével generálják a jódot; az ennek áramába injektált aszkorbinsav minták negatív csúcsként jelentkeznek. Ugyancsak FIA módszerré fejlesztették Thorburn-Burns és munkatársai [115] Muralikrishna és Murty módszerét [74], ahol az aszkorbinsav a vanadato-foszfor-volfrámsavat redukálja, és a mérés hullámhossza 360 nm.

Az aszkorbinsav redoxi sajátságain alapuló módszerek másik csoportjában az aszkorbinsav színes származékká redukálja a felhasznált reagenst. Ide tartoznak a többi között az ammónium-molibdátos módszerek, ahol az indirekt mérés alapját a redukció során keletkező molibdénkék képezi [29, 31, 113]. Ide tartoznak még azok a módszerek is, ahol az oxidálószer vas(III)ion, és a mérést a redukció során keletkező, az aszkorbinsavval ekvivalens vas(II)-ionoknak valamely szelektíven képződő,

színes komplexének mérésére alapozzuk. Ilyen komplexképzők a többi között 2-oximino-ciklohexanon-tioszemikarbazid ($\varepsilon_{516\,nm} = 14\,900$) [95], 1,10-fenantrolin [15], ($\varepsilon_{510\,nm} = 22\,000$) és a ferrozin (3-(2-piridil)-5,6-bisz-(fenil-szulfonsav)-1,2-4-triazin), ahol a moláris abszorpciós koefficiens még magasabb (27 900), s ami széles körű alkalmazásra talált [7, 22, 53, 65]. Egy hasonló reagens, a tripiridil-s-triazin enzimatikus módszerben való alkalmazását a 9.9. fejezetben ismertettük [96]. További ilyen reagensek: réz(II)—2,2′-bikinolil [105], valamint dimetoxi-dikinon [28]. Al-Tamrah [8] módszerének reagense kálium-vas(III)-cianid. Ennek az oxidációs reakció után megmaradó feleslegét ftalofenonnal (fenolftalein redukált formája) reagáltatja, s a keletkező fenolftaleint méri lúgos közegben 553 nm-nél.

A módszerek egy másik csoportjánál az aszkorbinsavat előzetesen dehidro-aszkorbinsavvá oxidáljuk, s ezt alakítjuk át spektrofotometriásan mérhető termékké. Ide tartozik az a klasszikus módszer, amelyben 2,4-dinitro-fenil-hidrazinnal kondenzálják a dehidro-aszkorbinsavat [94]; a módszer számos változata között automatizált módszer is szerepel gyógyszerkészítmények vizsgálatára [85]. Érdekes megjegyezni, hogy Wahba és munkatársai módszerében [121], ahol a reagens erősen savas fenil-hidrazin-oldat, nincs szükség előzetes oxidációra, sőt a módszer szelektív aszkorbinsavra, oxidatív bomlástermékeinek jelenlétében is.

A dehidro-aszkorbinsavvá való oxidáció után *o*-fenilén-diaminnal, ill. származékaival kinoxalin gyűrű alakítható ki, ami megfelelő szubsztituensek esetén elsősorban fluorimetriás mérés alapjait képezi, de leírták spektrofotometriás változatát is, pl. Szepesi [110] módszerében, ahol az oxidálószer higany(II)-klorid, a reagens 4,5-dimetil-*o*-fenilén-diamin ($\varepsilon_{345\,nm} = 10\,100$). Ha az előzetes oxidációs lépést elhagyjuk, a módszer alkalmas dehidro-aszkorbinsav szennyezés meghatározására is aszkorbinsavban.

Ugyancsak redoxireakción alapulnak az aszkorbinsav analitikájában használatos enzimatikus módszerek. A korábban már említett, aszkorbinsav oxidáz enzim alkalmazásán alapuló módszeren [96] túlmenően megemlítjük Thompson [114] módszerét, amelynek alapja aszkorbinsav gátló hatása a peroxidáz enzim által katalizált hidrogén-peroxid—3,5-diklór-2-hidroxi-benzol-szulfonsav—4-amino-antipirin reakcióra.

Végül az egyéb, ma már nem különösebben jelentős módszerek közül megemlítjük a diazotált 2-nitro-4-metoxi-anilinnal való oxidatív kondenzációt, ami 570 nm-nél mind manuális [101, 102], mind pedig automatizált módszerrel [124] jól mérhető termékhez vezet.

10.15.4. D-vitamin [12, 36]

Ebben a fejezetben elsősorban D_2-vitaminnal (ergokalciferol) és D_3-vitaminnal (kolekalciferol) foglalkozunk. Megállapításaink mindkét vitaminra vonatkoznak: mind a saját, mind pedig a kémiai reakciókon alapuló fényelnyelés csak a két vitamin féleségnél azonos gyűrűrendszertől származik. Az oldalláncok különbözősége nem befolyásolja számottevően a spektrumokat, így megkülönböztetésük elsősorban csak kromatográfiás módszerekkel lehetséges. A D-vitamin-származékok közül röviden kitérünk a dihidrotachiszterinre is.

A *transz-cisz*-trién jellegű D-vitamin (D_2) 265 nm-nél rendelkezik abszorpciós sávval ($\varepsilon = 18\,500$), míg a *cisz*-dién jellegű dihidrotachiszterin maximuma 251 nm-nél van ($\varepsilon = 10\,100$). Ezek a viszonylag intenzív sávok is csak egyszerűbb feladatok megoldását teszik lehetővé, mivel egyrészről a D-vitamint kísérő anyagok (pre- és provitaminok, lumiszterinek stb.), másrészről az összetett készítményekben jelenlevő többi zsíroldékony vitamin erősen zavarja a mérést.

Dihidrotachiszterint pl. csak egyszerű tablettakészítményben lehet közvetlenül meghatározni saját fényelnyelése alapján [111a]. Olajos injekcióból való meghatározása során már extrakciós, ill. rétegkromatográfiás tisztításra és/vagy algebrai háttérkorrekciós módszerek alkalmazására van szükség [45, 47], csakúgy, mint D-vitaminnak olajos oldatból való meghatározásánál [39].

D-vitamin kvantitatív analitikai célokra felhasznált színreakciói közül jelentőségét tekintve messze kiemelkedik az antimon(III)-kloriddal lejátszódó, narancssszínű komplexhez vezető reakció, aminek a kedvező hullámhosszon túlmenően további előnye a saját fényelnyelésen alapuló spektrofotometriás módszerhez viszonyítva négyszeres érzékenysége. A mind a mai napig használatos módszer [112e] alapját a módszernek az a változata képezi, ahol a szín stabilizálása céljából a reagensbe acetil-kloridot tesznek [76], és a háttér csökkentése céljából A_{500}—A_{550} abszorbanciakülönbségből számolnak [109]. A módszer szelektivitásának növelése céljából bevezetett nagyszámú módosítás közül kiemeljük maleinsavanhidrid bevitelét a reagensbe, ami Diels—Alder-reakció révén eliminálja a *transz*-D-vitamin és a tachiszterin zavaró hatását [27], mivel azonban az antimon(III)-kloridos reakciót a többi zsíroldékony vitamin is adja, olajos oldatuk analízisénél a spektrofotometriás mérést több extrakciós és oszlopkromatográfiás lépésnek kell megelőzni [73].

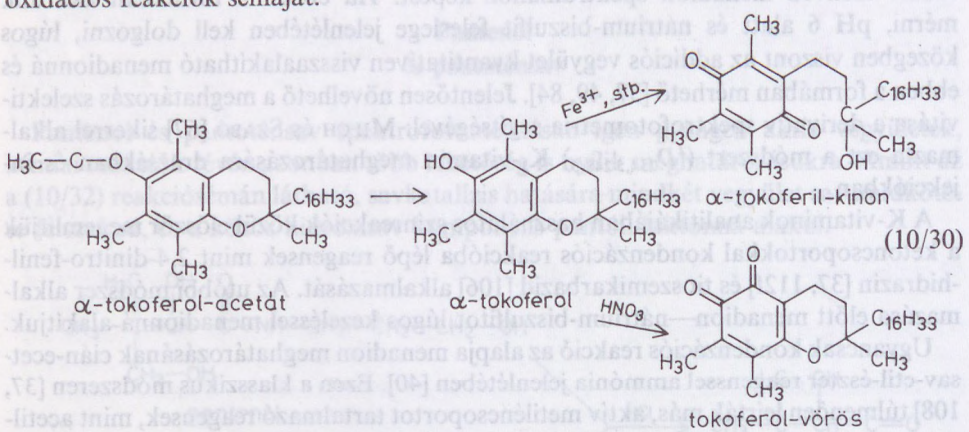
Az egyéb módszerek közül megemlítjük a következő, színes termékekhez vezető reagensek alkalmazását: ánizsaldehid—kénsav [9], trifluor-ecetsav—hidrogén-peroxid [33, 34], sósav—tetraklór-etán [38] stb.

10.15.5. E-vitamin (tokoferol)

α-Tokoferol fenoltípusú, meglehetősen kis intenzitású abszorpciós sávja, valamint az oldat könnyű oxidálhatóságából eredő bizonytalanságok nem nyújtanak jó lehetőséget ultraibolya spektrofotometriás meghatározásra. Acetátja pedig a fenol-észtereknek a szabad fenolokhoz viszonyítva észlelhető hipszokróm és hipokróm eltolódása miatt még kevésbé alkalmas spektrofotometriás meghatározásra. Említést érdemel, hogy a derivatív spektrofotometriát felhasználták α-tokoferol meghatározására ($^1D_{291}$) kapszulában szójaolaj jelenlétében [62].

A leírtak miatt E-vitamin spektrofotometriás analízisében kizárólag a kémiai reakciókra alapozott módszereknek van jelentősége. Valamennyi számottevő módszer a hidrokinon típusú szabad E-vitamin könnyű oxidálhatóságán alapul; acetátját a módszerek alkalmazása előtt el kell hidrolizálni. (Egyéb fontos fenolmeghatározási módszerek alkalmazását az akadályozza meg, hogy a fenolgyűrű valamennyi szénatomja szubsztituálva van.)

A (10/30) reakciósémán tüntettük fel a tokoferol meghatározásai során lejátszódó oxidációs reakciók sémáját.



Akárcsak az aszkorbinsav esetében, az oxidálószerek közül itt is főszerepet játszanak a vas(III)sók olyan komplexképző reagens jelenlétében, amely az oxidáció során keletkező vas(II)ionokkal intenzív színű, stabilis komplexet képez. A klasszikus reagens a 2,2′-dipiridil [37, 108, 111b], de leírták pl. 1,10-fenantrolin [37], 5,6-difenil-3-(2--piridil)- 1,2,4-triazin [55], valamint ennek diszulfonsavszármazéka (ferrozin) [4] felhasználását is. Ez utóbbi reagens hatására keletkező abszorpciós maximum 562 nm-nél jelenik mg; $\varepsilon = 28\,000$. Mint tipikus fenolreagens, szerephez jutott a foszfor--molibdénsav is [37]. Ezeknek a reagenseknek — amelyek a (10/30) reakcióséma felső egyenlete szerint fejtik ki hatásukat — alkalmazása során természetesen számolni kell redukálószerek és A-vitamin zavaró hatásával, ezért a módszereknek számos, kromatográfiás elválasztással kombinált változata ismeretes.

Ha az oxidációt salétromsavval végezzük el, tokoferolvörös keletkezik (lásd a 10/30 reakcióséma alsó egyenletét). Ennek mérése maga is alapját képezi régóta használatos módszereknek [37, 108], de ismeretes olyan módszer is, ahol a reakciótermék ketoncsoportját 4-dimetil-amino-anilinnel kondenzálják 620 nm-nél közepes intenzitású maximummal rendelkező termék keletkezése közben ($\varepsilon = 4950$) [100].

10.15.6. K-vitaminok

Ebben a fejezetben az 1,4-naftokinon alapú K-vitaminok közül elsősorban a 2-metil-3-fitil származékkal (fitomenadion K_1-vitamin), a 2-metil származékkal (K_3-vitamin, menadion, menafton), ez utóbbi redukált származékával (K_4-vitamin, menadiol), valamint menadion nátrium-biszulfitos addíciós vegyületével foglalkozunk.

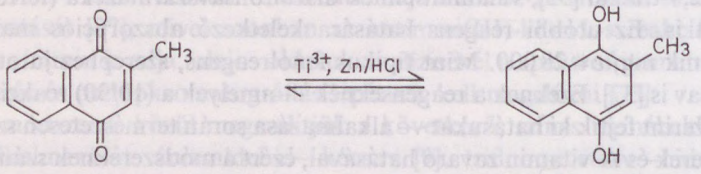
Az 1,4-naftokinon típusú alapvegyületek intenzív és strukturált spektrummal rendelkeznek. Fitomenadion maximumértékei pl. a következők: $\varepsilon_{245\,nm} = 17\,940$; $\varepsilon_{249\,nm} = 18\,930$ $\varepsilon_{263\,nm} = 17\,350$; $\varepsilon_{271\,nm} = 17\,580$; $\varepsilon_{327\,nm} = 3110$ (oldószer izooktán). Kvantitatív analitikai célokra elsősorban a 249 nm-es intenzív maximumot használják [18e, 18f, 37], de felhasználták a hosszúhullámú, kis intenzitású, viszont legszelek-

tívebb maximumot is [49]. Menadion—nátrium-biszulfit spektruma hipszokróm eltolódást szenved menadion spektrumához képest. Ha ebben a formában akarunk mérni, pH 6 alatt és nátrium-biszulfit feleslege jelenlétében kell dolgozni, lúgos közegben viszont az addíciós vegyület kvantitatíven visszaalakítható menadionná és ebben a formában mérhető [37, 49, 84]. Jelentősen növelhető a meghatározás szelektivitása a derivatív spektrofotometria segítségével: MILCH és SZABÓ [67] sikerrel alkalmazta ezt a módszert ($^2D_{254,5\,248,5}$) K_1-vitamin meghatározására drazsékban és injekciókban.

A K-vitaminok analitikájában használatos színreakciók közül először megemlítjük a ketoncsoportokkal kondenzációs reakcióba lépő reagensek mint 2,4-dinitro-fenil-hidrazin [37, 112f] és tioszemikarbazid [106] alkalmazását. Az utóbbi módszer alkalmazása előtt menadion—nátrium-biszulfitot lúgos kezeléssel menadionná alakítjuk.

Ugyancsak kondenzációs reakció az alapja menadion meghatározásának cián-ecetsav-etil-észter reagenssel ammónia jelenlétében [40]. Ezen a klasszikus módszeren [37, 108] túlmenően leírták más, aktív metiléncsoportot tartalmazó reagensek, mint acetil-aceton, malonsav-dietil-észter [40], valamint 3-metil-1-fenil-pirazolin-5-on [83] alkalmazását is.

Számos olyan módszer is ismeretes, amely a K-vitaminok, ill. redukált származékaik közti reverzíbilis redoxireakción alapul. A menadion—menadiol átalakulást a (10/31) reakciósémán ábrázoltuk.



menadion menadiol (10/31)

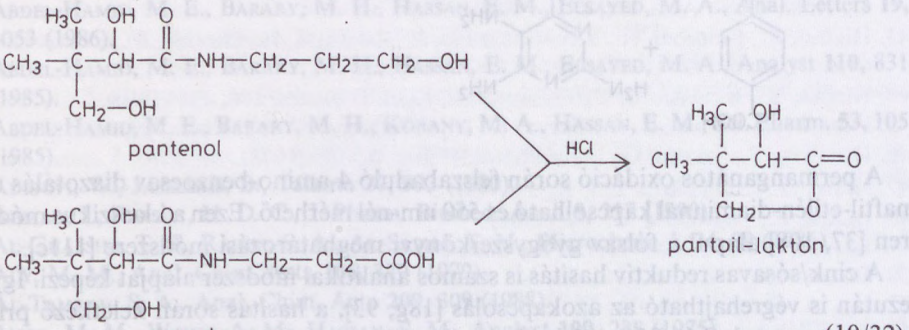
VIRE és PATRIARCHE [119] módszerében menadion és egyéb K-vitaminok meghatározására a redukálószer Ti(III)-szulfát, a keletkezett menadiolt pedig Ti(IV)komplexe alakjában mérik. REDDY és munkatársai [92] cink-sósavval végzik el a redukciót. Ezt úgy határozzák meg, hogy jóddal visszaoxidálják menadionná, és az elreagálatlan jódot mérik spektrofotometriásan.

Végül megemlítjük, hogy menadion mérsékelten intenzív, de stabilis kék színű termék keletkezése közben reagál tömény sósav—cink-klorid reagenssel (ezt a reakciót a természetes K-vitaminok nem adják). A módszer felhasználható menadiol meghatározására is, ha azt előzetesen hidrogén-peroxiddal menadionná oxidáljuk [37].

10.15.7. Egyéb vitaminok

Pantenol és pantoténsav

Pantenol és pantoténsav spektrofotometriásan igen gyengén aktív vegyületek, kémiai reakciók révén azonban több lehetőség is nyílik meghatározásukra. Amint az a (10/32) reakciósémán látható, savkatalízis hatására mindkét vegyület savamidkötése felszakad, és a közös hidroxisav komponens pantoil-laktonná alakul.



(10/32)

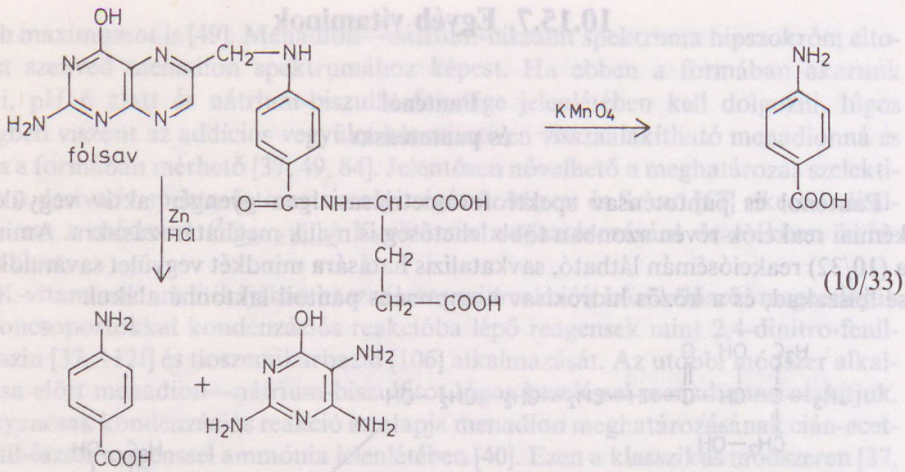
Pantoil-lakton meghatározható a vas(III)-hidroxámsavas módszerrel [48], de ez a módszer a (10/32) reakcióegyenlet alapján alkalmas pantenol és pantoténsav indirekt meghatározására is [37].

A (10/32) reakcióséma szerinti hidrolízisnél a pantoil-lakton mellett γ-amino-propanol, ill. β-amino-propionsav is keletkezik, s ezek is alapját képezik analitikai módszereknek. Az ezekre alapozott módszerekben azonban a hidrolízist általában inkább lúgos kezeléssel hajtják végre. Az aminovegyületeket meghatározhatjuk pl. 1,2-naftokinon-4-szulfonsavval való reakció után [37, 108] vagy ninhidrines módszerrel. Ez utóbbi módszert igen gyors cink/sósavas hidrolízis után is alkalmazni lehet [56].

Fólsav

A glutaminsav, 4-amino-benzoesav és szubsztituált pteridin egységekből felépülő fólsavmolekulájában a két utóbbi, egymástól izolált egység spektrofotometriásan aktív: innen származik a fólsav intenzív, strukturált, kvantitatív mérésekre kiválóan alkalmas spektruma ($\varepsilon_{256\,nm} = 26\,000$, $\varepsilon_{283\,nm} = 25\,400$, $\varepsilon_{365\,nm} = 9100$; oldószer 0,1 M nátrium-hidroxid).

Fólsav kvantitatív analitikai célra szolgáló színreakciói a molekula olyan hasításai után hajthatók végre, amikor egyrészről felszabadul a 4-amino-benzoesav egység, ill. ezen túlmenően további aminocsoportok szabadulnak fel. Amint az a (10/33) reakcióséma látható, ez egyrészről enyhén lúgos közegben végrehajtott permanganátos oxidációval vagy cink/sósavas reduktív hasítással hajtható végre.



(10/33)

A permanganátos oxidáció során felszabaduló 4-amino-benzoesav diazotálás után naftil-etilén-diaminnal kapcsolható és 550 nm-nél mérhető. Ezen a klasszikus módszeren [37, 108] alapul a fólsav gyógyszerkönyvi meghatározási módszere [111c].

