

УДК [615.453.2:615.31'2].07

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ *n*-АМИНОФЕНОЛА В ПАРАЦЕТАМОЛЕ ПО РЕАКЦИИ С РЕЗОРЦИНОМ ПРИ ПОМОЩИ ТЕРМОЛИНЗОВОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ

М. А. Проскурнин, Н. В. Орлова, А. В. Пихтарь\*, В. В. Кузнецова

(кафедра аналитической химии Московского государственного университета)

**Определены оптимальные условия спектрофотометрического определения *n*-аминофенола при помощи резорцина в щелочной среде. Предел обнаружения 2 мкг/мл. Применение термолинзовой спектрометрии позволило без изменения пробоподготовки снизить предел обнаружения *n*-аминофенола по данной реакции в 20 раз по сравнению со спектрофотометрическим определением (предел обнаружения 100 нг/мл), что в пять раз ниже, чем предел обнаружения *n*-аминофенола по существующей фармакопейной методике с нитропруссидом натрия. В найденных условиях оценено содержание *n*-аминофенола в образцах парацетамола, выпущенных различными фармацевтическими фирмами.**

Парацетамол (*n*-ацетаминофенол) содержит в качестве примесей *n*-аминофенол и *n*-хлорацетанилид. Наличие этих веществ, являющихся как полупродуктами синтеза, так и продуктами разложения препарата, делает его токсичным. Вследствие этого, нормативными документами установлено предельно допустимое содержание *n*-аминофенола (0,005%) и *n*-хлорацетанилида (0,001%) в парацетамоле [1]. Для определения этих соединений в основном применяют спектрофотометрические, экстракционные и хроматографические методы анализа [1–4]. Однако в случае определения *n*-аминофенола и *n*-хлорацетанилида в парацетамоле приходится работать вблизи нижней границы определяемых содержаний, но чаще всего имеющиеся методики позволяют только обнаруживать, но не определять рассматриваемые примеси [3–5]. В связи с повышением уровня требований к качеству и безопасности лекарственных средств увеличение чувствительности существующих методик определения токсичных примесей в парацетамоле является актуальной задачей.

Одним из возможных путей увеличения чувствительности спектрофотометрического определения является применение термолинзовой спектрометрии [6–8]. Термолинзовый эффект можно охарактеризовать как термически индуцированное изменение показателя преломления поглощающей среды [7]. Локальный нагрев раствора за счет поглощения энергии лазерного луча приводит к тому, что в нем устанавливается распределение показателя преломления, которое соответствует распределению энергии в падающем луче. В простейшем случае образуется термооптический элемент (термолинза), аналогичный по своему действию рассеивающей линзе. В основе аналитического применения метода лежит прямая пропорциональная зависимость между оптической силой образующейся термолинзы и оптической плотностью образца [6–8]. Термолинзовая спектрометрия позволяет детектировать оптическую плотность до  $n \cdot 10^{-8}$  и использовать уже существующие спектрофотометрические методики [7, 8].

В рамках данной работы мы остановились на термолинзовом определении *n*-аминофенола, поскольку пока не существует селективного метода обнаружения его коли-

честв ниже 0,005% [1]. Целью исследования являлся выбор условий определения *n*-аминофенола при помощи термолинзовой спектрометрии и их проверка на примере анализа реальных препаратов парацетамола.

### Экспериментальная часть

В работе использовали следующие реагенты: *n*-аминофенол (0,5 мг/мл водный раствор), «х.ч.»; резорцин (0,5 мг/мл водный раствор), «х.ч.»; гидроксид калия (2 М водный раствор), «ч.д.а.». Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду. *n*-Аминофенол очищали возгонкой непосредственно перед проведением эксперимента и хранили в плотно закрытом сосуде. Перед экспериментами лабораторную посуду вымачивали в концентрированном мыльном растворе, затем в концентрированной азотной кислоте, после чего промывали дистиллированной и бидистиллированной водой.

