

STANOVENIE PURÍNOVÝCH BÁZ (I)
STANOVENIE TEOFYLÍNU A 7-HYDROXYETYLTEOFYLÍNU
V BEZVODOM PROSTREDÍ
STANOVENIE BÁZICKÝCH DISOCIAČNÝCH KONŠTÁNT
OBIDVOCH LÁTOK

K. LINEK, C. PECIAR

ČSAV, Chemický ústav Slovenskej akadémie vied v Bratislave

Teofylín a 7-hydroxyetylteofylín sú farmakologicky významné látky. Niektoré liečivá, napríklad *Oxyphyllin*, obsahujú obidve tieto látky súčasne. Pretože zatiaľ nie je známa metóda na stanovenie obidvoch látok vedľa seba, vypracovali sme metódu na ich stanovenie ako báz titráciou v bezvodom prostredí. Za tým účelom sme vopred stanovili bázické disociačné konštanty obidvoch látok.

Stanovením kyslej a bázickej disociačnej konštanty teofylínu sa zaoberali niekoľkí autori [1—4]. Kyslá disociačná konštantu $K_a = 1,62 \cdot 10^{-9}$ pri 25 °C sa vypočítala zo stupňa hydrolyzy sodnej soli teofylínu, ktorý sa stanovil zmydelnením octanu metylnatého [1]. Iní autori stanovili túto konštantu potenciometricky [2] a spektrofotometricky [3, 4].

Na stanovenie teofylínu bolo vypracovaných niekoľko metód, ktorých prehľad udávajú J. Bosly [5] a O. Tomíček [6]. Teofylín ako báza bol stanovený neutralizačne v bezvodom prostredí ľadovej kyseliny octovej [7, 8], v dioxáne [9] a v zmesi acetanhydrid—nitrometán [10]. Ďalší autori stanovili spektrofotometricky teofylín samotný [11, 12], ako aj v zmesi s inými látkami [13, 14].

Na stanovenie 7-hydroxyetylteofylínu bola vypracovaná kolorimetrická metóda na základe farebnej reakcie s diazotovanou kyselinou sulfanilovou [15].

Experimentálna časť a výsledky

Reagencie

Teofylín DAB VI.

Hydroxyetylteofylín mal b. t. 160—161 °C. Literatúra udáva b. t. 158—160 °C [16], resp. 161—163 °C [17].

0,1 N-HClO₄ v dioxáne.

Všetky použité chemikálie boli čistoty p. a.

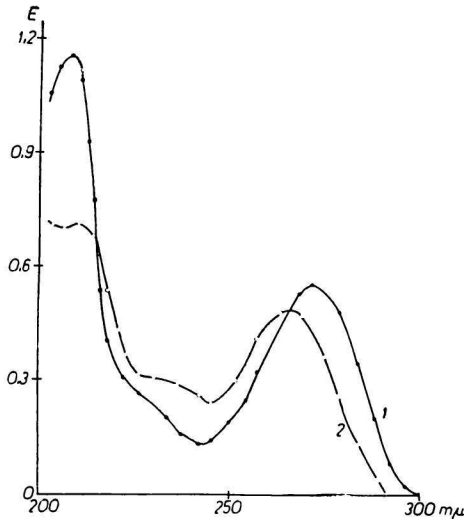
Aparatúra

Fotometrické merania sa robili na univerzálnom spektrofotometri Zeiss s kremennou optikou. Na potenciometrické merania sa použil „Titri“ pH Meter“ (Orion, Budapešť). Ako indikačná elektróda sa upotrebila vysokoohmová sklenená elektróda, resp. strieborná elektróda. Hodnoty pH použitých roztokov sa merali na pH metri Metrohm 142 E.