A cink/sósavas reduktív hasítás is számos analitikai módszer alapját képezi. Így pl. ezután is végrehajtható az azokapcsolás [18g, 93], a hasítás során keletkező primer aminocsoportok Schiff-bázis képzése 4-dimetil-amino-fahéj-aldehiddel [93], ninhidrines [88] vagy 1,2-naftokinon-4-szulfonsavas reakciója [54].

Biotin

Spektrofotometriás meghatározási lehetőségeit illetően a bevezetésben idézett monográfiára utalunk [108].

Rutin

A flavonoid-glükozid típusú rutin (P-vitamin) saját spektruma intenzív sávjaival (etanolos közegben $\varepsilon_{257\,nm} = 19\,800$; $\varepsilon_{365\,nm} = 16\,800$), különösen a rutin sárgás színét biztosító hosszabb hullámú sáv számos gyógyszer-analitikai feladat megoldását teszi lehetővé. A mérés szelektivitása tovább növelhető, ha a fenol típusú anyag spektrumát a fenolát forma jelenlétét biztosító híg lúgos közegben vesszük fel; pl. 0,005 M nátrium-hidroxidban, amikor is a maximum 415 nm-ig tolódik el. Ilyen körülmények között a meghatározást egyebek között aszkorbinsav, piridoxin, tiamin, nikotinsav sem zavarják [107]. Kb. hasonló mértékű batokróm eltolódás érhető el, ha — ugyancsak a vegyület fenol jellegét kihasználva — azokapcsolásos reakciót használunk a meghatározásra kapcsoló reagensként pld. diazotált szulfanilsavat [50] vagy 4-nitro-2-klór-anilint [91] alkalmazva. Egy másik, mind kvalitatív, mind pedig kvantitatív analitikai célokra felhasználható reakciója: redukciója naszcensz hidrogénnel (cinksósav, magnézium-sósav) [63], amikor is a heterogyűrű aromatizálódása (oxóniumsó képződése) közben az abszorpciós maximum 540 nm-ig tolódik el. További lehetősé-

geket jelentenek rutin meghatározására a fémkomplexek képződésén alapuló módszerek, amelyek közül alumínium [35] és nikkel [87] alkalmazását említjük meg.

Rutin analitikájának fontos feladata aglikonjának, a kvercetinnek mint szennyezésének meghatározása. Ennek spektruma ($\lambda_{max} = 380$ nm), valamint reakciói erősen hasonlítanak a glükozidéhoz, s így a meghatározásra szolgáló megbízható módszerek kromatográfiás elválasztási lépést tartalmaznak.

Irodalom

1. Abdel-Hamid, M. E., Barary, M. H., Hassan, E. M., Elsayed, M. A., Anal. Letters **19,** 1053 (1986).
2. Abdel-Hamid, M. E., Barary, M. H., Hassan, E. M., Elsayed, M. A., Analyst **110,** 831 (1985).
3. Abdel-Hamid, M. E., Barary, M. H., Korany, M. A., Hassan, E. M., Sci. Pharm. **53,** 105 (1985).
4. Adeniyi, W., Jaselskis, B., Talanta **27,** 993 (1980).
5. Ahmad, I., Rapson, H. D. C., J. Pharm. Biomed. Anal. **8,** 217 (1990).
6. Al-Ghabsha, T. S., Rahim, S. A., Al-Sabha, T. N., Microchem. J. **34,** 89 (1986).
7. Aly, M. M., Anal. Chim. Acta **106,** 379 (1979).
8. Al-Tamrah, S. A., Anal. Chim. Acta **209,** 309 (1988).
9. Amer, M. M., Wahbi, A. M., Hassan, S. M., Analyst **100,** 238 (1975).
10. Ashraf, M., Rapson, H. D. C., J. Pharm. (Lahore) **1,** 1 (1979).
11. Baczyk, S., Swidzinska, K., Farm. Pol. **31,** 399 (1975).
12. Bartos, J., Pesez, M., Colorimetric and Fluorimetric Analysis of Steroids. Academic Press, London 1976, 78—118. old.
13. Baudino, O. M., De Pedernera, M. B. M., Boll. Chim. Farm. **126,** 385 (1987).
14. Bayer, J., Pharmazie **19,** 602 (1964).
15. Besada, A., Talanta **34,** 731 (1987).
16. Blake, J. A., Moran, J. J., Can. J. Chem. **54,** 1757 (1976).
17. Blazis, I., Malat, M., Chem. Listy **75,** 312 (1981).
18. British Pharmacopoeia 1988, Her Majesty's Stationery Office, London, 1988. a. 999; b. 163; c. 777; d. 973; e. 443; f. 986; g. 257.
19. Bruno, P., Anal. Letters **14,** 1493 (1981).
20. Budowski, P., Bondi, A., Analyst **82,** 751 (1957).
21. Burger, K., Talanta **10,** 573 (1963).
22. Butts, W. C., Mulvihill, H. J., Clin. Chem. **21,** 1493 (1975).
23. Carr, F. A., Price, E. A., Biochem. J. **20,** 497 (1926).
24. Celletti, P., Moretti, G. P., Petrangeli, B., Farmaco, Ed. Prat. **31,** 413 (1976).
25. Ciesielski, W., Chem. Anal. **31,** 469 (1986).
26. Das Gupta, V., Cadwallader, D. E., J. Pharm. Sci. **57,** 112 (1968).
27. De Vries, E. J., Mulder, F. J., Borsje, B., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **60,** 989 (1977).
28. Eldawy, M. A., Tawfik, A. S., Elshabouri, S. R., Anal. Chem. **47,** 461 (1975).
29. El Sayed, E., Raafat, S., Talanta **26,** 1664 (1979).
30. Elsayed, M. A.-H., Belal, S. F., Elwalily, A.-F. M., Abdine, H., J. Pharm. Sci. **68,** 739 (1979).
31. Emelyanenko, K. V., Farm. Zh. 73 (1986).
32. Garry, P. J., Owen, G. M., Lashley, D. W., Ford, P. C., Clin. Biochem. **7,** 131 (1974).

33. Gharbo, S. A., Gosser, L. A., Analyst **99,** 222 (1974).
34. Gharbo, S. A., Gosser, L. A., J. Pharm. Sci. **64,** 1196 (1975).
35. Glasl, H., Z. Anal. Chem. **321,** 325 (1985).
36. Görög, S., Quantitative Analysis of Steroids. Akadémiai Kiadó, Budapest—Elsevier, Amsterdam 1983, 292—296. old.
37. Hashmi, M., Assay of Vitamins in Pharmaceutical Preparations. Wiley, New York 1973.
38. Hassan, S. M., Z. Anal. Chem. **293,** 416 (1978).
39. Hassan, S. M., J. Assoc Off. Anal. Chem. **62,** 545 (1979).
40. Hassan, S. S. M., Abd El Fattah, M. M., Zaki, M. T. M., Z. Anal. Chem. **275,** 115 (1975).
41. Hayden, K. J., Analyst **82,** 61 (1957).
42. Hernandez-Mendez, J., Alonso Mateos, A., Almendral-Parra, M. J., Garcia de Maria, C., Anal. Chim. Acta **184,** 243 (1986).
43. Hiromi, K., Fujimori, H., Yamaguchi-Ito, J., Nakatani, H., Ohnishi, M., Tonomura, B., Chem. Letters 1333 (1977).
44. Hiromi, K., Kuwamoto, C., Ohnishi, M., Anal. Biochem. **100,** 421 (1980).
45. Hom, F. S., Veresh, S. A., Ebert, W. R., J. Assoc. Off. Anal.Chem. **60,** 48 (1977).
46. Horváth, P., Szepesi, G., Acta Pharm. Hung. **48,** 199 (1978).
47. Hrdy, O., Zbl. Pharm. **113,** 1255 (1974).
48. Illner, E., Pharmazie **35,** 186 (1980).
49. Ismaiel, S. A., Yassa, D. A., Pharmazie **30,** 407 (1975).
50. Jablonowski, W., Acta Pol. Pharm. **32,** 251 (1975).
51. Jan, A., Ali, H., Ashraf, M., J. Pharm. (Lahore) **1,** 12 (1979).
52. Jarzebinski, J., Ciszewska, M., Suchoki, P., Szrajber, Z., Acta Pol. Pharm. **38,** 461 (1981).
53. Jaselskis, B., Nelapaty, J., Anal. Chem. **44,** 379 (1972).
54. Kanjilal, G., Mahajan, S. N., Rao, G. R., Analyst **100,** 19 (1975).
55. Kanno, C., Yamauchi, K., Agric. Biol. Chem. **41,** 593 (1977).
56. Karawya, M. S., Ghourab, M. G., Ibrahim, E. S., J. Ass. Off. Anal. Chem. **57,** 1357 (1974).
57. Krishnan, M. V. S., Mahajan, S. N., Rao, G. R., Analyst **101,** 601 (1976).
58. Lau, O. W., Luk, S. F., Wong, K. S., Analyst **112,** 1023 (1987).
59. Lau, O. W., Luk, S. F., Wong, K. S., Analyst **111,** 665 (1986).
60. Lázaro, F., Rios, A., Luque de Castro, M. D., Valcárcel, M., Analyst **111,** 163, 167 (1986).
61. Lou, Y., Wang, Y., Wang, M., Chen, D., Lin, J., Xu, S., Hong, D., Yaowu Fenxi Zazhi **3,** 137 (1983).
62. Lu, X., Yaowu Fenxi Zazhi **6,** 292 (1986).
63. Lukyanchikova, G. I., Tiraspolskaya, S. G., Lukyanchikov, M. S., Farmatsiya **33,** 70 (1984).
64. Lukyanchikova, G. I., Tiraspolskaya, S. G., Lukyanchikov, M. S., Farmatsiya **34,** 60 (1985).
65. McGown, E. L. Rusnak, M. G., Lewis, C. M., Tillotson, J. A., Anal. Biochem. **119,** 51 (1982).
66. Medina-Escriche, J., Hernandez-Llorens, M. L., Llobat-Estelles, M., Sevillano-Cabeza, A., Analyst **112,** 309 (1987).
67. Milch, Gy., Szabó, É., Analusis **16,** 59 (1988).
68. Mitsui, T., Fujimura, Y., Bunseki Kagaku **32,** 264 (1983).
69. Morton, R. A., Stubbs, A. L., Analyst **71,** 348 (1946).
70. Morton, R. A., Stubbs, A. L., Biochem. J. **41,** 525 (1947).
71. Moussam A.-F. A., Microchim. Acta 169 (1982).
72. Moussa, A. E.-F. A., Hassan, S. M., Pharmazie **32,** 50 (1977).

73. Mulder, F. J., De Vries, E. J., Borsje, B., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **60,** 151 (1977).
74. Muralikrishna, U., Murty, J. A., Analyst **114,** 407 (1989).
75. Namigohar, F., Ghanbarpour, A., Beltran, D., Ann. Pharm. Fr. **39,** 445 (1981).
76. Nield, C., H., Russel, W. C., Zimmerli, A., J, Biol. Chem. **136,** 73 (1940).
77. Nirmalchandar, V., Balasubramanian, N., Analyst **113,** 1097 (1988).
78. Nirmalchandar, V., Viswanathan, R., Balasubarmanian, N., Analyst **112,** 653 (1987).
79. Nudelman, N. S., Nudelman, O., J, Pharm. Sci. **65,** 65 (1976),
80. Official Methods of Analysis, Association of Official Agricultural Chemists, Washington, 1960, 660. old.
81. Pachla, L. A., Reynolds, D. L., Kissinger, P. T., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **68,** 1 (1985).
82. Park, J. Y., Anal. Chem. **47,** 452 (1975).
83. Patel, J. C., Mehta, R, C., Shastri, M. R., Indian J. Pharm. Sci. **37,** 141 (1975).
84. Pawelczyk, E., Marciniec, B., Acta Pol. Pharm. **39,** 387 (1982).
85. Pelletier, O., Brassard, R., J. Assoc. Off. Anal. Chem. **58,** 104 (1975).
86. Petiot, J., Prognon, P., Postaire, E., Laure, M., Laurencon-Courteille, F., Pradeau, D., J. Pharm. Biomed. Anal. **8,** 93 (1990).
87. Radovic, Z., Malesev, D., Acta Polon. Pharm. **44,** 433 (1987).
88. Rao, G. R., Mahajan, S. N., Kanjilal, G., Mohan, K. R., J. Ass. Off. Anal. Chem. **60,** 531 (1977).
89. Rao, G. R., Sivaramakrishnan, M. V., Kanjilal, G., Srivastava, C. M. R., Indian J. Pharm. Sci. **41,** 203 (1979).
90. Rapaport, L. I., Fleish, N. L., Proshunina, D. V., Farm. Zh. 48 (1987).
91. Reddy, M. N., Sastry, C. S. P., Sankar, D. G., Singh, N. R. P., Ind. J. Pharm. Sci. **49,** 231 (1987).
92. Reddy, M. N., Sastry, C. S. P., Viswanadham, N., J. Inst. Chem. **57,** 57 (1985).
93. Reddy, M. N., Viswanadham, N., Sastry, C. S. P., Indian Drugs **21,** 460 (1984).
94. Roe, J. H., Kuether, C. A., J. Biol. **147,** 399 (1943).
95. Salinas, F., Diaz, T. G., Analyst **113,** 1657 (1988).
96. Samyn, W., Clin. Chim. Acta **133,** 111 (1983).
97. Sane, R. T., Vaidya, U. M., Deodhar, K. D., Indian J. Pharm. Sci. **40,** 72 (1978).
98. Sastry, C. S. P., Rajendraprasad, S. N., Reddy, M. N., Indian Drugs **23,** 242 (1986).
99. Sastry, C. S. P., Singh, N. R., Reddy, M. N., Analusis **14,** 355 (1986).
100. Sastry, C. S. P., Singh, N. R. P., Reddy, M. N., Reddy, R. V. R., Indian Drugs **23,** 633 (1986).
101. Schmall, M., Pifer, C. W., Wolish, E. G., Anal. Chem. **25,** 1486 (1953).
102. Schmall, M., Pifer, C. W., Wolish, E. G., Buschinsky, R., Gainer, H., Anal. Chem. **26,** 1520 (1954).
103. Schmidiger, O., Z. Anal. Chem. **274,** 382 (1975).
104. Sethi, P. D., Chatterjee, P. K., Kumar, Y., Indian J. Pharm. Sci. **47,** 118 (1985).
105. Shieh, H. H., Sweet, T., Anal. Biochem. **96,** 1 (1979).
106. Sidhom, M. B., El-Kommos, M. E., J. Assoc. Off. Anal. Chem.. **65,** 141 (1982).
107. Sivitskaya, O. K., Rubinskaya, V. G., Kuleshova, M. I., Guseva, L. N., Farmatsiya **26,** 81 (1977).
108. Strohecker, R., Henning, H. M., Vitamin-Bestimmungen. Verlag Chemie, Weinheim 1963.
109. Stross, P. S., Brealey, L., J. Pharm. Pharmacol. **7,** 739 (1955).
110. Szepesi, G., Z., Anal. Chem. **265,** 334 (1973).
111. The United States Pharmacopoeia XXI. USP Convention Inc., Rockville, Md., 1985. a. 331; b. 1213; c. 1202.

112. The United States Pharmacopoeia XXII, USP Convention Inc., Rockville, Md., 1990. a. 1550; b. 363—364; c. 943; d. 1539; e. 1553; f. 819.
113. Thind, P. S., Kumar, S., Indian Drugs **21,** 153 (1984).
114. Thompson, R. Q., Anal. Chem. **59,** 1119 (1987).
115. Thorburn Burns, D., Chimpalee, N., Chimpalee, D., Rattanariderom, S., Anal. Chim. Acta **243,** 187 (1991).
116. Vander-Jagt, D. J., Garry, P. J., Hunt, W. C., Clin. Chem. **32,** 1004 (1986).
117. Vasilikiotis, G. S., Kouimtzis, T. A., Voulgaropoulos, A., Microchem. J. **22,** 479 (1977).
118. Verma, K. K., Jain, A., Verma, A., Chaurasia, A., Analyst **116,** 641 (1991).
119. Vire, J. C., Patriarche, G. J., J. Pharm. Belg. **31,** 139 (1976).
120. Viswanath, K. K., Sivaprasad, R. A., Sivaramakrishnan, M. V., Indian J. Pharm. Sci. **48,** 80 (1986).
121. Wahba, N., Yassa, D. A., Labib, R. S., Analyst **99,** 397 (1974).
122. Wahbi, A. M., Belal, S., Abdine, H., Bedair, M., Analyst **106,** 960 (1981).
123. Wahbi, A.-A. M., Abounassif, M. A., Alkahtani, H. M. G., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 39 (1989).
124. Wilson, S., Guillan, R. A., Clin. Chem. **15,** 282 (1969).

10.16. Fémek és néhány más elem meghatározása gyógyszerekben

10.16.1. Bevezetés

Fémek spektrofotometriás meghatározása gyógyszer-alapanyagokban és gyógyszerkészítményekben nem tartozik a korszerű gyógyszeranalízis legfontosabb feladatai közé. Ennek oka egyrészről az, hogy a szintetikus szerves gyógyszerek túlsúlyba kerülésével a fémtartalmú gyógyszerek jelentősége az utolsó évtizedekben jelentősen csökkent. Másrészről a fémtartalmú készítmények analitikájában a komplexometriás, a spektrofotometriás módszerek közül pedig az atomabszopciós módszerek kerültek előtérbe.

Nem elhanyagolható azonban a jelentősége a színes komplexek képződésére alapozott spektrofotometriás módszereknek sem: a kolorimetriás fémanalitika számos módszerét adaptálták gyógyszer-analitikai vizsgálatok céljaira is. A nem kifejezetten gyógyszer-analitikai jellegű, szerves komplexképző reagensekkel való kölcsönhatásra alapozott spektrofotometriás analízissel foglalkozó számos monográfia közül Sandell [41, 42], Snell [43], Burger [6], Upor[47] és Marczenko [29] műveire utalunk, a gyógyszer-analitikai klasszikus irodalom vonatkozásában pedig Medwick [31] fejezetére Higuchi és Brochmann-Hanssen könyvében.

A fejezetet néhány más elem spektrofotometriás meghatározási lehetőségeinek rövid összefoglalásával zárjuk.

10.16.2. Vas meghatározása

Kétértékű vasat tartalmazó gógyszerkészítmények spektrofotometriás analízisének klasszikus reagense a 2,2′-dipiridil. Az enyhén savas közegben gyorsan végbemenő és intenzív piros színű komplex képződéséhez vezető reakció alkalmas kis mennyiségű vas(II) meghatározására ($\varepsilon_{522\,nm} = 8700$ [29]. Ez a módszer (pH 4,6-os acetátpuffer alkalmazásával) gyógyszerkönyvi felhasználást is talált pl. vas(II)-glukonát kapszula [46c], ill. vas(II)-szorbitex injekció [46d] mérésére. Vas(II)- és vas(III)ionokat egyidejűleg tartalmazó készítmények analízisét úgy lehet elvégezni, hogy a vas(II)tartalmat közvetlenül mérjük az ismertetett módszerrel; az összes vastartalmat a vas(III)ionok aszkorbinsavas redukciója után határozhatjuk meg, a vas(III)tartalom a két mérés különbségéből számítható ki [44].

A 2,2′-dipiridilhez hasonló módon alkalmazható vas(II) mérésére a hasonló szerkezetű 1,10-fenantrolin, ill. annak 4,7-difenil-származéka; ezek esetében az érzékenység nagyobb: $\varepsilon = 11\,000$, ill. 22 400 [29]. Az ugyancsak széles körben alkalmazott triazin-származékok mint vas(II)reagensek közül a ferrozin (3-(2-piridil)-5,6-bisz-(4-szulfofenil)-1,2,4-triazin-dinátrium) talált gyógyszer-analitikai alkalmazásra ($\varepsilon_{562\,nm} = 28\,000$) [24]. A vas(II) meghatározására felhasznált számos más reagens közül a 8-hidroxi-7-nitrozo-kinolin-5-szulfonsavas nátrium [10], valamint a rutin [25] gyógyszer-analitikai alkalmazásait említjük meg ($\lambda_{max} = 710$, ill. 600 nm).

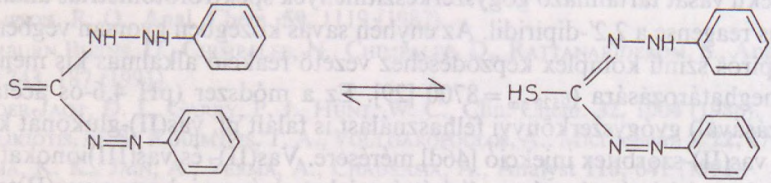
Vas(III)ionok legáltalánosabban használt spektrofotometriás reagense a rodanid-ion. Ammónium-rodanid nagy feleslege jelenlétében és optimálisan 0,05—0,2 M ásványi sav koncentráció mellett a jellegzetes piros színű komplex moláris abszorpciós koefficiense 8500; ez 50% acetonnak a reakcióelegybe való bevitelével 18 000-re növelhető [29]. Mind az érzékenység, mind pedig a módszer szelektivitása tovább növelhető a színes komplex szerves oldószeres extrakciójával. Vas(III)nak a legkülönbözőbb gyógyszerkészítményekben (vas-nátrium-glukonát injekció, vas-szaccharát injekció, vas-kondroitin-szulfát kapszula, vas-protein tabletta stb.) való szelektív és igen érzékeny meghatározására sikerrel alkalmazták reagensként a trifluor-acetil-acetont, amelynek enol formája pH 1-nél hexánnal jól extrahálható és 435 nm-nél mérhető kelátot képez vas(III)ionokkal [36].