Использована установка лазерного термолинзового спектрометра [9]. Термолинза индуцируется в кварцевой кювете ( $l = 1$  см) излучением аргонового ионного лазера Innova 90-6 (Coherent, США) с  $\lambda = 514,5$  нм (TEM<sub>00</sub>-мода, максимальная мощность 3,5 Вт). В качестве зондирующего лазера использован He–Ne лазер SP-106-1 (Spectra Physics, США) с  $\lambda = 632,8$  нм (TEM<sub>00</sub>-мода, 10 мВт). Сигнал (интенсивность в центре пробного луча) с фотодиода подается на плату АЦП-ЦАП компьютера типа IBM PC/AT [9]. Измерение оптической плотности на этапе спектрофотометрических измерений проводили на спектрофотометрах КФК-3 и СФ-46 в кварцевых кюветах с  $l = 1$  см или  $l = 3$  см. Для измерений рН среды использовали универсальный иономер ЭВ-74 с водородным индикаторным электродом и хлорид–серебряным электродом сравнения. Иономер настраивали при температуре 25° по буферным растворам с рН 2,50 и 9,18.

### Методика 1. Спектрофотометрическое определение *n*-аминофенола

В пробирку помещают 0,1 мл исследуемого раствора, содержащего *n*-аминофенол, добавляют 0,1 мл раствора резорцина с концентрацией 5 мг/мл и 0,5 мл 2М гидроксида

\*Государственный Институт по стандартизации и контролю лекарственных средств Министерства здравоохранения РФ.

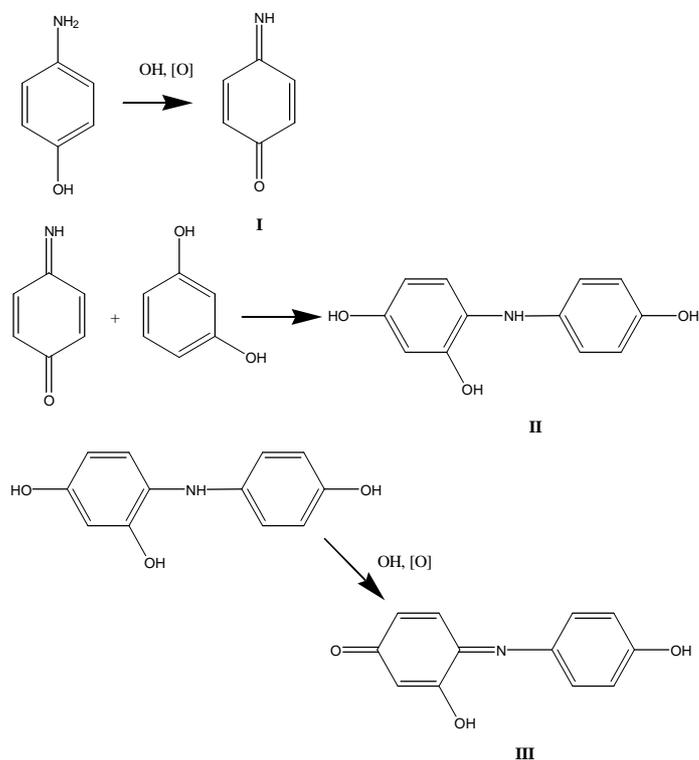
калия и доводят объем раствора до 10 мл дистиллированной водой. Растворы оставляют на 45 мин и измеряют оптическую плотность ( $\lambda = 580$  нм) в течение 20–30 с относительно дистиллированной воды.

**Методика 2. Термолинзовое определение *n*-аминофенола**

В пробирку помещают 0,1 мл исследуемого раствора, содержащего *n*-аминофенол, добавляют 0,1 мл раствора резорцина с концентрацией 5 мг/мл и 0,5 мл 2М раствора гидроксида калия и доводят объем раствора до 10 мл бидистиллированной водой. Растворы оставляют на 10 мин и измеряют термолинзовый сигнал ( $\lambda = 514,5$  нм) в течение 20–30 с.

**Результаты и их обсуждение**

Для термолинзового определения микроколичеств *n*-аминофенола выбран метод с использованием резорцина в качестве реагента [3, 4]. Он основан на том, что в результате электрофильной атаки молекулы резорцина на бензохинонимин I, образующийся при окислении *n*-аминофенола в щелочной среде (рН 11) кислородом воздуха, образуется лейкокраситель II, который затем окисляется кислородом воздуха до 2-гидроксииндофенола (III), максимум полосы поглощения которого лежит при 540–550 нм [3, 4]. Хотя *n*-аминофенол можно определять по данной реакции при помощи большинства фенолов, рекомендовано использовать резорцин, поскольку он обеспечивает максимальную скорость реакции, воспроизводимость и интенсивность окраски [3, 4].