*Spektrofotometrické stanovenie bázičkých disociačných konštánt teofylínu
a 7-hydroxyetylteofylínu*

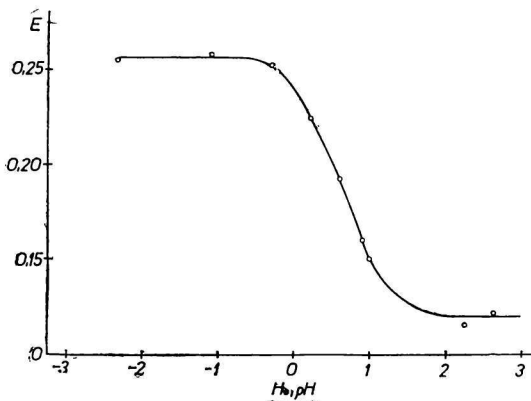
Absorpčná krivka teofylínu o pH 6 prechádza maximom pri 272 m μ . V prostredí 5 M-H₂SO₄ je maximum pri 266 m μ , pričom hodnota extinkcie pásu je takmer rovnaká (obr. 1). Absorpčné krivky v rozmedzí od pH 6 až po $H_0 = -2,28$ (5 M-H₂SO₄) prechádzajú vždy rovnakými izobestickými bodmi (215 m μ a 266 m μ), čo svedčí o jednostupňovej protonizácii.

Závislosť extinkcie roztoku teofylínu od hodnôt pH, resp. H_0 pri vlnovej dĺžke 242 m μ je znázornená na obr. 2. Ako pokračovanie stupnice pH sme použili Hammetovu funkciu H_0 , pričom koncentráciu H₂SO₄ sme stanovili titračne a vyjadrili v hodnotách H_0 pri



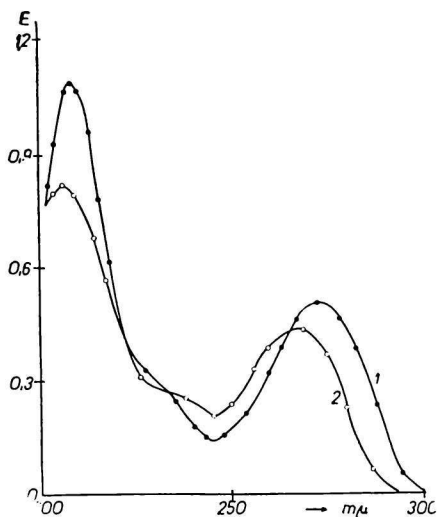
Obr. 1. Absorpčné krivky teofylínu.

Krivka 1: v destilovanej vode (pH 6); krivka 2: v 5 M-H₂SO₄ ($H_0 = -2,28$). $C = 10^{-4}$ M; hrúbka kvety 0,500 cm.



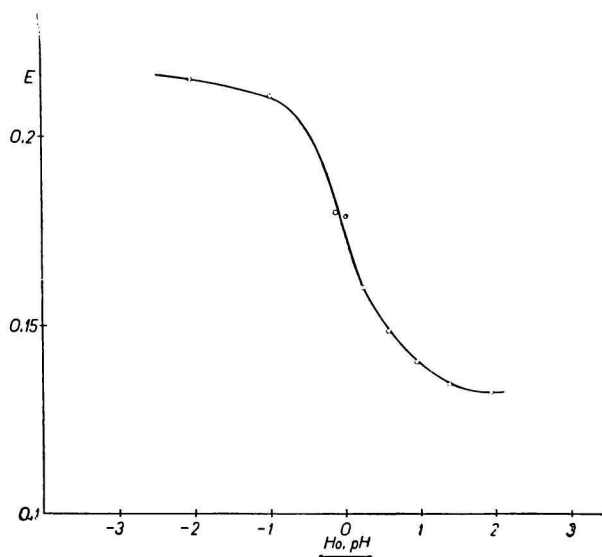
Obr. 2. Závislosť extinkcie roztoku teofylínu od hodnôt pH, resp. H_0 pri 242 m μ .

25 °C [18]. Z priebehu krivky na obr. 2 sa určila bazicita teofylínu, ktorú sme vyjadrili pomocou disociačnej konštanty jeho konjugovanej kyseliny. Hodnota pK teofylínu vyjadrená pomocou H_0 je 0,5 pri 25 °C.



Obr. 3. Absorpčné krivky 7-hydroxyetylteofylínu.

Krivka 1: v destilovanej vode (pH 6); krivka 2: v 5 M- H_2SO_4 ($H_0 = -2,28$). $C = 10^{-4}$ M; hrúbka kvety 0,500 cm.