Érdekes megjegyezni, hogy vas(III)ionok pH 9-nél 1 : 1 : 2 arányú terner komplexet képeznek szalicilátionokkal és purpurinnal (1,2,4-trihidroxi-antrakinon), amely 4-metil-pentán-2-onnal való extrakció után 590 nm-nél mérhető. A komplex rendkívül intenzív fényelnyelése ($\varepsilon = 47\,000$) lehetővé teszi pl. 10^{-5}% nagyságrendű vas szennyezés mérését szalicilátokban, ill. acetil-szalicilátokban [7].

10.16.3. Higany meghatározása

Higany spektrofotometriás meghatározásának legszélesebb körben alkalmazott reagense kétségkívül a ditizon (difenil-tiokarbazon), amelynek jelentőségét fémek kolorimetriás analízisében jól jellemzi a róla írt két monográfia [21, 22]. Számos egyéb fém között (vas, réz, cink, bizmut, ezüst, ólom stb.) a higany(II)ionok is igen stabilis, intenzív narancssszínű, kloroformmal vagy szén-tetrakloriddal jól extrahálható 2 : 1

arányú komplexet képeznek ezzel a reagenssel. A komplexképződés során a fémiontól és a reakció körülményeitől függően a reagens keto vagy enol formája reagál.



ditizon tioketon forma tioenol forma (10/34)

Szén-tetrakloridos közegben a ditizon abszorpciós maximuma 620 nm-nél van ($\varepsilon = 32\,000$). A komplexképződés hatására hipszokróm eltolódás következik be; higany(II) esetében az abszorpciós maximum 485 nm-nél jelentkezik ($\varepsilon = 71\,200$). Hasonló a helyzet a korábban felsorolt és más fémekkel is. A mérés szelektivitását a pH alkalmas megválasztásával lehet növelni. Higany(II) pl. igen erősen savas (több mólos ásványi savas) oldatból is extrahálható, ami a felsoroltak közül csak ezüst(I)- és réz(II)ionok esetében következik be. A szelektivitás maszkírozószerek alkalmazásával tovább növelhető. Ennek részleteit illetően a hivatkozott monográfiákra utalunk [6, 21, 22, 29].

Ami a méréstechnikát illeti, a reagens felesleg és a komplex bizonyos mértékig átfedő spektruma miatt vagy el kell távolítani a mérés előtt a reagens feleslegét a szerves fázis lúgos-vizes extrakciójával, vagy a reagens feleslegének jelenlétében mérünk a komplex maximumán, és hasonló körülmények között felvett kalibrációs egyenes segítségével végezzük el a számítást. További lehetőség a komplex elbontása az extraktum megfelelő reagenssel való kirázásával (pl. kálium-jodiddal, ami a higany(II)-t stabilis jodid-komplexbe viszi). A komplex elbomlása során felszabaduló ditizon 620 nm-nél mérhető; a higanytartalomra a jodidos kezelés előtti és utáni fényelnyelés különbségéből számolhatunk. Olyan indirekt megoldás is használatos, ahol a mérés alapja a diklór-metánban oldott ditizon 605 nm-en mért abszorbancia-csökkenése az enyhén savas oldatban vele kölcsönhatásba lépő higanytartalmú gyógyszer hatására [11].

A gyógyszer-analitikai gyakorlatban gyakran használják a módszer vizuális, félkvantitatív változatát, a komplex színe ui. narancssárga, míg a reagens zöld. Pl. a vas(II)-fumarát higany szennyezésének meghatározása során összehasonlító oldathoz való viszonyítással limitálják a higany mennyiségét [46b].

A ditizonos módszer alkalmas egyszerűbb szerves higanyvegyületek, pl. metil-merkuri vagy fenil-merkuri sók közvetlen mérésére [11, 23], összetettebb vegyületek esetében azonban előzetes oxidatív roncsolást kell végezni [39, 40].

A ditizonon kívül számos más, színes komplexet adó szerves reagens is alkalmazásra került higanytartalmú gyógyszerek analízisében. Ezek közül pl. 1-szalicilidén-5-(2-piridil-metilidén)-izotiokarbono-hidrazid stabilis 2:1 arányú komplexet képez a higany(II)ionokkal. Dimetilformamid—víz elegyben 400 nm-nél a moláris abszorpciós koefficiens 64 000. A módszer érzékenysége tehát összehasonlítható a ditizonos módszerével; előnye, hogy nincs szükség extrakcióra és a reagens fényelnyelése elhanyagolható a mérés hullámhosszán [40].

10.16.4. Bizmut meghatározása

Bizmut(III) spektrofotometriás meghatározásának legegyszerűbb reagense a jodidion: erősen savas közegben kálium-jodid nagy feleslegével tetrajodo-bizmutát komplex anion képződik, ami a tetrabutil-ammónium kationnal ionpárt képez. Ez kloroformmal extrahálható és 490 nm-nél mérhető ($\varepsilon = 11\,300$). A jodidionból való jódképződés megakadályozására ennél a módszernél hipofoszforossavat alkalmaztak antioxidánsként [17]. A módszer egy másik változatában [27] az extraháló oldószer izobutil-alkohol, az antioxidáns pedig aszkorbinsav.

A bizmut spektrofotometriás analízisében gyógyszer-analitikai célokra használt szerves reagensek közül a már a higany meghatározásával foglalkozó előző fejezetben bemutatott ditizont [6, 21, 22, 29] ($\varepsilon_{490\,nm} = 79\,200$), valamint az 1-szalicilidén-5-(2-piridil-metilidén)-izotiokarbono-hidrazidot [32] ($\lambda_{max} = 421$ nm) említjük meg, a kisebb érzékenységű, ultraibolya spektrumtartományban elnyelő termékhez vezető reagensek közül pedig az *N*-karbamoil-metil-iminodiecetsavat [14] ($\varepsilon_{265\,nm} = 9100$) és a mucussavat [13] ($\varepsilon_{245\,nm} = 6500$). Leírták még tiokarbamid felhasználását is ($\varepsilon_{470\,nm} = 9000$) [8].

10.16.5. Egyéb fémek meghatározása

A gyógyszerkémiai szempontból kisebb jelentőségű fémek közül az ezüst, réz, ólom és cink spektrofotometriás meghatározásának legfontosabb reagense a ditizon. A szén-tetrakloriddal extrahálható komplexek néhány fontos adatát a 10/10. táblázat tartalmazza.

A részleteket illetően a 10.16.3. fejezetre és az ott összegyűjtött irodalomra utalunk. Megemlítjük, hogy a ditizonos-spektrofotometriás módszer az USP XXII-ben is hivatalos gyógyszerek ólomszennyezésének mérésére [46f].

A felsoroltak közül réz(II)ionok meghatározásának igen gyakran alkalmazott reagense a nátrium-dietil-ditiokarbamát, ami szén-tetrakloridba átrázható intenzív sárga színű komplexet képez ($\varepsilon_{436\,nm} = 14\,000$) [6, 29]. A gyógyszer-analitikai szempontból fontos potenciális zavaró ionok közül a vas etilén-diamin-tetraacetáttal maszkírozható, bizmut pedig a szén-tetrakloridos extraktumból erős savval kirázható. A dietil-ditiokarbamátos módszer félkvantitatív, vizuális összehasonlításon alapuló változata használatos pl. vas [5b, 5c] és bizmut [5a] készítmények réztartalmának 10 ppm-re való limitálására. A cinktartalmú készítmények vizsgálatára egyebek között leírták biacetil-mono-(2-piridil)-hidrazon reagens alkalmazását [1].

10/10. táblázat. Néhány fémion ditizonos komplexképzésének adatai [6, 29]

Fémion	λ_{max}, nm	ε	Optimális pH
Cu(II)	550	45 200	1—4
Ag(I)	462	30 500	0
Pb(II)	520	68 600	7—10
Zn(II)	538	92 600	4—11

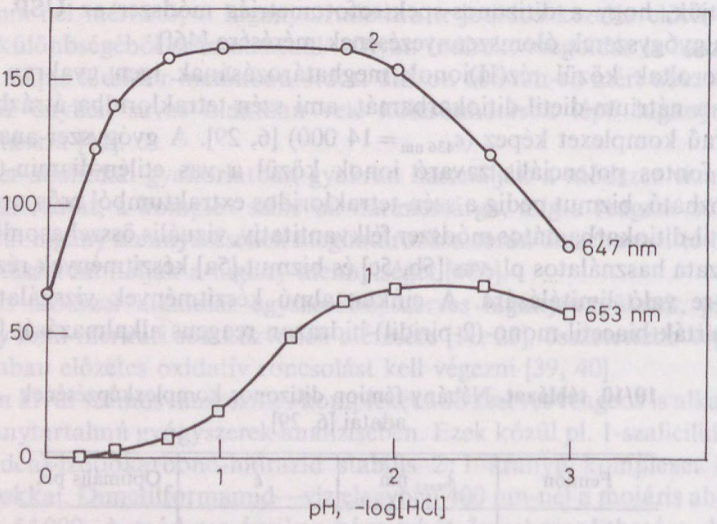
A 10/10. táblázatban nem szereplő fémek közül antimon is meghatározható a bizmutnál leírt jodidkomplexes módszerrel. A $SbCl_6^-$ anion és különböző xantén és difenil-metán típusú kationoid festékekkel képzett és szerves oldószerekkel kirázható ionpárok mérésére alapozott módszerek [6, 29] rendkívüli érzékenységükkel tűnnek ki, de ismeretes az antimon(III)-sóknak foszfor-molibdénsavra gyakorolt redukáló hatásán alapuló molibdénkékes módszer is [2].

Az USP XXII módszere arzén szennyezés meghatározására gyógyszerekben azon alapul, hogy naszcensz hidrogén segítségével arzén-hidrogénné alakítjuk. Ezt a hidrogénáram segítségével ezüst-ditiokarbamát-oldatba vezetjük. Ott az elnyelődik és 535—540 nm-nél mérhető ditiokarbamát-komplexet képez [46e].

Mangán meghatározására gyógyszerkészítményekben 4-(2-piridilazo)-rezorcin reagenst alkalmaztak [45].

Az alumínium meghatározására leírt igen nagyszámú reagens, pl. 8-hidroxi-kinolin, króm-azurol S, pirokatechin ibolya, alizarin S, aluminon, eriokrómcianin R stb. közül megemlítjük az utóbbi kettő sikeres alkalmazását gyógyszerkészítmények alumíniumtartalmának meghatározására [34]. Újszerű megoldás a hexánba extrahálható hexafluor-acetil-acetonos komplexének derivatív spektrofotometriás mérése ($^2D_{311}$) [33].

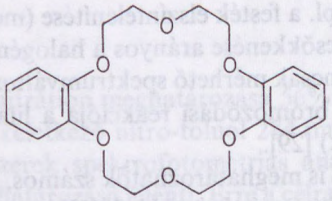
A ritkaföldfém szamáriumot szulfoszalicilát formájában tartalmazó kenőcs, ill. szolúciós készítmények spektrofotometriás meghatározására jól bevált reagens az arzenazo III [15]. A komplexképzési reakció optimális feltételei (pH, oldószer) pontos meghatározásának jelentőségét mutatjuk be a 10/15. ábrán. Látható, hogy a metanol-víz 4 : 1 elegyben végzett mérés egyértelmű előnyöket mutat az általánosan alkalmazott vizes közegben való meghatározással szemben. Nemcsak az érzékenység növek-



10/15. ábra. Szamárium(III)—arzenazo-III komplex abszorpciós maximumban mért abszorbanciájának függése a pH-tól, ill. a sósav koncentrációjától.

1. Oldószer: víz. *2.* Oldószer: metanol-víz 4 : 1 elegye

szik kb. 3,5-szeresére ($\varepsilon = 164\,000$), hanem a meghatározás pH-optimuma is eltolódik az irodalomból [6, 29, 47] jól ismert 2,5 közüli értékről pH 1-re, ami azzal az előnnyel jár, hogy ezen a pH-n az alumínium és a készítményekben jelenlevő EDTA zavaró hatása kiküszöbölődik.



dibenzo-16-crown-6

A koordinációs kémiának az utóbbi két évtizedben végbement fejlődése eredményeként ma már olyan fémek meghatározására is rendelkezésre állnak megbízható módszerek, mint pl. a kálium, ami korábban a spektrofotometriásan csak nehezen meghatározható fémek közé tartozott. A koronaéterek közül ui. a dibenzo-16-crown-6 még a többi alkálifémmel szemben is igen jó szelektivitással képez komplexet káliummal. A komplex kation szerves fázisba átrázható ionpárt képez különböző színes anionokkal és ez lehetőséget nyújt kálium igen szelektív és érzékeny meghatározására. A módszer gyógyszer-analitikai alkalmazásai közül megemlítjük a pikráttal mint ellenionnal végrehajtott mérést (extrakció diklór-metánnal vagy diklór-metán — toluol 4 : 1 elegyével, mérés 358 nm-nél) [35, 37, 38] és tropeolin 000 alkalmazását (extrakció kloroformmal, mérés 482 nm-nél) [26].

10.16.6. Néhány más elem meghatározása

Nemfémes elemek spektrofotometriás analízisét illetően a 10.16.1. fejezetben felsorolt monográfiák közül elsősorban Marczenko [29], továbbá Boltz és Howell [4] könyvére utalunk.

Elemi halogének közül a jód rendelkezik közvetlen analitikai mérést lehetővé tevő spektrummal; az ugyancsak színes bróm közvetlen mérését nagy reakciókészsége nehezíti meg. A jód abszorpciós maximuma apoláris közegben (akárcsak gőzfázisban) 515 nm körül van. A moláris abszorpciós koefficiens szén-tetrakloridos közegben $\varepsilon_{516\,nm} = 925$. Amint az közismert, ez az ibolyaszín töltésátviteli komplex képzésére alkalmas, donor típusú aromás vagy poláris oldószerekben a vörös, barna, ill. sárga különböző árnyalataira változik; etanolban pl. 445 nm-nél van az abszorpciós maximum ($\varepsilon = 940$). A meghatározás érzékenysége és szelektivitása jelentősen növelhető, ha azt a kék színű jód-keményítő abszorpciós komplex segítségével végezzük el ($\varepsilon_{590\,nm} \sim 40\,000$). Jód spektrofotometriás meghatározására vezethető vissza olyan oxidálószerek, ill. oxidálószerré átalakítható anyagok indirekt meghatározása, amelyek jodidokból sztöchiometrikus mennyiségű jódot tesznek szabaddá.

A halogenidionok közül a jodidion rendelkezik említést érdemlő fényelnyeléssel (λ_{max} vizes közegben 226 nm-nél). Klorid- és bromidionok jóddal képezett töltésátviteli komplexei a hosszabb hullámú ultraibolya tartományban szolgáltatnak mérési

lehetőséget (oldószeres extrakcióval vagy anélkül) ezeknek az ionoknak mérésére. A részleteket illetően a 7.9. fejezetre és MARCZENKO könyvére utalunk [29].

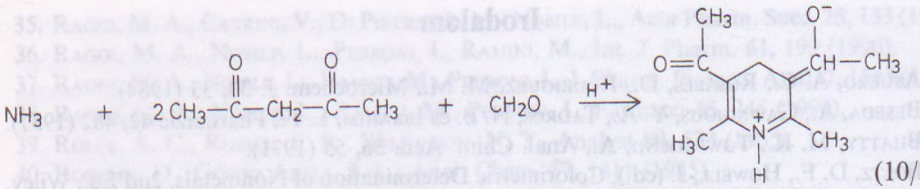
Szabad klór és bróm (ill. klorid- és bromidionok szabad klórrá és brómmá való átalakítás után) meghatározhatók különböző festékekkel való kölcsönhatás alapján is. Ez a kölcsönhatás lehet pl. a festék elszíntelenítése (metilvörös, metilnarancs stb.), amikor is az abszorbancia csökkenése arányos a halogén koncentrációjával, de lehet spektrofotometriásan ugyancsak mérhető spektrumváltozás is, mint pl. a sárga fenolszulfonftalein (fenolvörös) brómozódási reakciója a lila színű tetrabróm-fenolszulfonftaleinné (brómfenolkék) [29].

Maguk a halogenidionok is meghatározhatók számos, ligandumkicserélődési reakción alapuló, indirekt módszer segítségével [4, 29]. Ilyen módszer pl. ICHIBA és munkatársai módszere klorid- [19], ill. bromid- és jodidionok [20] meghatározására. A kovalensen kötött halogéneket tartalmazó mintát Schöniger-lombikban elégetve a halogéneket halogenid formába hozzuk, majd reagáltatjuk ezüst(I)-1,5-bisz-(6-metil-pirimidil)-karbazon komplexszel. A reakció során a lila színű komplex ezüst-klorid képződése közben elbomlik. Az 530 nm-nél mért abszorbanciacsökkenés arányos a minta halogéntartalmával ($\varepsilon = 12\,000$).

Ugyancsak a Schöniger-lombikos elégetés a mintaelőkészítő lépés tireoid készítmények jódtartalmának spektrofotometriás meghatározásánál. Az elnyelető folyadékban a jód trijódkomplexszé való átalakítás után mérhető [16]. Ennél érzékenyebb és könnyen automatizálható módszerhez jutunk, ha katalitikus-kinetikus módszerrel végezzük el a meghatározást. A jód ui. katalizálja a cérium(IV) és arzénessav közötti reakciót, s így az automata elemzőben áramló, a két reaktánst tartalmazó oldat cérium(IV)tartalmának 405 nm-en végrehajtott mérése révén az abszorbancia csökkenéséből a beinjektált elnyelető folyadék jódtartalmára következtethetünk. A módszerrel még 2,5 ng/ml jód is jól mérhető [30].

Kovalens kötésű fluort tartalmazó gyógyszerek fluortartalmának spektrofotometriás meghatározására a Schöniger-égetés után keletkező fluoridion erős komplexképző hajlama alapján nyílik lehetőség [4, 29]. Az egyik fajta megoldás színes komplexek (Zr— eriokróm-cianin-R, Zr— alizarin S, Zr— xilenolorange, Th— alizarin S, Th —arzenazo I stb.) elszíntelenítése a fluoridionokkal és meghatározásuk az abszorbancia csökkenése alapján. A másik megoldás: terner Ce(III)— alizarin-komplexon— fluorid komplex mérése 610 nm-nél. Ennek a direkt módszernek gyógyszerkönyvi alkalmazása is van pl. fluorszteroidok vizsgálatánál [5].

Nitrogéntartalmú anyagok nem szelektív meghatározására az egyik legelterjedtebb módszer a Kjeldahl-roncsolás, majd az azt követő ammóniadesztilláció. Bár a kvantitatív mérést általában az átdesztillált ammónia titrálásával hajtják végre, ismeretesek mikromódszerek is a desztillátum ammóniatartalmának spektrofotometriás mérése révén, ahol a reagens egyebek között kálium-jodomerkurát (Nessler-reagens) vagy fenol + nátrium-hipoklorit (indofenol módszer) [4, 29]. Az újabb módszerek közül említést érdemel DEVANI és munkatársainak módszere [9]. Amint az a (10/35) reakcióséman látható, a roncsolás során keletkező ammónia reakciója acetil-aceton és formaldehid reagensekkel savas közegben, a Kjeldahl-roncsolás katalizátorainak jelenlétében is végbemegy: így nincs szükség desztillációs lépésre.



(10/35)

Említést érdemel még a nitrátion meghatározása 56%-os kénsavas közegben toluollal való reakció után. A keletkező nitro-toluol 284 nm-nél mérhető [3].

Foszfortartalmú gyógyszerek spektrofotometriás analízise során az egyszerűbb feladatot foszfátionok meghatározása jelenti. Erre a célra a legelterjedtebb módszerek alapja a foszfátion hajlama heteropolisavak képzésére. Savas közegben molibdátionok feleslegével pl. molibdo-foszforsavvá alakul, ami redukálószerek, pl. hidrazin hatására kék színű, 800 nm körül jól mérhető foszfor-molibdénekké alakítható, amelynek a reakciókörülményektől erősen függő, de mindenképpen 10 000-es nagyságrendű moláris abszorpciós koefficiense érzékeny meghatározást tesz lehetővé. A foszfor-molibdénsavas módszert alkalmazta az USP XXII pl. kortikotropin-foszfát injekció foszfáttartalmának mérésére [46a]. Érdemes megjegyezni, hogy lényegében ugyanez a reakció számos redukálószer típusú gyógyszer indirekt meghatározását is lehetővé teszi, amint azt a 10. fejezet több alfejezetében nagyszámú példán bemutattuk.