Данный метод позволяет проводить кинетическое спектрофотометрическое определение *n*-аминофенола в растворах, содержащих его следовые концентрации (предел обнаружения не более 0,005%), причем объектами исследования могут быть пигменты, сыворотка крови и другие физиологические жидкости [3, 4]. Кроме того, определение

Таблица 1

**Физико-химические характеристики реакции *n*-аминофенола с резорцином в щелочной среде**

Константа скорости, л/(моль·с)			Энергия активации, кДж/моль
293	303	313	
0,015±0,003	0,045±0,004	0,061±0,005	54,8 ± 0,4

Таблица 2

**Псевдопорядки по основным компонентам при определении *n*-аминофенола резорцином в щелочной среде**

Компонент	Псевдопорядок
<i>n</i> -Аминофенол	0,87 ± 0,05
Резорцин	0,33 ± 0,07
Гидроксид	0,37 ± 0,06

*n*-аминофенола по данной реакции требует минимальных количеств дешевых реагентов (гидроксид натрия и резорцин) и по сравнению с другими методами определения *n*-аминофенола [1, 2] он является весьма экономичным. Дополнительным преимуществом при разработке термолинзовой методики на его основе является близость максимума полосы поглощения продуктов реакции и диапазона длин волн термолинзового спектрометра (480–530 нм).

Предварительные эксперименты заключались в подборе оптимальных условий для спектрофотометрического определения *n*-аминофенола. В качестве исходных взяты условия проведения реакции, приведенные в [3, 4]. Сравнительное измерение оптической плотности на термолинзовом спектрометре и на спектрофотометре показало, что как реагенты, так и продукт реакции (2-гидроксииндофенол) фотохимически стабильны и никаких побочных процессов, вызываемых лазерным излучением, не происходит. Кинетические кривые характеризуются высокой воспроизводимостью, поэтому для обработки результатов измерений использовали метод фиксированного времени.

Экспериментально найдено, что максимум полосы поглощения раствора, содержащего *n*-аминофенол (50 мкг/мл), гидроксид калия (1 моль/л) и резорцин (50 мкг/мл), находится при 550 нм. Величина молярного коэффициента поглощения продукта реакции через 45 мин после начала реакции, оцененная из спектра поглощения, составляет  $1,1 \cdot 10^2$  л/(моль см). Однако предварительные эксперименты показали, что спектрофотометрические измерения вблизи максимума поглощения продуктов реакции не оптимальны, так как они характеризуются значительным сигналом контрольного опыта. В результате на этапе спектрофотометрических исследований работали при длине волны 580 нм, для которой сигнал контрольного опыта меньше почти в два раза по сравнению с максимумом поглощения продуктов реакции, а снижение коэффициента чувствительности составляет не более 5%.

Определены физико-химические характеристики данной реакции: псевдопорядки реакции по реагентам, а также общий порядок реакции, температурные коэффициенты и энергия активации (табл. 1, 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что кинетика реакции окисления *n*-аминофенола резорцином описывается в рамках реакции вто-

рого порядка, при этом скорость определяющей является стадия электрофильной атаки (порядок по резорцину близок к единице). В отличие от имеющихся данных [3] найдено, что низкие концентрации гидроксида калия не только приводят к существенному снижению скорости реакции, но и ухудшают воспроизводимость измерений. В результате концентрация гидроксида калия в реакционной среде увеличена в 5 раз по сравнению с [3] и составила 0,1 М. Оптимальная концентрация резорцина составила 50 мкг/мл, что обеспечило достаточно высокие значения оптической плотности (0,1–1,5) при времени анализа 45 мин. При больших концентрациях резорцина воспроизводимость ухудшается, а низкие концентрации реагента приводят к значительному снижению скорости реакции. Предел обнаружения *n*-аминофенола в данных условиях составил 2 мкг/мл. Нижняя граница определяемых содержаний 5 мкг/мл. Воспроизводимость измерений 2–5%.

Рабочий диапазон длин волн термолинзового спектрометра (480–530 нм), определяемый длинами волн генерации аргонового ионного лазера, не позволял работать при длине волны 580 нм, оптимальной на этапе спектрофотометрических исследований. В результате термолинзовые измерения проводили при длине волны 514,5 нм, характеризующейся наибольшей мощностью излучения, индуцирующего термолинзу (то есть наибольшей инструментальной чувствительностью спектрометра). Величина молярного коэффициента поглощения продуктов реакции при этой длине волны спустя 45 мин после начала реакции составляет около  $0,95 \cdot 10^2$  л/(моль см), что лишь немногим уступает  $\epsilon$  в максимуме поглощения продуктов реакции.