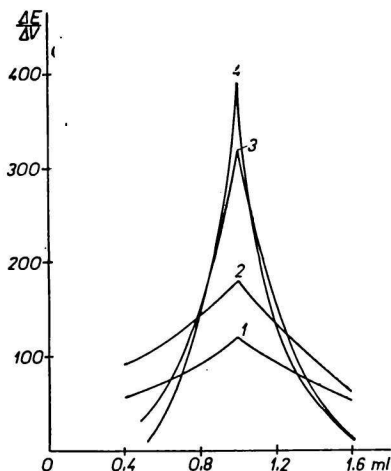


Obr. 4. Závislosť extinkcie roztoku 7-hydroxyetylteofylínu od hodnôt pH, resp. H_0 pri 244 mμ.

Ultrafialové spektrum 7-hydroxyetylteofylínu je takmer totožné so spektrom teofylínu (obr. 3). Závislosť extinkcie roztoku 7-hydroxyetylteofylínu od hodnôt pH, resp. H_0 pri 244 m μ je znázornená na obr. 4. Z priebehu krivky na obr. 4 sme podobne ako v prípade teofylínu určili hodnotu pK. Pre 7-hydroxyetylteofylín hodnota pK = 0,0 pri 25 °C.

Stanovenie teofylínu a 7-hydroxyetylteofylínu v bezvodom prostredí

Teofylín ako bázu možno stanoviť v prostredí kyseliny octovej kyselinou chloristou za potenciometrickej indikácie ekvivalentového bodu pri použití sklenej a kalomelovej elektródy [7, 8]. Podľa našich výsledkov sa potenciálový skok pridaním acetanhydridu zväčšuje, čo je v súhlase s autormi, ktorí v tomto prostredí stanovili niektoré purínové bázy [19, 20]. Lepšie výsledky než v acetanhydride sme dosiahli v zmesi acetanhydrid—benzén za použitia striebornej elektródy ako indikačnej. Podobne ako teofylín chová sa i 7-hydroxyetylteofylín a zmes teofylínu a 7-hydroxyetylteofylínu. Pri titrácii zmesi teofylínu so 7-hydroxyetylteofylínom vzniká iba jeden potenciálový skok zodpovedajúci sume oboch báz (obr. 5 a 6). Nedá sa ani očakávať, že by vznikli dva skoky vzhľadom na veľmi blízke disociačné konštanty oboch látok.



Obr. 5. Priebeh potenciometrických titračných kriviek (derivačných) stanovenia zmesi teofylínu a 7-hydroxyetylteofylínu 0,1 N-HClO₄ v dioxáne za použitia sklenej a kalomelovej elektródy v prostredí: krivka 1: 5 % acetanhydridu v kyseline octovej; krivka 2: 75 % acetanhydridu v kyseline octovej; krivka 3: 100 % acetanhydridu; krivka 4: 30 % acetanhydridu v benzéne.

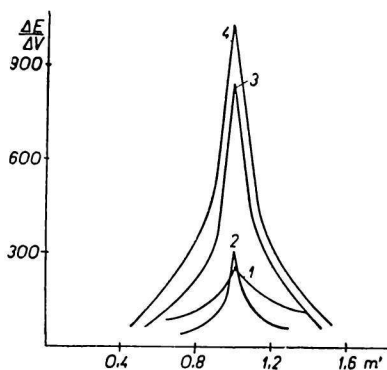
Hodnota smernice sa vzťahuje na objem 0,1 ml.

Stanovenie teofylínu a 7-hydroxyetylteofylínu po acetylácii acetanhydridom

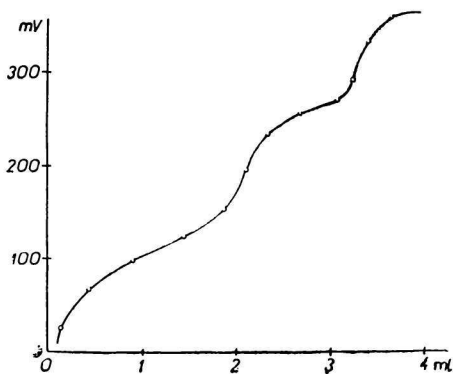
7-Acetylteofylín vzniknutý acetyláciou teofylínu je slabšou bázou než teofylín, čo sa prejavilo pri titrácii zmesi teofylínu a 7-acetylteofylínu, pričom vznikajú dva potenciálové skoky, z ktorých prvý zodpovedá teofylínu. Pri titrácii zmesi 7-hydroxyetylteofylínu a jeho acetylderivátu vzniká iba jeden potenciálový skok, čo svedčí o tom, že acetylácia 7-hydroxyetylteofylínu nemá vplyv na jeho bazicitu. Tým sa vytvára možnosť stanoviť teofylín a 7-hydroxyetylteofylín vedľa seba po ich acetylácii. Pri titrácii zmesi vznikajú