Szükség esetén a szelektivitás növelése céljából a molibdo-foszfát vagy a foszfor-molibdénkék szerves oldószerekkel (elsősorban butanollal) extrahálható, de ismeretes olyan módszer is, ahol az előbbit kinolin feleslegével lecsapják, s a csapadék kiszűrése után a meghatározást a kinolin feleslegének 313 nm-nél végrehajtott mérésére alapozzák [18].

A hasonló jellegű egyéb módszerek közül megemlítjük a molibdo-vanadato-foszfátos módszert: a savas közegben ammónium-metavanadát és ammónium-molibdát reagensek hatására keletkező termék redukciós lépés beiktatása nélkül mérhető 400 nm-nél.

A leírt módszerek közvetlenül nem alkalmazhatók foszforsav-észter típusú gyógyszerekre. Ezeket először foszfáttá kell hidrolizálni. Erre jó lehetőséget nyújt az enzimatikus hidrolízis foszfatáz enzim felhasználásával. Példaként kortikoszteroid-21-foszfátok meghatározását említjük meg, ahol a meghatározást az enzimatikus hidrolízis után foszfor-molibdénkékes módszerrel végezték el [12].

Szerves foszforvegyületek meghatározására az előzőekben vázolt módszerek akkor nyújtanak lehetőséget, ha a foszfortartalmat oxidatív feltárással foszfáttá alakítjuk. Erre a célra a Schöniger-féle égetéses módszer a legalkalmasabb [28], de használnak különféle nedves oxidációs eljárásokat is.

A foszforvegyületekkel kapcsolatban leírtak lényegében vonatkoznak a korábban már tárgyalt arzén meghatározására is: a legfontosabb kvantitatív spektrofotometriás módszer a foszfor-molibdénkékes módszerrel analóg arzeno-molibdénkékes eljárás [4, 28, 29].

Irodalom

1. Asuero, A. C., Rosales, D., Rodriguez, M. M., Microchem. J. **30,** 33 (1984).
2. Beseda, A., Gawagious, Y. A., Tadros, N. B. és Ibrahim, L. F., Pharmazie **42,** 482 (1987).
3. Bhatty, M. K., Townshend, A., Anal. Chim. Acta **56,** 55 (1971).
4. Boltz, D. F., Howell, J. (ed.), Colorimetric Determination of Nonmetals. 2nd Ed., Wiley, New York 1978.
5. British Pharmacopoeia 1988, Her Majesty's Stationery Office, London, 1988. a. 77; b. 245; c. 810.
6. Burger K., Szerves reagensek a fémanalízisben. Műszaki Könyvkiadó, Budapest 1969; Organic Reagents in Metal Analysis. Akadémiai Kiadó, Budapest — Pergamon Press, Oxford 1973.
7. Capitán, F., Ramirez, A. A., Linares, C. J., Analyst **111,** 739 (1986).
8. Desai, G. S., Shinde, V. M., Bull. Chem. Soc. Japan **64,** 1951 (1991).
9. Devani, M. B., Shishoo, C. J., Shah, S. A., Suhagia, B. N., J. Ass. Off. Anal. Chem. **72,** 953 (1989).
10. Eldawy, M. A., Eishabouri, S. R., Anal. Chem. **47,** 1844 (1975).
11. Fleitman, J. S., Partridge, I. W., Neu, D. A., Drug. Dev. Ind. Pharm. **17,** 519 (1991).
12. Genius, O. B., Dt. Apoth. Ztg. **113,** 297 (1973).
13. Gónzalez-Portal, A., Baluja-Santos, C., Bermejo-Mártinez, F., Analyst **111,** 547 (1986).
14. Gónzalez-Portal, A., Bermejo-Mártinez, F., Baluja-Santos, C., Diez-Rodriguez, M. C., Microchem. J. **31,** 368 (1985).
15. Görög, S., Sütő, J., Acta Pharm. Hung. **51,** 217 (1981).
16. Graham, J. H., J. Pharm. Sci. **64,** 1393 (1975).
17. Hasebe, K., Taga, M., Talanta **29,** 1135 (1982).
18. Hassan, S. S. M., Eldesouki, M. H., Microchim. Acta II. 261 (1981).
19. Ichiba, H., Morishita, M., Katayanagi, M., Yajima, T., Chem. Pharm. Bull. **34,** 739 (1986).
20. Ichiba, H., Morishita, M., Yajima, T., Chem. Pharm. Bull. **36,** 5009 (1988).
21. Irving, H. M., Dithizone. Chemical Society, London 1977.
22. Iwantscheff, G., Das Dithizon und seine Anwendung in der Mikro und Spurenanalyse. 2. Ausgabe, Verlag Chemie, Weinheim 1972.
23. Jones, P., Nickless, G., Analyst **103,** 1121 (1978).
24. Juneau, R., J. Pharm. Sci. **66,** 140 (1977).
25. Korkuc, A., Acta Pol. Pharm. **32,** 193 (1975).
26. Kovalchuk, T. V., Pyatnitskii, I. V., Nazarenko, O. Yu., Koget, T. A., Tsisar, S. S., Vetyutneva, N. O., Farm. Zh. 43 (1986).
27. Krzek, J., Al-Mutari, E., Farm. Pol. **36,** 31 (1980).
28. Macdonald, A. M. G., Analyst **86,** 3 (1961).
29. Marczenko, Z., Separation and Spectrophotometric Determination of Elements. Ellis Horwood, Chichester 1986.
30. McGary, E. D., J. Pharm. Sci. **69,** 948 (1980).
31. Medwick, T., „Metal-Containing Organic Compounds", in, Higuchi, Brochmann-Hanssen, E., Pharmaceutical Analysis. Interscience, New York 1961.
32. Morales, M. T., Montana, M. T., Galan, G., Gómez-Ariza, J. L., Farmaco **45,** 673 (1990).
33. Nobile, L., Raggi, M. A., Pharmazie **46,** 138 (1991).
34. Raggi, M. A., Cavrini, V., Di Pietra, A. M., Pharm. Acta Helv. **59,** 225 (1984).

35. Raggi, M. A., Cavrini, V., Di Pietra, A. M., Nobile, L., Acta Pharm. Suec. **25,** 133 (1988).
36. Raggi, M. A., Nobile, L., Perboni, I., Ramini, M., Int. J. Pharm. **61,** 199 (1990).
37. Raggi, M. A., Nobile, L., Ramini, M., Perboni, I., J. Pharm. Biomed. Anal. **7,** 1545 (1989).
38. Raggi, M. A., Nobile, L., Ramini, M., Perboni, I., Farmaco **45,** 745 (1990).
39. Rolfe, A. C., Russel, F. R., Wilkinson, N. T., Analyst **80,** 523 (1955).
40. Rosales, D., Gómez Ariza, J. L., Anal. Chem. **57,** 1411 (1985).
41. Sandell, E. B., Colorimetric Determination of Traces of Metals. 3rd Ed., Interscience, New York 1959.
42. Sandell, E. B., Onishi, H., Photometric Determination of Traces of Metals. Wiley, New York 1978.
43. Snell, F. D., Photometric and Fluorimetric Methods of Analysis, Metals, Non-metals. Wiley, New York 1981.
44. Sullivan, D. J., J. Ass. Off. Anal. Chem. **60,** 1350 (1977).
45. Sundaramurthi, N. M., Shinde, V. M., Analyst **116,** 541 (1991).
46. The United States Pharmacopoeia XXII, USP Convention Inc., Rockville, Md., 1990. a. 356, b. 564, c. 566, d. 722, e. 1520, f. 1525.
47. Upor E., Mohai M., Novák Gy., Fotometriás nyomelemzési módszerek. Műszaki Könyvkiadó, Budapest 1978.

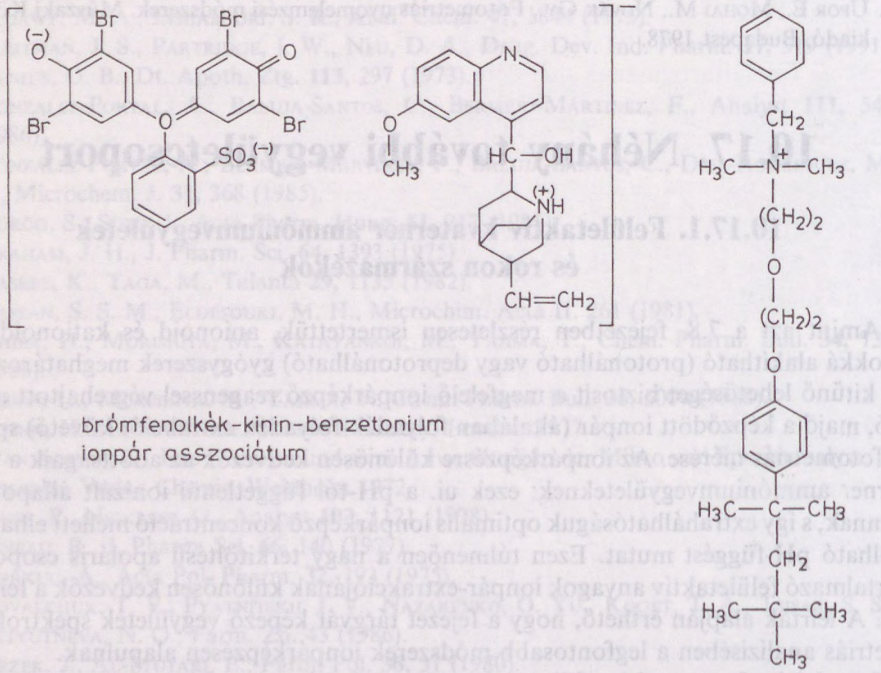
10.17. Néhány további vegyületcsoport

10.17.1. Felületaktív kvaterner ammóniumvegyületek és rokon származékok

Amint azt a 7.8. fejezetben részletesen ismertettük, anionoid és kationoid, ill. azokká alakítható (protonálható vagy deprotonálható) gyógyszerek meghatározására kitűnő lehetőséget biztosít a megfelelő ionpárképző reagenssel végrehajtott reakció, majd a képződött ionpár (általában folyadék-folyadék extrakciót követő) spektrofotometriás mérése. Az ionpárképzésre különösen kedvezők az adottságaik a kvaterner ammóniumvegyületeknek: ezek ui. a pH-tól függetlenül ionizált állapotban vannak, s így extrahálhatóságuk optimális ionpárképző koncentráció mellett elhanyagolható pH-függést mutat. Ezen túlmenően a nagy térkitöltésű apoláris csoportot tartalmazó felületaktív anyagok ionpár-extrakciójának különösen kedvezők a feltételei. A leírtak alapján érthető, hogy a fejezet tárgyát képező vegyületek spektrofotometriás analízisében a legfontosabb módszerek ionpárképzésen alapulnak.

Ionpárképző reagensként felhasználhatók a 7.8. fejezetben felsorolt anionoid festékek. Az újabb alkalmazások közül megemlítjük cetil-piridinium-klorid meghatározását metilnarancs, kongóvörös és pikrinsav reagensekkel [58], ugyancsak cetil-piridinium-klorid, valamint dequalinium-klorid mérését brómkrezolbíborral [32], septonex és ajatin meghatározását krómazurol-S reagenssel [16, 26], valamint trimetil-anilinium-benzol-szulfonát mérését metilnarancs reagenssel végzett extrakció után [36]. Ezekben a módszerekben az extrakciót (az utolsó példa kivételével) semleges vagy enyhén savas, vizes oldatból kloroformmal végzik el. További példákat illetően (pl. biszkvaterner-ammónium-szteroidok) a 7.8. fejezetre utalunk.

Kvaterner ammóniumvegyületek ionpár-extrakciós spektrofotometriás analízise területén külön kiemelést érdemelnek SAKAI vizsgálatai, amelyek jelentősen növelték a meghatározás érzékenységét és szelektivitását. Két lépcsőben disszociáló, kétbázisú sav típusú ionpárképző reagenseket (pl. brómfenolkék, brómkrezolzöld) alkalmazva savas közegben (pH 3,8), ahol a reagens két savas funkciós csoportja közül csak a szulfonsavcsoport disszociációjával kell számolni, kvaterner ammóniumvegyületek, mint pl. benzetonium-klorid sárga színű ionpár komplex formájában extrahálhatók kloroformmal ($\lambda_{max} = 418$ nm). Ha azonban a pH-t 6,7-re emeljük, akkor a reagens másik, fenolos hidroxil típusú savas csoportja is disszociál. Így a reakcióelegybe feleslegben bevitt kinin segítségével lehetőség van egy negatív töltésű reagens-kinin ionpár kialakítására. Ez az ionpár kiváló reagense a kvaterner vegyületeknek. A pH 6,7-nél kloroformmal extrahálható terner asszociátum kék színű oldata 610 nm-nél mutat maximumot. A moláris abszorpciós koefficiens benzetonium esetében 31 400 [41, 42].



brómfenolkék-kinin-benzetonium ionpár asszociátum

Ugyancsak SAKAI írta le benzalkonium-sók szelektív és rendkívül érzékeny meghatározását tetrabróm-fenolftalein reagenssel pH 7,5-nél 1,2-diklór-etánnal végzett extrakció után ($\varepsilon_{610\,nm} = 73\,000$). A meghatározás érdekessége az, hogy a spektrofotometriás mérést 60 °C-on végzik. Ezen a hőmérsékleten ui. a 2.11.4. fejezetben leírt termokromizmus következtében a kvaterner ammóniumvegyülettel együtt extrahálódó tercier aminok zavaró hatása eliminálódik: ezek ui. szelektív termokromizmust mutatnak, míg a kvaterner vegyületek ionpár-asszociátumának spektruma változatlan marad a hőmérséklet emelésére [43].

Külön említést érdemel STEVENS és ECKARDT [48] módszere polyquaternium-1 meghatározására. Itt a reagens tryptan-kék festék volt. Ennek vizes közegben 658 nm-nél levő maximuma az ionpárképződés hatására 700 nm-ig tolódik el. Ez a batokróm eltolódás lehetővé teszi a vízoldékony ionpárkomplex meghatározását extrakció nélkül a differenciaspektrum 680 nm-nél észlelt maximumán. Ugyancsak extrakció nélkül volt elvégezhető benzalkonium-klorid meghatározása brómtimolkékkel mint ionpárképzővel [31].

A fent említett polyquaternium-1 meghatározását különböző készítményekben úgy is el lehet végezni, hogy ionpárképző festékként Ponceau S-t használunk, ami magnéziumionok jelenlétében lecsapja a meghatározandó anyagot. A koprecipitátum kicentrifugálása után a reagálatlanul maradt festék koncentrációja 510 nm-nél mérhető. A csapadék leválását kísérő abszorbanciacsökkenésből lehet kiszámítani a polyquaternium-1 koncentrációját [17]. Ez a módszer már át is vezet a fémkomplexképződésre alapozott módszerekhez. Ilyen pl. FUJITA és munkatársai [14] módszere a legkülönbözőbb hosszú szénláncú kvaterner ammóniumvegyület meghatározására mangán(II)-ionnal és *o*-hidroxi-hidrokinonftaleinnel képezett vegyes komplexeik alapján. A két komplexképző mangán(II)ionnal képezett 2 : 2 : 1 arányú komplexének 9,3-as pH-n pl. hexadecil-piridinium-klorid esetében 575 nm-nél van az abszorpciós maximuma ($\varepsilon = 38\,000$). Itt említjük meg, hogy hasonló elv alapján a kvaterner ammóniumvegyületek helyett nem kvaterner poliaminok (spermin, spermidin) is meghatározhatók. Réz(II)ionokat használva fémkomponensként és pH 4,6-nál dolgozva rendkívül magas érzékenység érhető el: a moláris abszorpciós koefficiens a két poliaminra 700 000, ill. 300 000 [15].

A fémkomplexeken keresztül való meghatározásnak még egy indirekt módszerét is megemlítjük. A kvaterner ammóniumvegyületek rodanidionnal képezett ionpárjai vizes közegből kloroformmal kirázhatók. Az extraktum rodanidtartalma savas-acetonos vas(III)-nitrát reagenssel 500 nm körül mérhető vas(III)-rodaniddá alakítható. Az abszorbancia arányos a kvaterner ammóniumvegyület koncentrációjával [54].

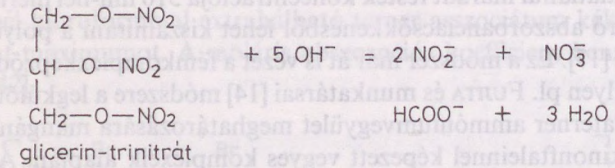
Töltésátviteli komplexek alkalmazását kvaterner ammónium-halogenidek meghatározására a 7.9. fejezetben mutattuk be.

10.17.2. Glicerin és származékai

A glicerin meghatározására szolgáló módszerek túlnyomó részében redukáló sajátságait használják ki [27]. Kálium-dikromáttal kénsavas közegben végezve az oxidációt a glicerin szén-dioxiddá oxidálódik. A spektrofotometriás mérést vagy a reakció során keletkező króm(III) vagy a dikromát feleslegének mérése alapján lehet elvégezni. Szelektívebbek azok a módszerek, amelyekben nátrium-perjodátot alkalmaznak oxidálószerként. Ebben a reakcióban egy mól hangyasav és két mól formaldehid képződik. Ez utóbbi számos színreakcióval határozható meg. Ezek közül a kromotropsavas reakció (a részleteket illetően lásd a 7.5. fejezetet) terjedt el leginkább a glicerin analitikájában. A már korábban is széles körben alkalmazott módszert KARAWYA és GHOURAB [28], valamint STURGEON és munkatársai [49] optimalizálták.

Az egyéb módszerek közül megemlítjük SCHNEIDER [44] enzimatikus eljárását, ahol a glicerint glicerin-kináz és glicerin-foszfát dehidrogenáz, ATP és NAD (lásd 7.11. fejezet) elegyével foszforilálják, majd dehidrogénezik, végül pedig a keletkező, ekvivalens mennyiségű NADH-t jodo-nitro-tetrazóliumos színreakcióval 505 nm-nél mérik.

Glicerin salétromsavas észter származéka (glicerin-trinitrát, nitroglicerin) spektrofotometriás mérését általában az észter hidrolízise során keletkező salétromsav, ill. salétromossav mérésére vezetik vissza. A savas hidrolízis terméke a salétromsav: ez aromás reagensek nitrálásán keresztül határozható meg. Fontosabb ennél a lúgos hidrolízis, ahol — amint az a (10/36) reakcióegyenleten látható — intramolekuláris oxido-redukció következtében mólonkint 2 mól nitrition keletkezik.



glicerin-trinitrát (10/36)

Ily módon a meghatározás visszavezethető a nitrition spektrofotometriás mérésére. Erre a diazotálásos — azokapcsolásos módszer (lásd 7.4. fejezet) számos variánsa alkalmas. Erre alapozták az USP XXII automatizált módszerét is nitroglicerin tabletták content uniformity vizsgálatára. A hidrolízist stroncium-hidroxiddal végzik, a savanyítás során felszabaduló salétromossav a prokain reagenst diazotálja, a kapcsoló reagens pedig *N*-1-naftil-etilén-diamin, a mérési hullámhossz 480 nm [55a].

A további azokapcsolásos módszerek közül megemlítjük akridinszármazékok mint reagensek alkalmazását (etakridin, diamino-akridin). Ezek primer aminocsoportjai diazotálódnak, a reagens feleslege pedig a kapcsoló ágens szerepét is betölti. Ez a módszer nitroglicerinen [21, 22, 51] kívül nitroszorbid [23] meghatározására is alkalmas.

Megemlítjük még SHINGBAL és AGNI [46] módszerét pentaeritrit-tetranitrát meghatározására cinkporral való redukció majd 1-naftil-amin nitrozálása segítségével.

10.17.3. Cukrok, cukor-alkoholok, poliszaccharidok

Az alfejezet tárgyát képező rendkívül kiterjedt vegyületcsalád analitikájában a színreakciókra alapozott spektrofotometriás módszerek igen széles körű felhasználásra találtak. Ezeknek a módszereknek, amelyek nagy többségükben a cukrok redukáló sajátságain vagy oxocsoportjuk kondenzációs reakcióin alapultak, nagy többsége már elavultnak tekinthető, így ezekkel még vázlatosan sem foglalkozunk. (Az anyag igen részletes tárgyalása megtalálható a 10.1. fejezetben idézett könyvekben.)