Найдено, что воспроизводимость и пределы обнаружения для измерений по методу фиксированного времени спустя 10 и 45 мин и 1,5 ч после начала реакции отличаются незначительно, что позволило сократить время определения *n*-аминофенола более чем в четыре раза по сравнению с условиями спектрофотометрического определения.

Предел обнаружения *n*-аминофенола при помощи термолинзовой спектрометрии составил 100 нг/мл. Нижняя граница определяемых содержаний 900 нг/мл. Воспроиз-

водимость измерений 2–10%. Таким образом, фактически без изменения пробоподготовки предел обнаружения *n*-аминофенола снижен в 20 раз по сравнению со спектрофотометрическим определением несмотря на измерения не в максимуме полосы поглощения. Отметим, что достигнутая величина в 5 раз ниже, чем предел обнаружения *n*-аминофенола по стандартной методике с нитропруссидом натрия [1].

Основная проблема — высокий сигнал контрольного опыта (термолинзовый сигнал 0,8–1,0, что соответствует оптической плотности порядка 0,004), несмотря на достаточно малые флуктуации. В данной работе мы стремились оценить возможности метода при количественном определении *n*-аминофенола в образцах парацетамола без изменения существующих условий спектрофотометрического определения. Однако чувствительность термолинзового определения *n*-аминофенола по данной методике при необходимости может быть дополнительно увеличена за счет более глубокой очистки реагентов или дополнительной пробоподготовки.

Достигнутая величина предела обнаружения позволяет использовать разработанный термолинзовый метод для количественного определения *n*-аминофенола в фармацевтических препаратах. В табл. 3 представлено содержание *n*-аминофенола в образцах парацетамола, выпущенных различными фармацевтическими фирмами (VEB Berlin-Chemie, Laboratoires UPSA и Deva Holding).

Полученные результаты показывают, что применение термолинзовой спектрометрии позволяет увеличить чувствительность существующих методик определения *n*-аминофенола практически без изменения процесса пробоподготовки для спектрофотометрического определения. Метрологические характеристики разработанной методики дают возможность проводить количественную оценку содержания *n*-аминофенола в субстанции парацетамола на уровне более низком, чем предельно допустимое содержание *n*-аминофенола (не более 0,005%).

Работа осуществлена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 98-03-32827а.

Таблица 3

**Результаты определения *n*-аминофенола в препаратах парацетамола при помощи термолинзовой спектрометрии;  $\lambda = 514,5$  нм, мощность индуцирующего излучения 40 мВт, масса навески 10 мг,  $P = 0,95$ ;  $n = 3$**

Фирма (серийный номер)	Дата изготовления	Концентрация в исследуемом растворе, мкг/мл	Содержание в препарате, мас. %
VEB Berlin Chemie (Charge No. 23540186)	март 1986 г.	$2,0 \pm 0,2$	$0,020 \pm 0,002$
Laboratoires UPSA (Lot No. 10867)	май 1991 г.	$0,3 \pm 0,1$	$0,003 \pm 0,001$
Deva Holding A.S. (Lot No. 911177)	апрель 1990 г.	$0,4 \pm 0,1$	$0,004 \pm 0,001$

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Британская Фармакопея. V. 1. L., 1996.
2. Фармакопея Японии. Токио, 1982.
3. De La Guardia M., Khalaf K.D., Hasan B.A., Morales-Rubio A., et al. // *Analyst*. 1996. **121**. P. 1321.
4. Khalaf K.D., Hasan B.A., Morales-Rubio A., De La Guardia M. // *Talanta*. 41. P. 547.
5. Фармакопея США. XXIII изд. Вашингтон, 1995.
6. Dovichi N.J. // *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* 1987. **17**. P. 357.
7. Гришко В.И., Гришко В.П., Юделевич И.Г. Лазерная аналитическая термолинзовая спектроскопия. Новосибирск, 1992.
8. Abroskin A.G., Belyaeva T.V., Filichkina V.A., Ivanova E.K., Proskurnin M.A., Savostina V.M., Barbalat Yu.A. // *Analyst*. 1992. **117**. P. 1957.
9. Проскурнин М.А., Аброскин А.Г., Радушкевич Д.Ю. // *ЖАХ*. 1999. **54**. С. 101.

Поступила в редакцию 05.06.00