dva potenciálové skoky, z ktorých prvý zodpovedá 7-acetoxyetylteofylínu a druhý 7-acetylteofylínu (obr. 7).

Acetylácia teofylínu acetanhydridom za varu prebieha veľmi rýchlo, keď ca 50 mg teofylínu v 40 ml acetanhydridu sa kvantitatívne acetyluje už počas 5 minút. To sme



Obr. 6. Ako na obr. 5 s tou obmenou, že namiesto sklenej elektródy sa použila strieborná elektróda ako indikačná elektróda.



Obr. 7. Priebeh potenciometrickej titračnej krivky stanovenia zmesi teofylínu a 7-hydroxyetylteofylínu po acetylácii acetanhydridom. Indikačnou elektródou je strieborná a porovnávacou kalomelová elektróda.

dokázali tým, že po 5 minútovej acetylácii sme vzniknutý produkt izolovali a potvrdili jeho identitu elementárnou analýzou a bodom topenia. Bod topenia získanej látky bol 157—158 °C. Literatúra udáva pre 7-acetylteofylín b. t. 158 °C [21].

Analýza

Pre $C_9H_{10}N_2O_3$ ($M = 222,2$)

vypočítané	C = 48,65 %	H = 4,54 %	N = 25,22 %
zistené	C = 48,71 %	H = 4,44 %	N = 25,30 %

Ďalším dôkazom vzniku acetylderivátu je vymiznutie pásu NH v oblasti 3400 cm^{-1} a vznik pásu acetyl skupiny v oblasti 1230 cm^{-1} na infračervených spektrách.

Acetyláciu a nasledujúcou titráciou možno stanoviť 20—60 mg teofylínu a 20—100 mg 7-hydroxyetylteofylínu vedľa seba v ľubovoľnom pomere s chybou $\pm 2\%$.

Teofylín a 7-hydroxyetylteofylín možno stanoviť vedľa seba i tým spôsobom, že titráciou v nevodnom prostredí kyselinou chloristou možno stanoviť sumu oboch báz (obr. 6), pretože acetylácia týchto látok za laboratórnej teploty prebieha veľmi pomaly a prakticky neprebieha v zmesi acetanhydrid—benzén. Presnosť tohto stanovenia je $\pm 0,5\%$. Teofylín sa v ďalšom návažku stanoví argentometricky vedľa 7-hydroxyetylteofylínu, ktorý stanovenie neruší [6, 22]. Presnosť argentometrického stanovenia teofylínu za potenciometrickej indikácie ekvivalentového bodu je $\pm 0,3\%$.

Praktické uskutočnenie titrácie teofylínu a 7-hydroxyetylteofylínu

A. Zmes teofylínu a 7-hydroxyetylteofylínu v množstve 40—100 mg sa acetyluje v 40 ml acetanhydridu pri zahrievaní na bod varu pod spätným chladičom ca 5 minút. Reakčná zmes sa ochladí na laboratórnu teplotu, preleje do kadičky a titruje 0,1 N-HClO₄,

v dioxáne. Indikačnou elektródou je strieborná elektróda, ktorá sa pred použitím aktívuje ponorením do roztoku NH_4OH zriedeného destilovanou vodou 1 : 1, do ktorého sa pridá malé množstvo KNO_3 [25]. Titruje sa v atmosfére dusíka, pričom sa roztok intenzívne premiešava elektromagnetickou miešačkou. Pri titrácii vzniknú dva potenciálové skoky, z ktorých prvý zodpovedá 7-hydroxyetylteofylínu a druhý teofylínu. Je potrebné robiť slepý pokus na obsah bázičných látok v rozpúšťadle.