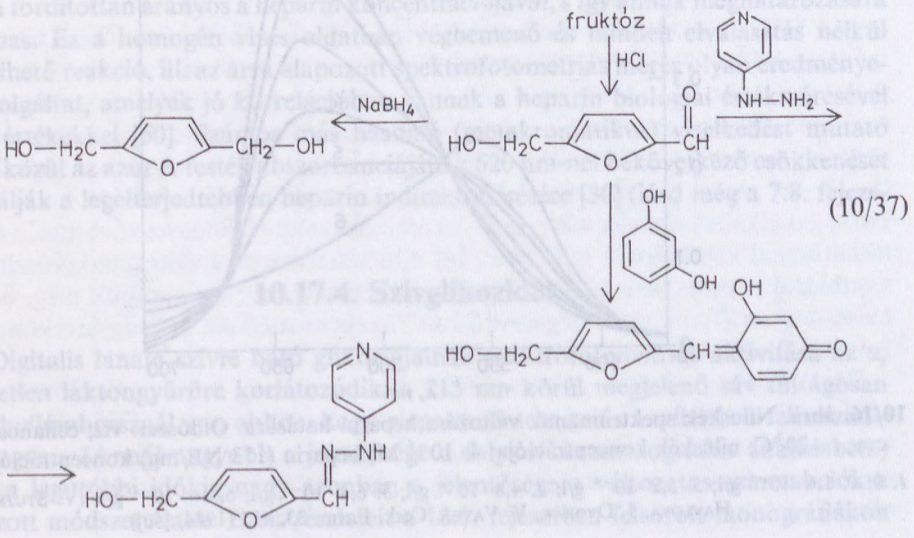
Szénhidrátok korszerű analitikája sem nélkülözheti a színreakciókon alapuló spektrofotometriás módszereket, mivel azonban ezek alkalmazása elsősorban a klinikai analitika területére esik, s így ezek részletes ismertetése meghaladná könyvünk kereteit, itt csak az alapelvek és néhány példa bemutatására szorítkozunk, s a részleteket illetően itt is monográfiákra utalunk [52, 56, 57].

Cukor-alkoholok esetében az oxocsoport hiánya miatt a lehetőségek csupán a redukáló sajátságok kihasználására szorítkoznak. Szorbit, mannit [40] és xilit [1] is meghatározható pl. készítményeikben erősen savas közegben cérium(IV)-ammónium-nitráttal való melegítéssel, majd az elreagálatlan oxidálószer 420 nm-nél elvégzett mérésével. Ezeknek a vegyületeknek, valamint kalcium-glükonátnak spektrofotometriás analízisében is felhasználhatjuk az előző fejezetben glicerinre ismertetett perjodátos hasításon és a keletkező formaldehid mérésén alapuló módszereket [11].

Cukrok nagy klinikai jelentőségük miatt jórészt automatizált spektrofotometriás mérési módszerei részben a klasszikus színreakciók modernizált változatai, részben pedig enzimatikus módszerek. Az előbbi csoportból pl. glükóz meghatározására a lúgos közegben végrehajtott ferri-cianidos oxidációt alkalmazzák, ahol — akárcsak az előző példában az elreagálatlanul maradt cérium(IV)et — az elreagálatlan ferri-cianidot mérhetjük 420 nm-nél. Egy másik fontos módszer reagense az *o*-toluidin, ami bonyolult kondenzációs, majd vízvesztéses mechanizmus szerint zöld színű, 645 nm-nél mérhető termékké alakítja a glükózt.

Fruktóz meghatározásának legfontosabb reagense a sósavas rezorcin. Amint az a (10/37) reakciósémán látható, a fruktózból sósav hatására keletkező 5-hidroxi-metil-furfurol kondenzál rezorcinnal. A meghatározást, amit glükóz nem zavar, gyógyszerkészítmények analízisére is felhasználják [1]. A piros színű reakciótermék 475 nm-nél mérhető, nagyobb érzékenység érhető el azonban a kondenzációs termék 296 nm-nél végrehajtott mérésével.

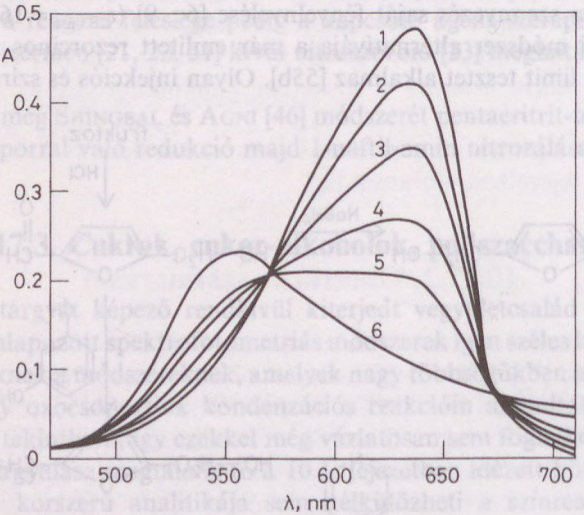
Érdekes megjegyezni, hogy a fenti reakció intermedierjének kulcsfontossága van cukor, ill. cukor-alkoholtartalmú gyógyszerkészítmények spektrofotometriás analízisében. Az 5-hidroxi-metil-furfurol ui. ezek jellegzetes szennyezése, bomlásterméke. Meghatározására gyógyszer-alapanyagokban vagy egyszerűbb készítményekben lehetőséget nyújt a szennyezés saját fényelnyelése [6c, 9] ($\varepsilon_{283\,nm} = 16\,300$). Az idézett gyógyszerkönyvi módszer alternatívája a már említett rezorcinos reakció, amit az USP XXII mint limit tesztet alkalmaz [55b]. Olyan injekciós és szirup készítmények



vizsgálatára, amelyek egyéb komponensei zavarják a saját fényelnyelés alapján végzett mérést, DAVIDSON és DAWODU két különböző differencia-spektrofotometriás módszert is kidolgozott. Amint az a (10/37) reakciósémán látható, a szennyezés aldehidcsoportja nátrium-bór-hidriddel spektrofotometriásan inaktív termékké redukálható, s így a differenciaspektrum maximuma is 283 nm-nél van (lásd 8.4. fejezet) [8, 9]. A másik módszer reagense izonikotinsav-hidrazid ($\lambda_{max} = 340$ nm) [10].

Visszatérve maguknak a cukroknak spektrofotometriás analíziséhez, az ismertetett és számos további színreakciónál szelektivitás és automatizálhatóság szempontjából feltétlenül fejlettebbek az enzimatikus reakciókon alapuló módszerek. A glükóz meghatározására kidolgozott számos enzimatikus módszer közül elsőként azokat a módszereket említjük meg, amelyek kezdő lépése a glükóz oxidációja a levegő oxigénjével glükóz oxidáz enzim segítségével glükonsavvá, ekvivalens mennyiségű hidrogénperoxid képződése közben. A módszer különböző változataiban ez utóbbi reagál peroxidáz enzim segítségével különböző reagensekkel mint pl. *o*-dianizidin, 4-amino-antipirin + fenol (az utóbbi reakcióegyenletét lásd a 236. oldalon), de használnak reakciópartnerként metanolt is. Az ebből keletkező formaldehid acetil-acetonos—ammóniás gyűrűzárási reakcióját a 481. oldalon mutattuk be. Egy másik módszer alapja a glükóz oxidációja NAD-dal glükóz dehidrogenáz segítségével. A keletkező ekvivalens mennyiségű NADH közvetlenül mérhető 340 nm-nél (lásd 7.11 fejezet).

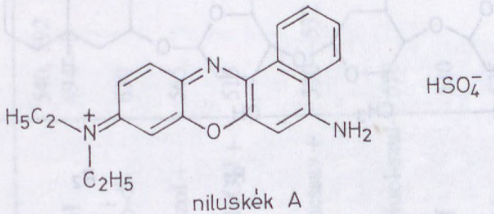
Végül megemlítjük, hogy fruktóz meghatározására egy olyan, enzimatikus foszforiláláson majd dehidrogénezésen alapuló módszer is használatos, amelyet az előző alfejezetben glicerin meghatározásával kapcsolatban ismertettünk. Számos további eljárás található különböző monográfiákban is [4, 52, 56, 57].



10/16. ábra. Níluskék spektrumának változása heparin hatására. Oldószer: víz; cellahossz: 2 cm; $t = 20\,^{\circ}C$; níluskék koncentrációja: $4 \cdot 10^{-6}$ M; heparin (113 NE/mg) koncentrációja: *1.* 0; *2.* $1{,}6 \cdot 10^{-4}$ g/l; *3.* $3{,}2 \cdot 10^{-4}$ g/l; *4.* $4{,}8 \cdot 10^{-4}$ g/l; *5.* $6{,}4 \cdot 10^{-4}$ g/l; *6.* $16 \cdot 10^{-4}$ g/l. (V. STUZKA, J. HAVLOVÁ, J. DVORÁK, V. VAVRA, Cesk. Farm. **33**, 412 (1984) [50])

A gyógyászatilag fontos mucopoliszaccharidok (heparin, kondroitin-szulfát) spektrofotometriás meghatározására az egyik lehetőség a biopolimer savas vagy enzimatikus lebontása és a monomerek mérése. Ilyen módszer pl. FÁBERGAS és CASASSAS [13] módszere kondroitin-szulfát mérésére sósavas floroglucin reagenssel. A reagens sósavtartalma végzi el a polimer degradációját és a monomer átalakítását a floroglucinnal kondenzálni képes furfuralszármazékká ($\lambda_{max} = 448$ nm), hasonlóan a (10/37) reakciósémán bemutatott reakciómechanizmushoz. Savas lebontáson alapuló módszereket heparin analitikájában is alkalmaznak [45].

Fontosabbak az előzetes hidrolízis nélküli, a polianion jellegű heparin kvaterner ammónium kationokkal való kölcsönhatáson alapuló módszerek. Egyebek között cetil-trimetil-ammónium-bromiddal és lauril-piridinium-bromiddal képezett ionpárkomplexei vízben oldhatatlanok, kloroformban azonban oldódnak, s így az ultraibolya tartományban lehetővé teszik heparin mérését. Egy másik lehetőség az elreagálatlanul maradt reagens mérése a csapadék leválása után visszamaradt oldatban [24]. A gyakorlatban jobban elterjedtek a kationoid vagy semleges festékekkel való kölcsönhatáson alapuló módszerek. Ezekben az esetekben a festék és heparin közötti kölcsönhatás a festék spektrumának hipszokróm eltolódásával jár. A 10/16. ábrán



niluskék A

látható a níluskék A festék spektrumának változása az oldat heparinkoncentrációjának függvényében. Látható, hogy a festék spektrumának maximumhelyén az abszorbancia fordítottan arányos a heparin koncentrációjával, s így annak meghatározására alkalmas. Ez a homogén vizes oldatban végbemenő és minden elválasztás nélkül értékelhető reakció, ill. az arra alapozott spektrofotometriás mérés olyan eredményeket szolgáltat, amelyek jó korrelációban vannak a heparin biológiai értékmérésével nyert értékekkel [50]. Számos más hasonló (metakromatikus) viselkedést mutató festék közül az azúr A festék abszorbanciájának 620 nm-nél bekövetkező csökkenését használják a legelterjedtebben heparin indirekt mérésére [30] (lásd még a 7.8. fejezetet).

10.17.4. Szívglikozidok

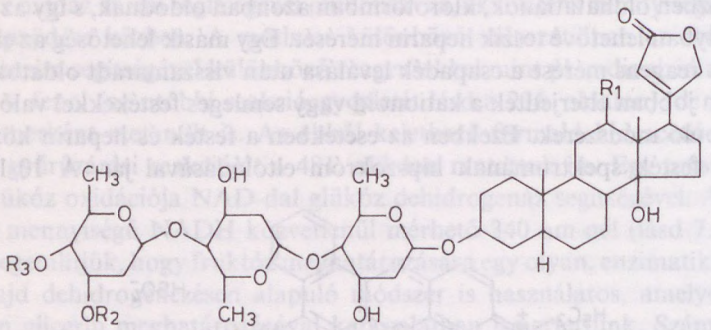
A Digitalis lanata szívre ható glikozidjainak spektrofotometriás aktivitása az α, β-telítetlen laktongyűrűre korlátozódik: a 215 nm körül megjelenő sáv túlságosan rövid hullámhossznál van ahhoz, hogy a spektrofotometriás analízisben felhasználható legyen. (Annál nagyobb a jelentősége a folyadékkromatográfiás analízisben.) Mind a legutóbbi időkig nagy azonban a jelentősége a változatos színreakciókra alapozott módszereknek. Ezek részleteit a 10.1. fejezetben felsorolt monográfiákon

túlmenően Bartos és Pesez [3], valamint Görög [18] könyveinek szívglikozidokkal foglalkozó fejezeteiben lehet megtalálni.

Az irodalomban található nagyszámú módszer közül a legfontosabb és még ma is használt módszerek főbb jellemzőit a 10/11. táblázatban foglaltuk össze.

Amint az a 10/11. táblázatban látható, a módszerek egy része magára a szteránvázra, egy másik része a telítetlen lakton, butenolid gyűrűre, végül a harmadik (legfontosabb) csoportja pedig a cukor részre jellemző.

Az aromás nitrovegyületek mint reagensek támadási pontja a telítetlen laktongyűrű aktív metiléncsoportja [7, 29, 39], míg a hidroxilaminolízisre és a keletkező hidroxámsav vas(III)komplexének mérésére alapozott módszer reagense a laktoncsoporton



	R_1	R_2	R_3
digoxin	OH	H	H
digitoxin	H	H	H
lanatozid-C	OH	$COCH_3$	glükóz

támad [47]. A rendkívüli érzékenységükkel kitűnő perjódsavas—tiobarbitursavas módszerek [25, 33, 34, 35] reakciósorozatának nyitó lépése a 2-deoxi-cukor típusú digitoxóz reakciója perjódsavval. Az itt keletkező malon-dialdehid kondenzál két molekula tiobarbitursavval lila színű termék keletkezése közben. Ugyancsak a deoxicukrok reagense a xanthidrol [2, 53]. A dixantil-karbamid használatával kapcsolatban [5, 37, 38] meg kell jegyezni, hogy tulajdonképpen ez is a xanthidrolos módszer közvetett alkalmazásának tekinthető: a reakció savas körülményei között ui. a dixantil-karbamid xanthidrollá hidrolizál. Így a módszernek ez a változata kiküszöböli a xanthidrol reagens instabilitásából adódó nehézségeket. Megemlítjük még, hogy a klasszikus vas(III)-klorid—jégecet—kénsav reagens még ma is gyógyszerkönyvi alkalmazásban van [6b].

Végül megjegyezzük, hogy az 5.4. fejezetben részletesen ismertetjük Horváth [19] módszerét Digitalis lanata digoxintartalmának meghatározására vékonyréteg-kromatográfiás elválasztás, elúció majd xanthidrolos fotometrálás után. Ennek és számos más színreakciónak digitálisz glikozidok vékonyréteg-denzitometriás analízisében betöltött szerepét ugyancsak Horváth [20] foglalta össze.

10/11. táblázat. Néhány spektrofotometriás módszer szívglikozidok meghatározására

Szerző	Közlés éve	A reakcióban részt vevő csoport	Reagens	λ_{max}, nm	ε	Vizsgált minta	Kromatográfiás elválasztás
Evans [12]	1974	szteránváz	$SbCl_3$	540, 592	4 000	növényi extrakt	+
Khafagy [29]	1974	butenolid gyűrű	pikrinsav + NaOH	494—5	—	növényi extrakt	+
BP-1988 [6a]						gyógyszerkészítmény	−
Rabitzsch [39]	1969	butenolid gyűrű	2,2′,4,4′-tetranitro-difenil + NaOH	630	26 800 (digitoxin)	digitoxin	+
Burns [7]	1976	butenolid gyűrű	1,3,5-trinitro-benzol + NaOH	565	11 400 (digitoxin)	standardok	−
Solich [47]	1987—1988	butenolid gyűrű + acetil-cukor	$NH_2OH.HCl + NaOH + Fe(NO_3)_3$	515	1 121 (lanatozid C)	gyógyszerkészítmény	−
Mesnard [33, 34], Juhl [25]	1961 1975	cukor rész	perjódsav + arzénessav + tiobarbitursav	530—532	158 000*	gyógyszerkészítmény	−
Myrick [35]	1969						
Bartos [2]	1963	cukor rész	xanthidrol + *p*-toluol-szulfonsav	570	—	standardok	−
Szilágyi [53]	1977	cukor rész	xanthidrol + HCl	530	46 000 (digitoxin)	növényi extrakt	+
Bican–Fister [5]	1969	cukor rész	dixantil-karbamid	535	—	standardok	+
Pötter [37, 38]	1963—1972	cukor rész	dixantil-karbamid	530	64 000 (digoxin)	növényi extrakt	+

* Horváth P., magánközlés.

Irodalom

1. Baer, A., Kraemer, H. Krankenhauspharmazie **4,** 115 (1983).
2. Bartos, J., Ann. Pharm. France **21,** 603 (1963).
3. Bartos, J., Pesez, M., Colorimetric and Fluorimetric Analysis of Steroids. Academic Press, London 1976, 219—244 old.
4. Bergmayer, H. U., Grundlagen der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim 1977.
5. Bican-Fister, T., Merkas, J., J. Chromat. **41** 91 (1969).
6. British Pharmacopoeia 88, Her Majesty's Stationery Office, London, 1988. a. 194, 195, 329, b. 731, c. 793, 796.
7. Burns, L., The Determination of the Path of Reaction of Oubain and Digitoxin with Polynitroaromatic Compounds in an Alkaline Medium and the Development of Alternative Methods of Assay for Oubain and Digitoxin. Ph. D. Thesis, Temple University, Philadelphia 1976.
8. Davidson, A. G., J. Clin. Pharm. Therap. **12,** 11 (1987).
9. Davidson, A. G., Dawodu, T. O., J. Pharm. Biomed. Anal. **5,** 213 (1987).
10. Davidson, A. G., Dawodu, T. O., J. Pharm. Biomed. Anal. **6,** 61 (1988).
11. Devani, M. B., Shishoo, C. J., Suhagia, B. N., Shah, S. A., Indian J. Pharm. Sci. **52,** 231 (1990).
12. Evans, F. J., J. Chromat. **88,** 411 (1974).
13. Fabergas, J. L., Casassas, E., Pharm. Acta Helv. **56,** 265 (1981).
14. Fujita, Y., Mori, I., Kitano, S., Fujita, K., Anal. Sci. **1,** 175 (1985).
15. Fujita, Y., Mori, I., Kitano, S., Kamada, Y., Bunseki Kagaku **33,** E103 (1984).
16. Gasparic, J., Filipová, M., Cesk. Farm. **39,** 400 (1990).
17. Good, R. M., Liao, J. C., Hook, M. J., Punko, C. L., J. Ass. Off. Anal. Chem. **70,** 979 (1987).
18. Görög, S., Quantitative Analysis of Steroids. Akadémiai Kiadó, Budapest — Elsevier, Amsterdam 1983, 375—378 old.
19. Horváth, P., Acta Pharm. Hung. **52,** 133 (1982).
20. Horváth, P., „Analysis of Cardiac Glycosides in Plant Extracts", in Görög, S. (ed.), Steroid Analysis in the Pharmaceutical Industry. Ellis Horwood, Chichester 1989.
21. Ivakhnenko, P. N., Khim.-Farm. Zh. **11,** 93 (1977).
22. Ivakhnenko, P. N., Farmatsiya **25,** 79 (1976).
23. Ivakhnenko, P. N., Chigarenko, L. S., Kilyakova, G. M., Ventsel, E. S., Vasilchenko, L. Ya., Farmatsiya **25,** 67 (1976).
24. Jarzebinski, J., Tonska, S., Acta Pol. Pharm. **42,** 101, 374, 571 (1985); **43,** 454 (1986).
25. Juhl, W. E., J. Ass Off. Anal. Chem. **58,** 70 (1975).
26. Jurkeviciute, J., Malat, M., Cesk. Farm. **28,** 379 (1979).
27. Kakac, B., Vejdelek, Z, J., Handbuch der Kolorimetrie. Band II., Gustav Fischer Verlag, Jena 1963, 53—88 old.
28. Karawya, M. S., Ghourab, M. G., J. Ass. Off. Anal. Chem. **55,** 1180 (1972).
29. Khafagy, S. M., Girgis, A. N., Planta Med. **25,** 350 (1974).
30. Klein, M. D., Drongowski, R. A., Linhardt, R. J., Langer, R. S., Anal. Biochem. **124,** 59 (1982).
31. Lowry, J. B., J. Pharm. Sci. **68,** 110 (1979).
32. Lukyanchikova, G. I., Dukkardt, L. N., Farmatsiya **38,** 60 (1989).
33. Mesnard, P., Devaux, G., Compt. Rend. Acad. Sci. **253,** 479 (161).
34. Mesnard, P., Devaux, G., Chim. Anal. **44,** 287 (1962).

35. Myrick, J. W., J. Pharm. Sci. **58,** 1018 (1969).
36. Palaniappan, A., Begg, M. M., Kaushal, V., Balasubramanian, M., Analyst **110,** 47 (1985).
37. Pötter, H., Pharmazie **18,** 554 (1963); **20,** 737 (1965).
38. Pötter, H., Bärisch, H., Pharmazie **27,** 315 (1972).
39. Rabitzsch, G., Jüngling, S., J. Chromat. **41,** 96 (1969).
40. Ruckriegel, O., Pfueller, A., Krankenhaus-Apoth. **29,** 62 (1979).
41. Sakai, T., Anal. Chim. Acta **147,** 331 (1983).
42. Sakai, T., Analyst **108,** 608 (1983).
43. Sakai, T., Ishida, N., Bunseki Kagaku **27,** 410 (1978).
44. Schneider, P. B., J. Lipid Res. **18,** 396 (1977).
45. Scott, J. E., Biochem. J. **183,** 91 (1979).
46. Shingbal, D. M., Agni, R. M., J. Ass. Off. Anal. Chem. **67,** 1123 (1984).
47. Solich, P., Karlicek, R., Jokl, V., Cesk Farm. **36,** 327 (1987); **37,** 193 (1988).
48. Stevens, L. E., Eckardt, J. I., Analyst **112,** 1619 (1987).
49. Sturgeon, R. J., Deamer, R. L., Harbison, H. A., J. Pharm Sci. **68,** 1064 (1979).
50. Stuzka, V., Havlová, J., Dvorák, J., Vávra, V., Cesk. Farm. **33,** 412 (1984).
51. Svach, M., Zyka, J., Z. Anal. Chem. **148,** 1 (1955).
52. Szabó A., Morvay J., Analitikai módszerek a klinikai kémiában. Akadémiai Kiadó. Budapest 1984.
53. Szilágyi, I., Zámbó, I., Török, J., Planta Med. **32,** 60 (1977).
54. Taha, A. M., Abdelkader, M. A., Abdelfattah, S., Pharmazie **35,** 93 (1980).
55. The United States Pharmacopoeia XXII, USP Convention Inc., Rockville, Md., 1990. a. 1474; b. 594; c. 633.
56. Tietz, N., Fundamentals of Clinical Chemistry. Saunders, Philadelphia 1976.
57. Wootton, I. D. P., Microanalysis in Medical Biochemistry. Churchill Livingstone, London 1974.
58. Zarapkar, S. S., Rele, R. V., Shah, S. V. M., Indian Drugs **24,** 481 (1987).

Tárgymutató

A spektrofotometriásan mért vegyületek közvetlen besorolásban, a felhasznált reagensek pedig „Reagensek és reakciók" cím alatt külön szerepelnek. Sók esetében az anion megjelölését általában elhagytuk.

A vastagon szedett szám azt az oldalt jelenti, ahol a vegyület spektruma, a dőlt szám pedig azt az oldalt, ahol a képlete megjelenik.

Acenokumarol 110, *111*
Acetamid 71
Acetaminofen lásd paracetamol
Acetanilid 83, ***88,*** 108, 113, ***114,*** 229
Acetilén 71
Acetil-klorid 71
Acetil-szalicilsav ***91,*** 152, 170, 242, 266, 270, 271, 293, 298, 330—332, 341, 353
Acetofenon 83
Aceton **71**
Acetonitril 71
Acrisorcin 296, 403
ACTH és szulfoxidja 238, 422
Adenin 361
Adrenalin 281, *319*—327, 340, 344
Adriamicin 444
Ajatin 483
Ajmalicin 195
Akonitin 352—366
Akridon **194,** 195
Akriflavinium-klorid (tripaflavin) 110, *111,* 112
Akril-aldehid 76
Aktiniomicin 448
Alapvonal módszer 133—136, 319, 455, 456
Alkaloidok 352—366
Allantoin 368
Allopurinol 110
Alloxán 238
Aloin 348
Alprenolol 243, 346, *347*
Alumínium 478
Amfetamin 84, 154, ***155,*** 290, 319—327
Amidazofen (amidopirin) lásd aminofenazon
Amikacin 439
Amilorid 405
Aminakrin *402,* 403, **404**
1-Amino-adamantán 69
4-Amino-antipirin 310, 374
2-Amino-benzoesav 95
4-Amino-benzoesav 94, 344
7-Amino-cefalosporánsav 446
Aminofenazon 98, 142, **143,** 330, 353, *370*—375
Aminoglikozid antibiotikumok 438, 439
Aminosavak 14, 250, 414—418
4-Amino-szalicilsav 94, 331, 332
Amino-piridin 170
Amiodaron 408
Amitriptilin ***89,*** 400, *401*
Amobarbitál 367
Amodiakin *402,* 403
Amoxicillin 171, 445
Amphotericin-A, B 301, 441
Ampicillin 243, 267, 270, 444, 445, 447
Anhidro-tetraciklin *442*
Anileridin 294
Anilin 83, 86, 92, 106, 119, ***120,*** 229
Anizol 83
Antazolin *182,* 393, 394, 395
Antibiotikumok 438—455
Antimon 478
Antraciklinek 442, 444
Apoatropin 357
Apomorfin 352—366
Apramicin 439
Arginin 416
Artemisia judaica 306
Arzén 478
Aspartam 420
Aszkorbil-palmitát 294
Aszkorbinsav lásd C-vitamin

Atenolol *158*, **163**—165
σ—σ* átmenet (sáv) 65, 69
n—σ* átmenet (sáv) 65, 69, 70, 71, 72, 84
n—π* átmenet (sáv) 65, 66, 67, 70, 71, 72, 76, 77, 91, 96, 99, 101, 155, 280, 298, 440
π—π* átmenet (sáv) 65, 66, 67, 71, 72, 76, 84
Atracurium 301
Atropasav 357
Atropin 84, 138, 158, **159,** 171, 305, 306, 352—366
AutoAnalyzer 253, 307, 308, 309, 445, 486
Auxokrómok 69—70
A-vitamin-(palmitát) 75, 76, 135, 455, *456*
Azintamid 311
Azlocillin 445
Azo-benzol *(cisz, transz)* 83
Azofen lásd Fenazon
Azo-metán 72
Aztreonam 416, 447

Baklofen 319—327
Bametan 319—327, 398
Barbitál *101*, 102, **103,** 238
Barbiturátok 196, 243, 268, 301, 366—370
Batokróm eltolódás 66
Beckman DU spektrofotométer 14, 35
Beer-törvény lásd Lambert—Beer-törvény
Belladonna 305
Benperidol 406, ***407***
Benserazid 281
Benzaldehid 83, 170, 236, 275, 296
Benzalkonium-klorid 248, 294, 484
Benzdiazepinek 170, 241, 288, 297, 377—383
Benzil-alkohol **49, 50,** 84, 276, 294, 425
Benzil-penicillin 84, 444, 445
Benzoesav 83, ***91,*** 94, 117, ***118,*** 171, 294, 296, 301
Benzoesav-amid 95
Benzofenon 83
Benzokain lásd norkain
Benzol 22, **23,** 42, 80, ***81,*** 82, 83, 99
Benzol-szulfonamid 83
Benztiazid 266
Benztropin 170, 290, 352—366
Berberin 304, 352—366
Bergapten 305
Betametazon 253
Betametazon-nátrium-foszfát 425
Betametazon valerát 253
Biológiai minták 170, 171, 192, 207, 267, 300—304, 332, 337, 343, 378, 379, 380, 403, 427, 428, 434, 441, 464, 490
Biperidin 290, 319—327
Bisacodyl 293
Bizmut 477
Bretylium tozilát 170
Brillantzöld *112*
Bromodifenhidramin 319—327
Brucin 304, 305, 352—366
Bróm, bromid 479, 480
Brómazepám 271, 303, 377—381
Bróm-benzol 83
Brómfeniramin 289
Brómhexin 344
21-Bróm-progreszteron 221
1, 3-Butadién 73
Butetamat 248
Butil-hidroxi-anizol 311
Butobarbitál 367
Butorphanol 398
B_1-vitamin 138, 144, 456—**463**
B_2-vitamin 456—462, **463**
B_6-vitamin 100, ***101,*** 138, 144, 248, *456*—462, **463**
B_{12}-vitamin **45,** 46, 138, 144, 172, 253, 294, 456—462

Captopril 414, 420, *421*
Carbidopa 418, 420
Carbinoxamin *182*
Cascara sagrada 305
Catharantus roseus 201, 305
Cefacetril 446
Cefadroxil 446, 447
Cefalexin 243, 444, 446, 447
Cefaloridin 444, 446
Cefalosporinok 308, 439, 447, 448
Cefalotin 446
Cefalozin 446
Cefamandol 446
Cefapirin 446
Cefaridin 446
Cefatriaxon 447
Cefoperazon 446
Cefoxitin *446*, 447
Ceftezol 446
Ceftriaxon 444
Cefuroxim 446

Celiprolol 303
Centpropazin 399
Cetil-piridinium-bromid 99, 294
Cetil-piridinium-klorid 483
Chamazulen 306
Cianokobalamin lásd B_{12}-vitamin
Ciklizin 319—327, 399
1, 3-Ciklohexadién 73
Ciklopentadién 96
Ciklopropil-metil-amino-5-klór-benzofenon 297, 298
Cikloszerin 250, 396, 447
Cilistatin-nátrium 170
Cimetidin 393, 394, 395
Cinchona Succirubrae 304
Cink 477
Cinkonidin 304
Cinkonin 304, 352—366
Cinnarizin **61,** ***89,*** 170
Citromsav 243
Clar nomenklatura 80—82
Clavulansav 303
Clocortolone pivalat 296
Cloctofol 171, 378
Clonazepam *377*—381
Clorazepat *377*—381
Condurangin 305
Content uniformity vizsgálatok 16, 228, 291, 306, 307, 352, 368
Crataegus 305
C-vitamin 117, ***118,*** *235,* 243, 255, 294, 303, 353, 462—465

Danazol 426
Dapsone 303
Daunomicin 444
Debrizokin 319—327
Dehidro-aszkorbinsav *235,* 255, 464, 465
Dehidroepiandroszteron 430, 431
Dehidro-pipecuronium bromid 186, *187*
Dekonvolúciós módszer 152, 193
6-Demetil-tetraciklin 443
Demotepan 267
Demoxapam 379
Denzitometria 59—62, 180, 199—201, 297, 305
21-Deoxi-21-bróm-prednizolon 221
21-Deoxi-21-(1-piridinium)-prednizolon-mezilát ***215***—221
Dequalinium klorid 403, 483
Derivativ spektrofotometria 14, 15, 132, 153—165, 290, 295, 298, 301, 320—322, 330, 331, 336, 346, 357, 368, 373, 379, 385, 392, 394, 397, 398, 400, 405, 416, 426, 442, 444, 446, 456, 457, 458, 461, 463, 464, 466, 468, 478
Detektorok 35—35
Dexametazon foszfát 296
Dextromethorphan 165, **166**—169, 319—327
Dextropropoxifen 170
Dezoxikortikoszteron-acetát 295
Diacetil 77
Diazepam ***108,*** 137, 138, 170, 369, *377*—381
Dibenzocikloheptadien 248
Dicyclomin 248
Di-(2,5-dimetil-fenil)-1,4-difenil-bután-1,4-diol *239,* 288
Dienösztrol 90
Dietil-ammónium-szalicilát 398
Dietil-karbamazin 399
Dietil-karbodiimid 73
Dietil-ketén 73
Dietil-sztilbösztrol 90
Difenhidramin 171, 327—329, 393
Difenil 83, 113
Differencia-derivativ spektrofotometria 165—170, 271, 379, 426
Differencia spektrofotometria 14, 15, 44, 132, 228, 238, 262—284, 295, 301, 306, 322, 335, 346, 347, 348, 368, 372, 379, 388, 389, 392, 394, 396, 398, 399, 402, 406, 407, 419, 425, 426, 447, 448, 458, 460, 488
Diflunisal 331, 348
Digitalis lanata 198, 305, 490
Digitoxin *489,* 491
Digoxin *80,* 198, 305, *489,* 491
Dihidralazin 404, *405*
Dihidroergotamin 352—366
Dihidrofólsav 257
Dihidrofólsav reduktáz enzim 257
Dihidrokodeinon 352—366
Dihidrotachiszterin 466
3β, 17-Dihidroxi-5-pregnén-20-on-3-acetát 430
Dijód-hidroxi-kinolin 393
Dikloxacillin 171, 444
Diloxanid furoát 266, 393
1, 4-Dimetil-butadién 90
Dimethothiazin 170

Dimetil-anilin 83, 86, 87, 108
Dimetil-α-etil-benzhidrol 239, 271, 272, 288
Diódasoros spektrofotométer és detektor 35, 39, 40, 188—192, 311, 397
Dipiridamol 379
Diszperzió 29—32
Di-terc.butil-*p*-krezol 294
Dobutamin 319—327
Domperidon 171
Dopa 414, 415
Doxepin 400, *401*
Doxiciklin 442, 443
Drogextraktumok lásd Növényi minták
Drotaverin **141,** 142, *146,* **147**—150, **151,** 152
D_2 és D_3-vitamin 67, *68,* 75, ***76,*** 244, 465, 466

Ecetsav **71**
Ecetsavanhidrid 71
Efedrin és φ-efedrin 84, 139—140, **161—164, 166**—169, *182, 236,* 248, 303, 319—327, 397
Efrotomicin 243, 244
Ekonazol 171, 393
Elektronsokszorozó 34, 37, 52
Emetin 86, 352—366
Enalapril 422
Enniatin-A 448
Enzimes módszerek 254—257, 278, 302, 303, 332, 417, 465, 486, 488
Epesavak 232, 256
4-Epianhidro-tetraciklin 442
Epicillin 445
Ergokornin 185
Ergokriptin 185
Ergometrin 185
Ergoszterin *74*
Ergotamin ***106,*** 293, 308, 352—366
Eritromicin 303, 440
Estazolam 377—381
Estropipate 297
Etakridin *402,* 403
Etakrinsav *282*
Etil-acetát **71**
Etilén 70
Etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) 414, 420
Etilén-glikol-monoszalicilát 331
Etilmorfin 352—366
Etil-piridin 173

17α-Etinil-3,5-ösztradién-3,17-diol-diacetát *77*
17α-Etinil-3,5-ösztradén-17-ol-acetát 56, **57,** ***77,*** 251, *271,* **272,** 288
Etinil-ösztradiol ***86,*** 117, *129,* 290, 424, 426, 432
Etinodiol-diacetát 56, **57,** 72, 240, 251, *271,* 272, 288
Etionamid 100, ***101,*** 243, 396
Etoposide 303
Eugenol 266
E-vitamin 466, *467*
Extrakciós konstans 245
Ezüst 477

Fajlagos abszorpciós koefficiens 26, 126—128
Faktoriális kísérletterv 148
Fehérjék 416—422
Félértékszélesség 43—45, 47, 68
Fémkomplexek 112, 113, 242—244
Fenacetin 87, ***88,*** 142, **143,** 170, 298, 330, 340—343
Fenazon 96, ***97,*** 98, **151,** 152, 173, 330, *370*—375
Fendilinum 84, 319—327
Fenfluramin 170, 319—327
Fenil-alanin 414, ***415,*** 416
Fenilbutazon *119,* 170, 249, 298, 303, *374*
Fenil-cianid 83
Fenilefrin *319*—327, 343, 344, 425
Fenil-etil-alkohol 294
Fenil-etil-amin **155,** 319—327
Fenil-merkuri-nitrát 294
Fenil-propanol-amin 319—327
Fenil-szalicilát 331
Feniltoloxamin 170
Fenindamin ***89***
Fenitoin 237, 303, 368, 369
Fenmetrazin 84, 319—327
Fenobarbitál 173, 353, 357, 367, 369, 379
Fenol 68, 83, 170, 236, 294
Fenolftalein 348
Fenotiazin 110
Fenotiazinok 170, 276, 277, 310, 383—391
Fenoximetil-penicillin 444
Fentanil ***114***
Fentermin 319—327
Fentolamin 394

Fitomenandion (K_1-vitamin) 467, 468
Fizosztigmin 352—366
Flavonolok 304
Flow-injection analysis (FIA) 253, 291—293, 302, 309—312, 341, 359, 379, 420, 462, 464
Flufenamsav 345
Flufenazin *384*—389
Flumecinol 55, **56,** *68,* 84, ***157,*** 158, *238,* 239, **286,** 287, 295
Flumetazon-pivalát 296
Flunitrazepam *377*—381
Fluocinolon acetonid 253, 275
Fluor 480
Fluor-benzol 83
Fluorocytosin 170, 400
Fluor-uracil 170
Flurazepam 124, *377*—381
Fluspirilén ***87***
Forgási melléksávok 22, 66
Formaldehid 235
Foszfor 481
Fotocella 34, 36
Fruktóz 488
Furán 96
Furazolidon *391,* 392
Furfurol 97
Furoszemid 94, ***95,*** 97, *391,* 392
Fólsav 110, 469, *470*

Gangleron 305
Gentamicinek 438, 439
Gentianaibolya *112,* 296
Ginzeng 306
Ginzengoidok 306
Glibenklamid 170
Glicerin 69, 485, 486
Glicerin-trinitrát *486*
Gliclazid 250
Glioxál 77
Glukóz 487
Gramicidin 447
Grizeofulvin 439, 448
Guaifenezin 319—327
Guanetidin 399

Halcinonid 275
Halogenidek 249, 250, 310, 479, 480
Haloperidol ***90,*** 398, 399
Háttérkorrekciós módszerek 132—140, 290, 293, 320, 385, 403, 458, 466
Heparin 249, 488, 489, 490
Heptakain 399
Heroin 352—366
Hewlett-Packard 8452 spektrofotométer 39—40
Hexametiléntetramin 69, 400
1, 3, 5-Hexatrién 80
Hexobarbitál 367
7-(2-Hidroxi-etil)-teofillin 358
Hidantoinok 366—369
Hidralazin *234,* 251, 404, 405
Hidrasztin 352—366
Hidrazin 281
Hidrokinon 296
Hidroklorotiazid 267, *299,* 360, 404, 405, *406,* 425
Hidrokortizon *129,* 198, 205, *206,* 275, 425
Hidrokortizon-acetát 174
Hidroxi-benzoesav-észterek 294, 347, 348
4-Hidroxi-fenoximetil-penicillin 444, 445
Hidroximetil-furfuraldehid 275, 282, 487, 488
3β-Hidroxi-5, 16-pregnadién-20-on-acetát 430
Hidroxiprolin 417
Hidroxokobalamin 172, 267, 460
Higany 242, 475, 476
Higromicin 439
Hioszciamin 84, ***85,*** 352—366
Hioszcin 170
Hipokróm eltolódás 66
Hipszokróm eltolódás 66
Hisztamin 96
Hisztidin 96
Homatropin és butil-bromidja 170, 171, *299,* 352—366
Homovanillinsav 269
Hőmérséklethatás 55, 210, 218, 397, 484
Hyaluronidase 416
Hypertensin 420

Ibuprofén 242
Idoxuridine 296
Időállandó 52
Imidazol 96
Imipramin 171, 400, *401*
Indén 90
Indol 104—108

Indolszármazékok 235, 251
Indometacin 107, 235, 406
Injekciós és szolúciós készítmények 132, 143, 151—152, 157, 158, 161, 164, 171, 256, 266, 267, 274, 275, 282, 294, 295, 298, 320, 323, 331, 343, 352, 362, 383, 387, 392, 393, 399, 400, 403, 416, 425, 426
Inozitol-nikotinát 398
Ionpárképzés 244—249, 323, 356, 357
Irridoid glikozidok 306
Isothipendyl 170
Isoxsuprin 317—327
Izoflavonolok 304
Izokinolin 104
Izonikotinsav 124, 172
Izonikotinsav-hidrazid 100, ***101,*** 281, 303, 310, 395, 396, 397
Izonikotinsav-hidrazid-glukozil-hidrazon 396
Izonikotinsav-hidrazid-laktozil-hidrazon 396
Izoprenalin *319*—327
Izopropil-fenazon 371
Izoptorenol 319—327
Izoszbesztikus pont 116, 264

Jód, jodid 479, 480
Jód-benzol 83
Jód-klór-oxi-kinolin 104, 120, ***262***—265, 330, *402*
Jodoform 70
Jód-uracil 243
Johimbin 106, 235, 352—366
Judaicin 306
Juglon 305