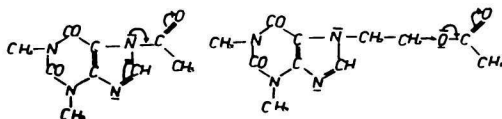
B. Zmes teofylínu a 7-hydroxyetylteofylínu v množstve 40—100 mg sa za mierneho zahrievania rozpustí v minimálnom množstve ľadovej kyseliny octovej (0,5—1,0 ml), pridá sa 12 ml acetanhydridu, 28 ml bezvodého benzénu a titruje sa 0,1 N- HClO_4 v atmosfére dusíka. Indikačnou elektródou je strieborná elektróda zapojená voči nasýtenej kalomelovej elektróde. Pri titrácii vzniká jeden potenciálový skok, ktorý zodpovedá sume teofylínu a 7-hydroxyetylteofylínu.

Teofylín sa stanoví v ďalšom navažku argentometricky, pričom 7-hydroxyetylteofylín stanovenie neruší. Odvážená látka s obsahom 10—50 mg teofylínu sa za mierneho zahrievania rozpustí v 30 ml destilovanej vody, ochladí sa na laboratórnu teplotu, pridá sa 10 ml nasýteného roztoku $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, a titruje sa 0,1 N- AgNO_3 za potenciometrickej indikácie ekvivalentového bodu. Indikačnou elektródou je strieborná elektróda zapojená voči nasýtenej kalomelovej elektróde.

Diskusia

Je známe, že metylderiváty xantínu majú bázičný charakter, ktorý im dodáva dusík v polohe 9 v imidazolovom kruhu [8]. Dá sa preto očakávať, že acetyláciou sekundárneho amínu v polohe 7 purínových báz sa zníži bazicita dusíka v polohe 9 v dôsledku mezomérneho účinku karbonylovej skupiny.

Tento predpoklad sa potvrdil pri titrácii zmesi teofylínu a 7-acetylteofylínu, keď na potenciometrickej titračnej krivke vznikli dva skoky, z ktorých prvý zodpovedá teofylínu a druhý 7-acetylteofylínu ako slabšej báze:



7-acetylteofylín

7-acetoxyetylteofylín

Acetylácia 7-hydroxyetylteofylínu neovplyvňuje bazicitu dusíka v polohe 9. Rozdielnosť vplyvu acetylskupiny na dusík v polohe 9 prostredníctvom dusíka v polohe 7 pri 7-acetylteofylíne a 7-acetoxyetylteofylíne je zapríčinená tým, že v prvom prípade ide o $-M$ efekt acetylovej skupiny, zatiaľ čo v druhom prípade o $-I$ efekt acetoxy skupiny, ktorý sa v dôsledku izolácie dvoma metylénovými skupinami takmer vôbec neprejavuje. Tú vlastnosť primárnych a sekundárnych amínov, že acetyláciou sa znižuje bazicita, využili pri stanovení báz v bezvodom prostredí aj iní autori [23, 24].

Ako indikačná elektróda pri stanovení teofylínu a jeho derivátov v prostredí acetanhydridu sa nám najlepšie osvedčila strieborná elektróda za použitia kalomelovej elektródy ako porovnávacej. Ustalo vanie potenciálu je rýchle a potenciálové skoky sú väčšie než pri elektródovej dvojici sklená—kalomelová [18] a antimónová—kalomelová [19]. Pri stanovení zmesi 7-acetylteofylínu a 7-acetoxyetylteofylínu v prostredí acetanhydridu dostali sme dva potenciálové skoky iba pri použití elektródovej dvojice strieborná—kalomelová.

Nami stanovená disociačná konštanta teofylínu pomocou funkcie H_0 ($pK = 0,5$ pri $25\text{ }^\circ\text{C}$), vyjadrená podľa klasickej teórie $K_b = 4 \cdot 10^{-14}$, je v dobrom súhlase s hodnotou uvedenou v literatúre $K_b = 1,74 \cdot 10^{-14}$ pri $25\text{ }^\circ\text{C}$, ktorá sa vypočítala zo stupňa hydrolyzy hydrochloridu stanoveného hydrolyzou octanu metylnatého [1].