Kalibrálás-abszorbanciaskála 39, 58, 223
Kalibrálás-hullámhosszskála 39, 57—58, 223
Kálium 479
Kámfor 66, ***67,*** *68, 71*
Kalman-szűrő 153
Kanamicin 438, 439
Kaneszcin 352—366
Δ^9-kannabinol 154
Kapreomicin 447
Kapszaicin 306, 362
Karbamazepin ***108,*** **194,** 195, 237, 289, 303, 369, 400—402
Karbenicillin 444, 445
Karvon 306
Katarantin 195
Kebuzon 372
Kenőcs és krém készítmények 132, 275, 276, 295—297, 330, 331, 372, 392, 398, 402, 403, 404, 425, 428, 443, 456
Ketamin 319—327
Kéthullámhosszas spektrofotometria 174, 201
Khellin 305
Kinetikus módszerek 251—253, 332, 337, 347, 433, 434, 457, 460, 480
Kinidin 251, 304, 305, 352—366
Kinin ***105,*** 304, 305, 352—366
Kinolin 104
Kioldódási vizsgálatok 291—293, 306, 307, 312, 330, 336, 337, 340, 372, 392, 396, 400, 440, 442, 447
Klemasztin fumarát 171, 319—327
Klindamicin 440
Kliokinol lásd Jód-klór-oxi-kinolin
Klofibrát 348
Klomifen 90
Klonidin 250, 395
Klopamid 94, ***95,*** 170
Klór, klorid 480
Kloramfenikol ***88,*** 89, 198, 298, 303, 425, 448
1-(2-*o*-Klór-benzoil-4-klór-fenil)-5-glicil-amino-metil-3-dimetil-amino-karbonil-1H-1, 2, 4-triazol 422
Klór-benzol 83
4-Klór-2-(o-klór-benzoil)-*N*-metil-*N*-glicil-glicin-anilid 422
α-Klór-4-metoxi-fahéjsav-metil-észter *191*
Klorokin 138, 170, 289, 294, 303, 331, 371, *402,* 403
Klórciklizin 319—327
Klórdiazepoxid 171, 267, 377—381
Klórfeniramin **164,** 294, 319—327, 397
Klórhexidin 248, 310, 345
21-Klór-progeszteron 221
Klórpromazin ***109,*** 110, 250, 277, 290, 293, *384*—389
Klórprotixen 110, *111,* 400, *401*
Klórtalidon *158,* **163**—165, 170
Klórtetraciklin 442, 443
Kloxacillin 444
Kodein 115, 161, 162, 248, 322, 352—366
Koffein ***109,*** 110, 143, **144,** 146, **147**—150, 152, 170, 267, 270, 271, 293, 330, 332, 352—366
Kokain ***91,*** 352—366

Kolchicin 294, 352—360
Koleszterol *254*
Koleszterin 70, *254*
Kolin 248
Kompenzációs módszer 138—140, 165
Komplementerek 21
Kondroitin-szulfát 489
Kortikoszteroidok 205, 206, 237, 251, 253, 296, 297, 298, 310, 424, 428, 429, 433, 434, 435
p-Krezol 66, ***67,*** 294
Kristályibolya *112,* ***121,*** 122
Kromoforok 70—72
Kubelka—Munk-egyenlet 59, 62
Kúp készítmények 171, 293, 298, 323, 330, 341, 383
Küvették 33—34, 41, 42, 48—50, 208, 223
K-vitaminok 467, 468

Labetalol 346—*347*
Laktám antibiotikumok 290, 307, 444—447
Lambert—Beer-törvény 24—27, 41, 48—51, 58, 126—128, 145—147, 158, 183, 211, 212
Lambert—Beer-törvény (eltérések) 32, 55, 116, 130—132
Lanatozid C *489,* 491
Látszólagos abszorpciós koefficiens 209
Levallorfán 352—366
Levamisol 407
Levodopa 281, 418, **419**
Levomepromazin 277
Lidokain 113, ***114***
Ligandum kicserélődési reakció 243, 480
Lineáris diszperzió 31—33, 44
Lineáris kombináció 145—152
Linkomicin 440
Littrow-prizma 36
Lizergsav-dietilamid (LSD) 352—366
Loperamid 319—327, 398, 399
Lorazepam *377*—381
Lormetazepam 193, *377*—381
Lovastatin 311

Mafenide acetát 296
Makrolid antibiotikumok 440, 441
Mandulasav 298
Mannit 487
Maprotilin *401,* 319—327
Marfanil 336
Mazipredon 214—221, 298
Mebendazol 406, *407*
Mebeverin 170
Mechanikus résszélesség 43—47
Mecillinam 445
Medazepam 377—381
Mefenamsav 242, 345
Megestrol acetát *78,* 424
Meklozin 144
Menadiol (K_4-vitamin) 467, *468*
Menadion (K_3-vitamin) 295, 467, *468*
Mentol 69
Meperidin 170, 319—327, 399
Mepiramin 372
Mepivacain *114*
Merkapto-propionil-glicin 420
6-Merkaptopurin 110, 255, *278,* 303, 358, 359
Mesterolon 427
Meszkalin 352—366
Mesztranol ***86,*** *129,* 134—136, 171, *184,* **190,** 290, 307, 424, 426
Metadon 170, 319—327
Metándienon 76, 280, *281,* 424, 430
Metamfetamin 154, *155,* 303, 219—327
Methoxsalen 305
2-Metil-amino-5-klór-benzofenon 137
4-Metil-benzol-szulfonamid 334
Metil-bromid 70
Metildopa és metilésztere 86, 281, 414, 415, 416, 418
Metilénkék 110, 112, 308
Metilfenidát 84, 319—327
Metilfenobarbitál 138, 367
6-Metil-hidrokortizon 251, *252*
Metilhomatropinium-bromid 84
Metil-jodid 70
Metil-nikotinát 398
2-Metil-5-nitro-imidazol 119, 267
Metil-paraben ***93,*** 198, 276, 425
6-Metil-prednizolon 251, *252*
6-Metil-prednizolon-acetát 296
Metil-propiofenon 275
Metil-szalicilát 330—332
Metil-tesztoszteron 76, 77, *78,* 280, *281,* 425, 431
Metil-vinil-keton 76
Metimazol 97, 393, 394, 395
Metixén 110, *111*
Metofenazát *384*

Metoklopramid 248, 344
Metoprolol 346, *347*
Metotrexát 110, 257
Metronidazol 97, ***122,*** 123, 173, 174, 267, 393, 394, 395
Metronidazol-benzoát 170, 267, 394
Mikonazol 84, 171, 393
Minociklin 444
Minoxidil 267
Moláris abszorpciós koefficiens 26, 66
Morfin 115, 266, 352—366
Myricetin 304

N-acetil-cisztein 420, *421*
NAD (nikotinamid-adenin-dinukleotid) *255,* 256
NADH *255,* 256, 303
NAD(P)H 256, 257
Nadolol 346, *347*
Nafazolin ***54,*** 171, *182,* 393, 394, 395
Naftalin ***81,*** 82, 104, 105
1-Naftil-fenil-keton 107
Nagyhatékonyságú folyadék-krom. (HPLC) 182—199, 247, 297
Nandrolon észterek lásd 19-nortesztoszteron észterek
Nátrium-benzoát 130, 143, **144,** 159, 295, 358
Nátrium-fusidát 170
Nátrium-szalicilát 130, 170, 330—332, 353
N-benzoil-L-arginin-metil-észter 417
Neomicin 425, 438, 439
Neosztigmin 344
Nialamid 372
Nifedipin 170
Niflumínsav 101, ***102***
Nifuroxim 392
Niketamid *99,* 100
Nikotin 352—366
Nikotinsav 100, **141,** 142, **151,** 152, 460, *461*
Nikotinsavamid 100, 120, ***121,*** 238, 460, *461,* **463**
Nipagin lásd metil-paraben
Nisztatin 298, 441
Nitrazepam ***108,*** *241,* 267, *377*—381
Nitro-anilin *(o, m, p)* 92
5-Nitro-benzofenon 241
Nitro-benzol 83, 89, 92
2-Nitro-furán 391
Nitrofurantoin **97,** 301, *391,* 392
Nitrofurazon 296, *391,* 392
Nitrogén 480
Nitroglicerin 307
Nitroprusszid-nátrium 298
Nomifensin 407, *408*
Noradrenalin *319*—327
Noretinodrel *129,* 130, 134—136, 273
Noretiszteron *68, 129,* 186, 275, 290, 307, 426, 430
Noretiszteron-acetát 275
Norgesztrel 170, *191,* **192,** 275, 290, 426, 432
Norkain 173, 267, 344
19-Nortesztoszteron észterek 84, 275, 295, 424
Nortriptilin 400
Noszkapin 352—366
Novamidazofen 146, **147**—150, 355, 357, *370*—375
Növényi minták 266, 304—306, 353, 491
Nux vomica 304

Obidoxim 397, 398
Oldószerhatás 54, 66—68, 80, 81, 99
Oleandomicin 440
Ólom 477
Opton PMQ-2 spektrofotométer 46—47
Orciprenalin 319—327
Orfenadrin 170
Ortogonális polinomok módszere 136—138, 298, 320, 331, 341, 344, 345, 357, 379, 385, 393, 425, 441, 457
Oxazepam 170, 171, *377*—381
Oxazol 96
Oxedrin 319—327
Oxifedrin 319—327
Oxifenilbutazon 332, 370—375, 379
8-Oxi-kinolin 104, ***105***
Oximetazolin 394, 395
Oximetolon 119
Oximino-5, 16-pregnandién-3-ol-acetát 267, 270
Oxitetraciklin 442, 443
Oxprenolol 170, 248
Oxymetholon 426

Ösztradiol 265, 266, 424, 432
Ösztradiol-benzoát 425
Ösztradiol-dipropionát ***86,*** 424, 426

Ösztradiol-17-valerát 266, 268, 295, 426
Ösztriol 426
Ösztrogének 205, 424, 426, 428, 431, 432
Ösztron 266, 424, 431
Ösztron-3-metil-éter *279*, **280**
Ösztron-3-metil-éter-17-etilén-ketál *279*, 280

Pankreatin 416
Pankurónium bromid 248
Pantenol *469*
Pantoil-lakton *469*
Pantoténsav (Kalcium) **463**, *469*
Papaverin 104, ***105***, 116, ***117***, 127, 128, 352—366
Paracetamol 152, 170, 266, 270, 271, 292, 298, 301, *302*, 307, 310, 330, *340*—343, 372, 379
Paraquat 170
Penbutolol 243, 346
Penicillénsav 445
Penicillinek ***85***, 439, 444—446
Penicillosav 445
Pentagasztrin 416
Pentaklór-fenol 266, 268
Pentazicin 399
Pentoxiverin 319—327
Peptidek 414—422
Perfenazin *384*—389, 400
Perkin—Elmer spektrofotométer-család 37, 149
Peroxidáz 254
pH-hatás 55, 58, 98, 101—103, 112, 115—124, 209, 215, 228, 244, 246, 247, 265—271, 301, 322, 335, 352, 358, 366, 367, 372, 377, 394, 395, 402, 403, 415, 442, 458
Pindolol *105*, 106, 251
Pilokarpin 96, 170, 352—366
Pipecuronium-bromid 186, *187*, 193, 248
Piperazin 250, 399
1-(1-piperidil)-butén-1 71
Piracetám 242
Pirazin 99
Pirazol 96
Pirbuterol 398
Pirenzepin 298, 398
Piridazin 99
Piridin 98, 99, ***100***, 105, 120
Piridinol-karbonát 99, ***100***
Piridoxin lásd B_6-vitamin
Pirilamin 248
Pirimidin 99, 101
Piroxicam 170
Pirrol 96
Pivampicillin 445
Pivmecillinam 445
Polithiazid 243
Poli(vinil-acetát) 242
Polyquaternium-1 485
Pralidoxim 243, 397, 398
Pramoxin 319—327
Prazepam 297, *377*—381
Precíziós spektrofotometria 175
Predizolon-hemiszukcinát 425
Prednizolon *129*, *214*, 263, 265, 275, 276, 372, 402, 424, 425
Prednizolon-21-mezilát *214*—221
Prednizolon-21-tozilát 221
Pregnenolon 431
Prenalterol 244, 346, *347*
Prenilamin 84, 251, 319—327
Prenoxdiazin *96*, 97
Primakin 403
Primidon 84, 369
Prizma 29, 35, 36, 46, 61
Prociklidin 319—327
Progreszteron 138, 274, 275, 295, 424, 425, 426, 430, 431
Prokain 14, ***93***, 143, 248, 250, 281, **282**, 343, 344, 353, 358, 371, 382
Prokainamid 243, 303
Prokarbazin *234*
Proklórperazin 293, *384*—389
Prolin 417
Promazin 277, *384*—389
Prometazin **277**, 278, 303, 310, 311, *384*—389
Prometazin-szulfoxid **277**, 278
Propantelinium-bromid 110, *111*
Propifenazon 371
Propoxifen 319—327
Propranolol 346, *347*, 405
Proxibarbal *366*, **367**
Pteridin 104
Pulfrich fotométer 13
Purin 104, 109
Pye-Unicam SP-1800 spektrofotométer 46—47, 64
Pyrimethamine 303

Quercetin 304
Quingestanol acetát *74*, ***77***, 275

Ráció módszer 165, 171—174, 193, 396, 442, 457
Rács 29—33, 37—39, 46—47, 61
RGH-1113 *74*
Ranitidin *390*—393
β-Receptor blokkolók 346, 347
Reflektancia 60
Reflexiós spektroszkópia 20, 58—62
Reszcinnamin 352—366
Reszerpin *105*, 106, 235, 352—366, 404
Réz 477
Rezgési melléksávok (finomszerkezet) 22, 66, 75, 80, 84, 113, 114
Rezorcin 330
Rhein glikozidok 304
Riboflavin lásd B_2-vitamin
Rifamicinek 441
Rutin 110, *111*, 243, 305, 470, 471

Sandosten (tenalidin) *96*
Sanguiritrin 305
Sav-bázis disszociációs állandó 115, 122—124
Schiff-bázisok 231, 277, 313
Septonex 483
Sophora japonica 304
Spektrál szuppresszió 193—195
Spektrális sávszélesség 31—33, 43—47, 55
Spektromom spektrofotométer-család 35—36
Spermidin 485
Spermin 485
Spironolakton ***156***, 158, 425, 426
Stabilitásvizsgálatok 170, 210, 281, 297—300, 331, 341, 371, 372, 385, 400, 403, 406, 445, 465
Stable beam technika 36
Stanozolol 426
Sylibin 305

Szacharin 238, 249, 332
Szalazoszulfapiridin 335, 336
Szalbutamol 170, 319—327
Szalicilamid 138, 266, 270, 271, 330—332
Szalicilsav 14, 94, 170, 242, *256*, 266, 296, 298, 301, 302, 310, 330—332, 340, 371
Szamárium 478
Szapogeninek 305
Szennozidok 304
Szivglikozidok 490, 491
Szkopolamin 84, 170, 305, 306, 352—366
Szolaszodin 356
Szorbinsav 294
Szorbit 487
Szórt fény 47—51, 53, 56
Szteroid hormonok 424—435
Szterikus hatás 87, 89, 90, 91, 94, 113—115
Sztirol 83, 238
Sztreptomicin 243, *438*, 439
Sztrichnin 87, ***88***, 106, 304, 305, 352—366
Szulfacetamid 334—337
Szulfadiazin 336
Szulfadimetilpirimidin 336
Szulfadimetoxin 334
Szulfadimidin *102*, 334
Szulfadoxin *102*, 334
Szulfaetidol 334
Szulfaguanidin ***93***, 95, 334—337
Szulfamerazin 336
Szulfametazin 336
Szulfametiltiazol 336
Szulfametin 334
Szulfametizol 334
Szulfametoxazol *98*, 336
Szulfametoxidiazin *102*, 103
Szulfametoxipiridazin *102*, 103, 334, 336
Szulfamidin 102, 103
Szulfanilamid **162**, 163, 334, 336
Szulfatiazol **162**, 163, 267, 334—337
Szulfatiokarbamid 336
Szulfinpirazon 370—375
Szulfizoxazol 297, 336
Szulfometoxazol 97, 98
Szulfonamidok 253, 310, 334—337
Szulisomidin 334

Tabletta és kapszula készítmények 132, 139, 142—144, 146—151, 156—159, 171, 205, 266, 267, 271, 275, 288—293, 298, 320, 323, 330, 336, 341, 352, 353, 358, 359, 362, 367, 368, 372, 377, 378, 379, 383, 387, 392, 393, 398, 399, 400, 403, 416, 425, 426, 428, 429, 431, 432, 442, 443, 444, 447, 458, 466, 491
Tebain 305, 356, 358
Tejsav 256
Temazepam 193, *377*—381
Tenalidin 399

Teniposide 303
Teobromin 109, 110, 119, 238, 352—366
Teofillin 109, 110, 119, 173, 267, 268, 301, 303, 352—366
Terbutalin 319—327
Tesztoszteron és észterei 138, 181, 424, 425, 426
2, 6, 2′, 6′-Tetrametil-difenil 113
Tetraciklinek 439, *442*, 443, 444
Tetrahidrozolin 170
Tetrakain 173, 344
Tetramisol *407*
Tetrazepam 377—381
Thiacetazon 243
Thiambutosin 345
Thonzylamin 394
Tiamfenikol glicinát 170
Tiamin lásd B_1-vitamin
Tiazol 96
Tilidin 170, 248, 319—327
Tilozin 440
Tiltott elektronátmenet 66, 69, 82, 99
Tinidazol 267, 395
Tiobarbiturátok 243, 366—370
Tiofenol 83
Tiofén 96
Tiohúgysav *278*, 303
Tiokarbamid 243
Tiokámfor 72
Tiomersal 294
Tiopentál 103, 368
Tioridazin 277, *384*—389
Tirocidin 447
Tirozin 414, ***415,*** 416, 420
Tisztasági paraméter 193
Tobramicin 438, 439
Tokoferol lásd E-vitamin
Tokoferolvörös 467
Tolazamid 250
Tolazolin 170, 251, 319—327, 393, 394, 395
Tolperizon ***90,*** 399
Toluol 83, 113
Töltésátviteli komplexek 249—251, 303, 360, 362, 387, 400, 401, 404, 408, 479, 480, 485
Tranexámsav 250
transz-(4-Metoxi-fenil)-oxirán-karbonsav-metilészter *191*
Transzmittancia 27
transz-Sztilbén 90
Tranylcypromin 171, 319—327
Trenbolon acetát *79*
Triamcinolon acetonid 253
Triamin-diszulfid 457
Triamin-propil-diszulfid 457
Triamteren 267
Triazolam 377—381
Tribuzon 372
Triciklikus antidepresszánsok 400—402
Trifenil-etilén 90
Trifluoperazin 171, 277, *384*—389
Trifluor-metil-benzofenon 286, 287
Trihexetil-klorid 308, 319—327
Trihexifenidil 319—327
2, 4, 6-Triklór-fenol 131
Trimeprazin *384*—389
Trimetoprim 336
Trimetozin 95
Tripelennamin 84, 100, ***102,*** 330
Triprolidin 161, 162, 165, 166—169, 319—327
Tripszin 417
Triptofán 105, 414, ***415,*** 416
Tubokuranin 356

Validálás 222—226
Valinomicin 448
Vanillinsav 266, 268, **269,** 270
Vankomicin 440
Varian DMS-200 spektrofotométer 49, 64
Vas 475
Verapamil 319—327
Vékonyréteg-kromatográfia 59, 62, 336, 358, 371, 379, 398, 425, 458, 466, 490
Vierordt módszer 143, 144, 149, 163
Vinblasztin ***107,*** 108, 201, 352—366
Vinca minor 304
Vincin 304
Vinkamin ***106,*** 304, 352—366
Vinkrisztin ***107,*** 108, 195, 352—366
Vinpocetin ***106,*** 352—366

Woodward-szabály 73, 76, 79, 90, 93

Xilit 487
Xilometazolin 170, 394, 395

„Zero-crossing" módszer 163, 446
Zimeldin és metabolitjai *188*, 189
Zsírsavak 232

Reagensek és reakciók

3-Acetamino-benzaldehid-tioszemikarbazon 428, 429
Acetil-aceton 467
Acid Orange 7 403
Acid Red 14 323
Alizarin ibolya 3B 380
Alizarin vörös S 386, 478
Alloxán 400
Alumínium (III) 243, 244, 306, 441, 471
Alumínium (III)/katechin 439
Aluminon 478
Amaranth 386
Ametiszt ibolya 392
4-Amino-acetofenon 395, 441, 444
4-Amino-antipirin 231, 236, 254, 303, 325, 347, 375, 404, 443, 444, 459, 465, 488
4-Amino-benzoesav 395
4-Amino-fenil-hidrazin 326
3-Amino-fenol 344, 406
4-Amino-fenol 325, 332, 404, 457
4-Amino-6-klór-*m*-benzol-diszulfonamid 428
4-Amino-szalicilsav 408
6-Amino-timol 457
Amino-pentaciano-vas (III) 359, 398, 402
Ánizsaldehid 324, 466
Antimon (III) klorid 244, 456, 465, 490, 491
Antron 439, 440
Arzenazo-III 478
Arzenomolibdénsav 388, 443, 481
Aszkorbinsav 324, 475
Aszkorbinsav oxidáz 255, 465
Azo-kapcsolás 14, 233, 234, 253, 294, 297, 298, 303, 307, 309, 324, 332, 336, 337, 343—345, 347, 362, 369, 373, 375, 380, 381, 395, 404, 405, 408, 420, 428, 443, 446, 448, 457, 459, 461, 465, 469
Azokarmin G 249
Azorubin S/hidrogén-peroxid 443
Azur A, C 249, 446, 490

Barbitursav 337, 461
Basic Violet 3 441
Benzaldehid 324
Benzoil-klorid 229
Benzokain 325, 395, 404, 444
1, 4-Benzokinon 399, 422, 447
Biacetil-mono-(2-piridil)-hidrazon 477
Bórsav 280, 281, 418, 419
Bróm 363, 372
Brómanil 337
Bromát 326
Brómcián/anilin 397, 461
Brómcián/szulfanilsav 398
Brómfenolkék 247, 248, 290, 323, 356, 357, 392, 397, 399, 401, 403, 407, 440
Brómfenolkék/kinin 248, 356, 484
Brómkrezolbíbor 247, 290, 303, 323, 356, 392, 399, 401, 407, 440, 483
Brómkrezolbíbor/kinin 356
Brómkrezolzöld 247, 248, 305, 323, 345, 356, 386, 392, 394, 397, 399, 401, 403, 407, 440
Brómkrezolzöld/kinin 248
4-(5-Bróm-2-piridilazo)-1,3-diamino-benzol 460
Brómtimolkék 247, 248, 303, 305, 323, 344, 346, 356, 392, 394, 399, 401, 407, 422, 439, 440, 447, 457, 485
Brucin 439
Butil-szkopolamin-bromid 248

Cerium (III)/alizarin komplexon/fluorid 480
Cerium (III) 441, 443
Cerium (IV) 234, 298, 327, 341, 346, 395, 480, 487
Cerium (IV)/Arzenazo-III 305, 306
Cerium (IV)/σ-hidroxi-hidrokinon-ftalein/fluorid 361, 373, 444
Ciánecetsav-etilészter 467
Cink (II) 303
Cink-klorid/sósav 468
Cinkon 397
Cink/sósav 277, 389, 394, 395, 448, 470
Cirkónium (IV) 441
Cirkónium (IV)/alizarin-S 480
Cirkónium (IV)/eriokróm-cianin-R 480
Cirkónium (IV)/xilenol orange 480
Cisztein 406
Comassie blue 422
Crocein orange 401

Dabzil-klorid 418
Danzil-klorid 418, 439
Dehidrogenáz enzimek 256
Diacetil 399

1, 2-Diacetil-benzol 337
Diacetil-monoxim 447
Diamino-akridin 486
o-Dianizidin 488
Diazotálás lásd Azo-kapcsolás
3, 5-Dibróm-szalicilaldehid 422
Dibenzo-16-crown-6/pikrát 479
Dietil-klorofoszfit 230
Dietil-oxalát 234, 279, 280, 428, 430, 431
4,7-Difenil-1,10-fenantrolin 475
2,6-Diklór-fenol-indofenol 356, 395, 464
2,3-Diklór-5,6-diciano-*p*-benzokinon 387, 395, 399
3,5-Diklór-2-hidroxi-benzol-szulfonsav 465
6,7-Diklór-kinolin-5,8-dion 396
2, 6-diklór-kinon-klórimid 236, 251, 325, 337, 346, 362, 395, 404, 441, 457, 459
2,3-Diklór-1, 4-naftokinon 345, 396
2,4-Diklór-α-naftol 418
Dimedon 342
4-Dimetil-amino-anilin 231, 308, 327, 467
4-Dimetil-amino-cinnamaldehid 232, 324, 342, 344, 362, 373—375, 405, 406, 445, 470
4-Dimetil-amino-benzaldehid 232, 235, 281, 294, 303, 306, 309, 362, 373—375, 393, 395, 396, 406, 420, 422, 445, 461
Dimetoxi-dikinon 465
2, 4-Dinitro-benzaldehid 342
1, 2-Dinitro-benzol 237
1, 3-Dinitro-benzol 234, 306, 427, 430
1, 4-Dinitro-benzol 447
2, 4-Dinitro-fenil-hidrazin 231, 295, 347, 381, 392, 428—430, 447, 465, 467
2, 4-Dinitro-fluor-benzol 232, 234, 324, 346, 396, 418, 439, 446, 447, 457
Dioktil-szulfoborostyánkősav 443
Dipikril-amin 323
2, 2′-Dipiridil 475
Di-(2-piridil)-keton-2-piridil-hidrazon 460
5, 5′-Ditio-bisz-(2-nitro-benzoesav) 420, 440
Ditizon 475—477
Dixantil-karbamid 491

Eozin 356
Erio Green B 380
Eriokróm-cianin R 478
Eriokróm fekete 323, 356, 357, 380, 440
Etakridin 486
Etil-acetoacetát 332, 337, 344, 405
Ezüst (I) 447
Ezüst-ditiokarbamát 478
Ezüst (I)-1,5-bisz-(6-metil-pirimidil)-karbazon 480
Ezüst (I)/eozin 361
Ezüst-oxid 326

Fast Green FCF 399
Fast Red A 401
Fenacil-bromid 232
o-Fenantrolin 475
p-Fenilén-diamin 461
Fenil-hidrazin 231, 251, 326, 339, 428, 434, 465
Fenil-hidrazin-4-szulfonsav 395, 457, 459
Fenil-hidrazin/jód 429, 434
Fenil-hidrazin/klóranil 420
Fenil-izotiocianát 418
Fenol 310, 341, 342, 392
Fenolvörös 480
Fenotiazin 337
Ferroin 375
Flaviánsav 386
Floroglucin/sósav 489
Fluoranil 362
Fluoreszkamin 439
Folin—Ciocalteu-reagens 237, 302, 305, 325, 326, 346, 395, 399, 422, 439, 443
Food Green 403
Food Red 4 323
Food Yellow 3 323
Formaldehid 281, 347
Formaldehid/kénsav 324, 401
Foszfor-molibdénsav 237, 467, 478
Foszfor-molibdén-volfrámsav Lásd Folin—Ciocalteu-reagens
Foszfor-volfrámsav 388, 420, 456
o-Ftálaldehid 232, 418, 439
o-Ftálaldehid/i-leucin 420
Ftalexon-S 439
Ftalofenon 465
Fukszin 249

Gallium (III)/eozin 444
Germánium-dioxid 280, 281, 386
Glutakon-aldehid 337
Guajakol 448

Hantzsch-reakció 439, 480, 481
Hexafluoro-acetil-aceton 478

Hexajodo-bizmutát 305, 357, 386, 401, 406
Hidrogén-bromid 309
Hidrogén-jodid 422
Hidrokinon/kénsav 427
2-Hidroxi-5-fenil-benzaldehid 342
o-Hidroxi-hidrokinon-ftalein 243
8-Hidroxi-kinolin 380, 478, 448
Hidroxil-amin/jód 428
Hidroxil-amin/klóranil 428
2-Hidroxi-naftil-aldehid 337
8-Hidroxi-1-naftil-amin-4-szulfonsav 373
Higany (II) 459
Higany (II)/4, 5-dimetil-*o*-fenilén-diamin 235, 429, 434, 435, 465
Higany (II)/ditizon 369
Higany (II)/imidazol 445, 447
Higany (II)-rodanid/vas (III)nitrát 310
Higany (II)/1, 2, 4-triazol 445
Hipobromit 326, 461
Hipobromit/floroglucin 439
Hipoklorit 388, 406

Imidazol 303, 445, 447
Indofenol reakció 236, 302, 325, 337, 341, 346, 347, 422, 480
Izonikotinsav-hidrazid (INH) 205, 290, 295, 296, 307, 326, 392, 427, 428, 429, 448, 488

Jód 249—251, 360, 395, 397, 399, 400, 404, 408, 439, 464, 467
Jodát 332, 344, 362, 388
2-Jodil-benzoát 341
Jód-monoklorid 387

Kálium-ferricianid 237, 341, 342, 345, 397, 404, 443, 444, 465, 487
Kálium-permanganát 237, 303, 369, 373, 375, 401, 469
Kálium-jodid 477, 478
Kálium-jodomerkurát 480
Karbazol 440
Kénsav 290, 297, 307, 439, 440, 485
Kénsav/etanol 428, 432
Kénsav/metanol 428, 431
9-Klór-akridin 303, 332, 337, 396, 405
Kloramin-T 404, 406
Kloramin-T/fenol 310, 327
Kloramin-T/hematoxilin 446
Kloramin-T/jodid 464
Kloramin-T/rodanid 461
Klóranil *(o, p)* 250, 251, 324, 337, 343, 395, 399, 401, 404, 408, 419, 439, 446, 447
Klóranilsav 251, 362, 399, 404
4-Klór-anilin 420
5-Klór-2, 4-dinitro-anilin 428
1-Klór-2, 4-dinitro-benzol 461
7-Klór-nitro-benzo-furazon 324
Kobalt (II) 243, 332, 347, 369, 375, 399
Kobalt (II)tetrarodanid 244, 344, 359, 399, 401, 403
Kongó vörös 483
o-Krezol 302
Krezolvörös 356
Kristályibolya 332, 443, 446
Krómazurol-S 356, 401, 478, 483
Kromotrópsav 235, 236, 298, 400, 446, 458
Króm (VI)/rodanid 443
Krómsav 237, 332, 346

Lantán (III) 441
Lithol red 401

Malonsav/ecetsav-anhidrid 324
Malonsav-dietil-észter 467
Maleinsav-anhidrid 466
Mangán (II) 243
Mangán (II)/*o*-hidroxi-hidrokinon-ftalein 439, 485
Metán-szulfonsav 456
Metavanadát 310
Metil-amino-fenol/bikromát 345, 346
3-Metil-benzotiazolin-2-on-hidrazon(cerium (IV)) 327, 337, 344, 345, 388, 392, 404, 420, 429, 458
Metilénkék 249, 332, 345, 441
3-Metil-1-fenil-pirazolin-5-on 467
Metilnarancs 21, 247, 303, 305, 323, 345, 356, 357, 373, 380, 394, 397, 399, 401, 403, 408, 440, 480, 483
9-Metoxi-akridin 447
Molibdenát 326, 331, 341, 375, 392, 404, 434, 443, 444, 446, 447, 448, 464, 481
Molibdo-foszforsav 381, 388, 420, 443, 447, 456
Morfolin/jód 303, 386
Morfolin/N-bróm-szukcinimid 387

1-Naftil-amin 344, 486
Naftokinon 375

1,2-Naftokinon-4-szulfonsav 14, 232, 233, 337, 344, 395, 396, 399, 404, 405, 418, 469, 470
α-Naftol 399, 439, 440, 448
β-Naftol 14, 343, 344, 380, 395
Nátrium-bór-hidrid 170, 238, 273—276, 295, 399, 425, 426, 488
Nátrium-dietil-ditiokarbamát 477
Nátrium-hexanitrito-kobaltát 244, 388, 395
Nátrium-hidroxid 273, 392, 438
Nátrium-nitrit 395 (lásd még salétromossav)
Nátrium-terc.butilát/dietil-oxalát 428
Nátrium-terc.butilát/1, 3-dinitro-benzol 428
Nátrium-tetrafenil-borát 158
N-bróm-szukcinimid 237, 386, 406
N-etil-maleimid 420
N-fenil-β-naftil-amin 461
Nikkel (II) 398, 441, 471
Nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD) 255, 256, 486, 488
Nílus kék (A) 249, 489
Ninhidrin 380, 395, 405, 417, 418, 439, 446, 469, 470
2-Nitro-anilin 343, 375
4-Nitro-anilin 325, 362, 373, 459
4-Nitro-benzaldehid 342, 396
4-Nitro-benzoil-klorid 229
4-Nitro-fenil-diazonium-fluor-borát 233
2-Nitro-fenil-hidrazin 230, 310
4-Nitro-fenil-hidrazin 231
5-Nitro-furaldehid 332
4-Nitro-2-klór-anilin 470
2-Nitro-4-metoxi-anilin 465
Nitroprusszid-nátrium 343, 394, 397, 399, 407, 447, 448
Nitrozil-pentaciano-vas (III) lásd nitroprusszid-nátrium
4-Nitrozo-antipirin 343
1-Nitrozo-2-naftol 310
1-Nitrozo-2-naftol-3, 6-diszulfonsav 460
2-Nitrozo-1-naftol-4-szulfonsav 302
Nitrozo-R 386
N-karbamoil-metil-iminodiecetsav 477
4-N-metil-amino-fenol 310
N-metil-*p*-benzokinon-klórimin 332
N-(1-naftil)-etilén-diamin 233, 253, 294, 297, 303, 310, 336, 342, 344, 345, 369, 380, 448, 469, 486
Ón (IV) 387
Orange II 356, 357, 380, 399, 401
Ozmium-tetraoxid 396

Palládium (II) 243, 309, 337, 387, 396, 398, 420, 440
Palládium (II)/eozin 387
Palládium (II)/*o*-hidroxi-hidrokinon-ftalein 387, 397, 447
Palládium (II)/tetraklór-fluoreszcein 361
Paramolibdát 237, 397, 405, 446, 447
Perjódsav 236, 324, 347, 362, 401, 404, 458, 485, 491
Perjódsav/2, 5-dimetil-fenol 302
Peroxidáz enzim 254, 448
Peroxi-ecetsav 277
Perszulfát 388
Pikrinsav 14, 247, 323, 356, 380, 386, 399, 401, 403, 448, 483, 490, 491
4-(2-Piridilazo)-rezorcin 478
Piridin/tetrametil-ammónium-hidroxid 215—221, 429
Piridoxál 396
Pirogallol vörös 253
Pirogallol vörös/hidrogén-peroxid 460
Pirokatechin ibolya 422, 478
Ponceau-S 485
Prazeodim (III) 439
Prokain 307, 461, 486
Prometazin 337
Purpurin/szalicilát 475

Reinecke só 244, 322, 344, 359, 381, 394, 399, 403
Resazurin 326
Rezorcin 344, 392, 406, 487
Réz (II) 243, 332, 337, 343, 344, 345, 362, 369, 373, 375, 386, 388, 392, 394, 398, 408, 429, 434, 435, 439, 443, 444, 445, 447, 448, 485
Réz (II)/2, 2'-bikinolil 465
Réz (II)/4,5-dimetil-*o*-fenilén-diamin 206, 429, 434, 435
Réz (II)/1-(piridilazo)-2-naftol 420
Réz (II)/pirrol 429
Réz (II)/tetrabróm-fenolftalein 361, 399
Rodamin-B 343
Rodanid 460, 475
Rodanin 344

Rose Bengal 392, 394
Ruténium (III) 243, 381

Salétromossav 302, 324, 342, 362, 373, 375, 388, 399, 405, 406, 445 (lásd még azokapcsolás)
Salétromsav 342, 442, 467
Scandium (III)/krómazurol-S/1-etoxi-karbonil-pentadecil-trimetil-ammónium-bromid 420
Solochrome zöld V-150 356, 357, 359
Solochrome kék, fekete 407
Sósav 238—241, 271—273, 380, 442, 466

Szalicilát hidroxiláz enzim 256
1-Szalicilidén-5-(2-piridil-metilén)-izotiokarbono-hidrazid 242, 476
Szemikarbazid 428
Sziliko-volfrámsav 456
Szulfanilamid 395, 443, 444, 446
Szulfacetamid 395
Szulfanilsav 325, 362, 446, 461, 470
Szulfofenazol 395

Teofillin oxidáz enzim 303
Tatrabróm-fenolftalein-etil-észter 55, 303, 323, 356, 357, 359, 397, 484
Tetrabromo-aurát 401
Tetraciano-etilén 337, 401, 405
7, 7, 8, 8-Tetraciano-kinodimetán 250, 337
Tetraetil-ammónium-hidroxid 392
2, 2′, 4, 4′-Tetranitro-difenil 491
2, 4, 5, 7-Tetranitro-fluorenon 250
Tetrarodanato-diamino-kobalt lásd Reinecke só
Tetrazólium reakció és reagensek (tetrazólium kék, trifenil-tetrazólium-klorid) 206, 237, 253, 295, 298, 303, 307, 310, 326, 373, 397, 405, 420, 428, 433, 434
Timol 344, 380
Tiobarbitursav 344, 439, 491
Tioszemikarbazid 251, 326, 420, 428, 429, 448, 465, 467
Titánium (III) 442, 468
Titánium (IV)/*o*-hidroxi-hidrokinin-ftalein/fluorid 397
o-Toluidin 487
Tórium (IV) 441
Tórium (IV)/alizarin 480
Tórium (IV)/arzenazo-I 480
Triklórecetsav 441
Triklórecetsav/hidrogén-peroxid 466
1, 3, 5-Trinitro-benzol 491
Tropeolin 00 és 000 305, 323, 356, 357, 373, 380, 386, 398, 399, 439, 440, 457
Tryptan kék 485

Uránium (VI) 403, 441, 442
Uránium (VI)/*o*-hidroxi-hidrokinon-ftalein 360, 361, 439

Vanadát 326, 388, 397, 403, 419, 445, 447, 448, 481
Vanadato-foszfor-molibdénsav 464
Vanadium (IV)/katechin 361
Vanadobórsav 388
Vanillin 305, 306, 337, 342, 395, 396, 406
van Urk reakció 235, 293, 294, 305, 306, 309, 362
Vas (II) és vas (III) 242, 302, 310, 327, 331, 345, 347, 373, 381, 388, 392, 397, 403, 420, 438, 441, 443, 444
Vas (II)/fenol/kénsav 432
Vas (III)/2, 2′-dipiridil 238, 345, 373, 388, 467
Vas (III)/*o*-fenantrolin 238, 346, 373, 388, 397, 405, 419, 420, 465, 467
Vas (III)/ferricianid 375
Vas (III)/ferrozin 465, 467
Vas (III)/hidroxil-amin (hidroxámsavas módszer) 242, 243, 290, 307, 324, 332, 343, 344, 347, 362, 381, 392, 396, 398, 399, 402, 406, 443, 445, 447, 448, 469, 491
Vas(III)/2-oximino-ciklohexanon/tioszemikarbazid 465
Vas (III)/rodanid 346, 485
Vas (III)/tripiridil-s-triazin 255, 302, 303, 306, 310, 465
Volframát 419, 443

Xanthidrol 198, 305, 440, 490, 491
Xantin oxidáz enzim 255, 278, 303


Academiae Scientiarum
MAGYAR
TUDOMÁNYOS
AKADEMIA
KÖNYVTÁRA
Hungaricae

A kiadásért felelős az Akadémiai Kiadó és Nyomda Vállalat igazgatója
A nyomdai munkálatokat az Akadémiai Kiadó és Nyomda Vállalat végezte
Felelős vezető: Zöld Ferenc
Budapest, 1993
Felelős szerkesztő: Nagy Tibor
Műszaki szerkesztő: Csákvári András
A fedéltervet készítette: Gerhes Gábor
Nyomdai táskaszám: 21711
Megjelent: 45,75 (A/5) ív terjedelemben
Kiadványszám: I/120

Az elektrongerjesztéses (ultraibolya-látható) spektrofotometria ma, a nagy hatékonyságú kromatográfiás és spektroszkópiás módszerek korában is megőrizte jelentőségét mind a kvalitatív, mind pedig a kvantitatív gyógyszeranalízisben, sőt összekapcsolása komputerekkel, ill. kromatográfiás technikákkal, valamint automata elemzőkkel új alkalmazási és fejlődési lehetőségeket nyitott meg a módszer számára.

A könyv első része a spektrofotometria alapjait tárgyalja az ezen a területen kezdő szakember számára is befogadható szinten (alapvető technikai kérdések, szerkezet-spektrum összefüggések, a kvantitatív analízis alapjai). A második rész elsősorban az új alkalmazási lehetőségeket mutatja be, és rövid áttekintést ad a fontosabb gyógyszercsaládok spektrofotometriás meghatározási lehetőségeiről.

A könyv elsődlegesen a hatósági, ipari, klinikai-toxikológiai laboratóriumokban dolgozó analitikusok érdeklődésére számíthat, de megismerhetik belőle a spektrofotometria alapjait és modern lehetőségeit más területeken dolgozó analitikusok is.

Ára: 1980,– Ft 10% áfával

696646

Görög Sándor

SPEKTROFOTOMETRIÁS GYÓGYSZERANALÍZIS