Ďakujeme inž. M. Fedoroňkovi, C. Sc., za účinnú pomoc pri stanovení disociačných konštánt. Zároveň ďakujeme M. Pavlovičovej za zhotovenie ultrafialových spektier a O. Kiškovi za pomoc pri experimentálnych prácach.

Súhrn

Spektrofotometricky sa stanovila bazicita teofylínu a 7-hydroxyetylteofylínu vyjadrená pomocou disociačných konštánt ich konjugovaných kyselín. Takto sa stanovila hodnota $pK = 0,5$ pri $25\text{ }^\circ\text{C}$ pre teofylín a $pK = 0,0$ pri $25\text{ }^\circ\text{C}$ pre 7-hydroxyetylteofylín.

Súčasne sa vypracovala metóda na stanovenie teofylínu a 7-hydroxyetylteofylínu založená na titracii kyselinou chloristou v prostredí acetanhydridu za použitia striebornej elektródy ako indikačnej pri potenciometrickej indikácii ekvivalentového bodu.

Pred titráciou sa obidve látky acetylujú, čím sa bazicita teofylínu zníži natoľko, že na titračnej krivke vzniknú dva potenciálové skoky, z ktorých prvý zodpovedá 7-acetoxyetylteofylínu a druhý 7-acetylteofylínu. Bez acetylácie dávajú obidve látky pri titracii jeden spoločný skok, pretože ich disociačné konštanty sú blízke.

Teofylín a 7-hydroxyetylteofylín možno stanoviť aj tak, že sa najprv stanoví suma obidvoch báz neutralizačne v nevodnom prostredí a v ďalšom návazku sa stanoví teofylín argentometricky, pričom 7-hydroxyetylteofylín neruší.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПУРИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ (I)
 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕОФИЛЛИНА
 И 7-ГИДРОКСИЭТИЛТЕОФИЛЛИНА В БЕЗВОДНОЙ СРЕДЕ
 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ КОНСТАНТ ДИСОЦИАЦИИ
 ОБОИХ ВЕЩЕСТВ

К. ЛИНЕК, Ц. ПЭЦИАР

ЧСАН, Химический институт Словацкой академии наук в Братиславе

Была определена спектрофотометрическим способом основность теофиллина и 7-гидроксиэтилтеофиллина выраженная с помощью констант дисоциации их сопряженных кислот. Этим путем была определена величина $pK = 0,5$ при 25° для теофиллина и $pK = 0,0$ при 25° для 7-гидроксиэтилтеофиллина.

Одновременно был разработан метод определения теофиллина и 7-гидроксиэтилтеофиллина потенциометрическим титрованием хлорной кислотой в ацетангидриде. В качестве индикаторного электрода применяется серебряный электрод.

Перед титрацией обе вещества ацетируются, при этом основность теофиллина понижается настолько, что на титрационной кривой появляются два потенциальных скачка, из которых первый принадлежит 7-ацетоксиэтилтеофиллину, второй 7-ацетилтеофиллину. Без ацетилирования указанные вещества дают один общий скачок вследствие близости их констант дисоциации.

Теофиллин и 7-гидроксиэтилтеофиллин можно определить и таким образом: в одной навеске определяется сумма обоих оснований нейтрализацией в безводной среде, в другой теофиллин определяется аргентометрически, причем присутствие 7-гидроксиэтилтеофиллина не мешает.

Поступило в редакцию 22. 1. 1962 г.

BESTIMMUNG VON PURINBASEN (I)
 BESTIMMUNG VON THEOPHYLLIN UND
 7-HYDROXYÄTHYLTHEOPHYLLIN IN WASSERFREIEM MEDIUM
 BESTIMMUNG DER BASISCHEN DISSOZIATIONSKONSTANTEN
 BEIDER STOFFE

K. LINEK, C. PECIAR

ČSAV, Chemisches Institut an der Slowakischen Akademie der Wissenschaften
 in Bratislava

Die Autoren bestimmten spektrophotometrisch die Basizität des Theophyllins und des 7-Hydroxyäthyltheophyllins, ausgedrückt mit Hilfe der Dissoziationskonstanten deren konjugierten Säuren. Die auf diese Weise ermittelten Werte betragen $pK = 0,5$ bei $25^\circ C$ für Theophyllin, und $pK = 0,0$ bei $25^\circ C$ für 7-Hydroxyäthyltheophyllin.

Gleichzeitig wurde eine Methode für die Bestimmung des Theophyllins und des 7-Hydroxyäthyltheophyllins ausgearbeitet, die auf der Titration mittels Perchlorsäure im Medium von Acetanhydrid aufgebaut ist, u. zw. unter Verwendung einer Silberelektrode als Indikationselektrode, bei potentiometrischer Indikation des Äquivalenzpunkts.

Vor der Titration werden beide Stoffe acetyliert, wodurch die Basizität des Theophyllins soweit erniedrigt wird, dass auf der Titrationskurve zwei Potentialsprünge entstehen, von denen der erste dem 7-Acetoxyäthyltheophyllin, und der zweite dem 7-Acetyltheophyllin entspricht. Ohne einer vorangegangenen Acetylierung geben beide Stoffe bei der Titration nur einen gemeinsamen Potentialsprung, da deren Dissoziationskonstanten nahe zueinander gelegen sind.

Theophyllin und 7-Hydroxyäthyltheophyllin können auch in der Weise bestimmt werden, dass man zunächst die Summe der beiden Basen durch Neutralisation in wasserfreiem Medium ermittelt, und dass man hierauf in einer weiteren Einwaage das Theophyllin argentometrisch ermittelt, wobei das vorhandene 7-Hydroxyäthyltheophyllin keinen störenden Einfluss ausübt.

In die Redaktion eingelangt den 22. 1. 1962

LITERATÚRA

1. Wood J. K., *J. Chem. Soc.* 89, 1839 (1906). — 2. Ogston A. G., *J. Chem. Soc.* 1935, 1376. — 3. Turner A., Osol A., *J. Am. Pharm. Assoc.* 38, 158 (1949). — 4. Cavalieri L. F., Fox J. J., Stone A., Chang N., *J. Am. Chem. Soc.* 76, 1119 (1954). — 5. Bosly J., *J. Pharm. Belg.* 11, 387 (1956). — 6. Hoch B., Tomiček O., *Čas. čes. lékár., Věd. příl.* 63, 186 (1950). — 7. Spengler H., Kaelin A., *Hundert Jahre Schweiz. Apoth.-Ver.* 1843—1943, 542 (1943); *C. A.* 38, 1844 (1944). — 8. Tetsu Kashima, *J. Pharm. Soc. Japan* 74, 1078 (1954); *C. A.* 49, 2031 (1955). — 9. Llopis A. B., *Galenica Acta (Madrid)* 8, 115 (1955); *C. A.* 50, 8141 (1956). — 10. Fritz J. S., Fulda M. O., *Anal. Chem.* 25, 1837 (1953).
11. Schack J. A., Waxler S. H., *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 97, 283 (1949). — 12. Comer J. P., Hilty W. W., *J. Am. Pharm. Assoc.* 43, 287 (1954). — 13. Helgren P. F., Chadde F. E., Campbell D. J., *J. Am. Pharm. Assoc.* 46, 644 (1957). — 14. Hyatt R., *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists* 37, 673 (1954). — 15. Lukáts B., Takácsi N. G., Gyenes I., *Gyógyszerészet* 4, 264 (1960). — 16. *Frđl.* 8, 1137 (1905—1907). — 17. Kreamsbrucker H., *Scientia Pharmac.* 27, 282 (1959). — 18. Paul M. A., Long F. A., *Chem. Rev.* 57, 1 (1957). — 19. Gutterson M., Ma T. S., *Mikrochim. Acta* 1960, 1. — 20. Škodín A. M., Karkuzaki L. I., *Ž. anal. chim.* 15, 676 (1960).
21. Biltz H., Strufe K., *Ann.* 404, 170. — 22. Peciar C., Linek K., *Chem. zvesti* 14, 425 (1960). — 23. Nicksic S. W., Judd S. H., *Anal. Chem.* 32, 998 (1960). — 24. Huber W., *Angew. Chem.* 72, 865 (1960). — 25. Clark W., *J. Chem. Soc.* 1926, 749.

Do redakcie došlo 22. 1. 1962

Adresa autorov:

Inž. Kazimír Linek, inž. Cyril Peciar, Bratislava, Dúbravská 5, Chemický ústav SAV.