

УДК 543.426: 546.65: 615.07.

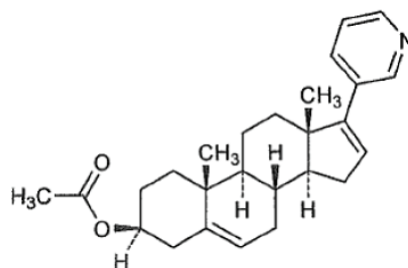
**И. И. Леоненко<sup>1</sup>, Ю. В. Скрипинец<sup>1</sup>, А. В. Егорова<sup>1</sup>, А. В. Анельчик<sup>2</sup>**<sup>1</sup>Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины  
Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина<sup>2</sup>ОДО «ИНТЕРХИМ», Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина**СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ И ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ  
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АБИРАТЕРОНА АЦЕТАТА**

Предложены методики спектрофотометрического (СФ) и флуориметрического (Фл) определения нового противоопухолевого препарата абиратерона ацетата (АА). СФ методика основана на измерении светопоглощения этанольного раствора АА при длине волны 253 нм. Градуировочный график (ГГ) линеен в интервале концентраций АА 1.0–30.0 мкг/мл, предел обнаружения (ПО) равен 0.35 мкг/мл.

Разработаны два варианта Фл определения АА: по его собственной люминесценции ( $\lambda_{\text{возб}}=253$  нм;  $\lambda_{\text{люм}}=350$  нм) и по тушению абиратероном ацетатом сенсibilизированной люминесценции комплекса Тб(III). ГГ в случае нативной флуоресценции линеен в интервале 0.05–7.0 мкг/мл, ГГ в координатах Штерна-Фольмера линеен в интервале концентраций 0.05–70.0 мкг/мл. ПО в обеих люминесцентных методиках равен 0.017 мкг/мл.

**Ключевые слова:** спектрофотометрия, флуориметрия, сенсibilизированная люминесценция тербия (III), абиратерона ацетат.

Абиратерона ацетат (АА) – антиандрогенный нестероидный препарат с противоопухолевой активностью [1,2].



Абиратерона ацетат (17-(пиридин-3-ил)-андроста-5,16-диен-3β-ил ацетат)

В Фармакопее США [1] описана процедура определения АА в его субстанции методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектором. Аналогичный метод [3] валидирован для определения содержания АА в плазме крови крыс после предварительного экстракционного извлечения АА и диклофенака (внутреннего стандарта). Определения проводили на системе Waters Alliance в изократическом режиме на колонке Betasil C18 (подвижная фаза ацетонитрил-вода-дигидрофосфат калия = 55:5:40, pH 3,0, скорость потока 1.00 мл/мин, детектирование при 255 нм, время анализа – 10 мин).

Разработаны и валидированы методики ВЭЖХ определения АА с tandemным масс-спектрометрическим детектором в плазме крови человека и крыс [4, 5] с нижними пределами определения 0.2 нг/мл [4] и 0.1 нг/мл [5].

Необходимо отметить, что достижение уникальных по селективности и чувствительности параметров определения с помощью ВЭЖХ требует использования сложного и дорогостоящего оборудования.

На основе комплексов включения АА в  $\beta$ -циклодекстрин предложена более простая методика спектрофлуориметрического определения абиратерона ацетата и его метаболита в лекарственных формах и биожидкостях человека с помощью градуировочного графика, линейного в интервале концентраций 0.20–6.0 мкг/мл, и ПО, равным 0.07 мкг/мл [6].

В данной работе показаны новые возможности высокочувствительного определения абиратерона ацетата спектрофотометрически, по его собственной люминесценции, а также по тушению ним интенсивности люминесценции ( $I_{\text{люм}}$ ) зонда – комплекса Tb(III)–R, где в качестве сенсibilизатора R использован 1-бутил-4-гидрокси-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоновой кислоты-(4-метил-пиридин-2-ил)-амид, синтезированный по [7].

### **Материалы и методы**

В работе использовали стандартный раствор хлорида тербия (0.01 моль/л), который готовили из соответствующего оксида высокой чистоты. Концентрацию металла определяли комплексонометрически.

Стандартный раствор реагента-сенсibilизатора R – 1-бутил-4-гидрокси-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоновой кислоты-(4-метил-пиридин-2-ил)-амида ( $1 \times 10^{-3}$  моль/л) готовили растворением точной навески препарата в диметилформамиде.

Стандартный раствор АА (1000 мкг/мл) готовили растворением точной навески фармацевтической субстанции в этиловом спирте. Его разбавлением этанолом готовили рабочие растворы АА (1.0 мкг/мл, 10.0 мкг/мл, 100.0 мкг/мл). В работе использовали реактивы квалификации ч.д.а. и х.ч., вода – бидистиллированная.

40%-ный водный раствор уротропина готовили растворением 200.0 г уротропина в воде, с последующим доведением хлористоводородной кислотой до pH 7.5 и доведением полученного раствора водой до объема 500 мл.

Электронные спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре UV-2401 PC «Shimadzu» (Япония) с использованием кварцевых кювет ( $l = 1$  см).

Спектры возбуждения люминесценции и люминесценции, а также кривые ее затухания регистрировали с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse «Varian» (Австралия) с ксеноновой лампой 150 W. Значения времен жизни возбужденного состояния ионов тербия вычисляли с использованием программного обеспечения Cary Eclipse.

Значения pH растворов измеряли с помощью pH-метра Lab 850 (Schott Instruments GmbH, Germany) со стеклянным электродом, калибровку которого проводили с помощью стандартных буферных растворов. Все измерения проводили при комнатной температуре (21–23°C).

### Результаты и их обсуждение

Спектр поглощения этанольного раствора АА (рис. 1, а) характеризуется наличием интенсивной полосы в УФ-области спектра с максимумом поглощения при  $\lambda = 253$  нм, удельный коэффициент поглощения  $E_{1\text{см}}^{1\%} = 226.87 \pm 7.32$  ( $S_r=1.3\%$ ).

### Спектрофотометрическое определение АА

#### Градуировочный график

Для построения градуировочного графика в ряд мерных колб объемом 10.0 мл вносили по 0.1; 0.3; 0.5; 0.7; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0 мл рабочего раствора АА (100 мкг/мл). Растворы доводили до 10.0 мл этиловым спиртом и перемешивали. Измеряли оптическую плотность А при  $\lambda=253$  нм (рис. 1, а).

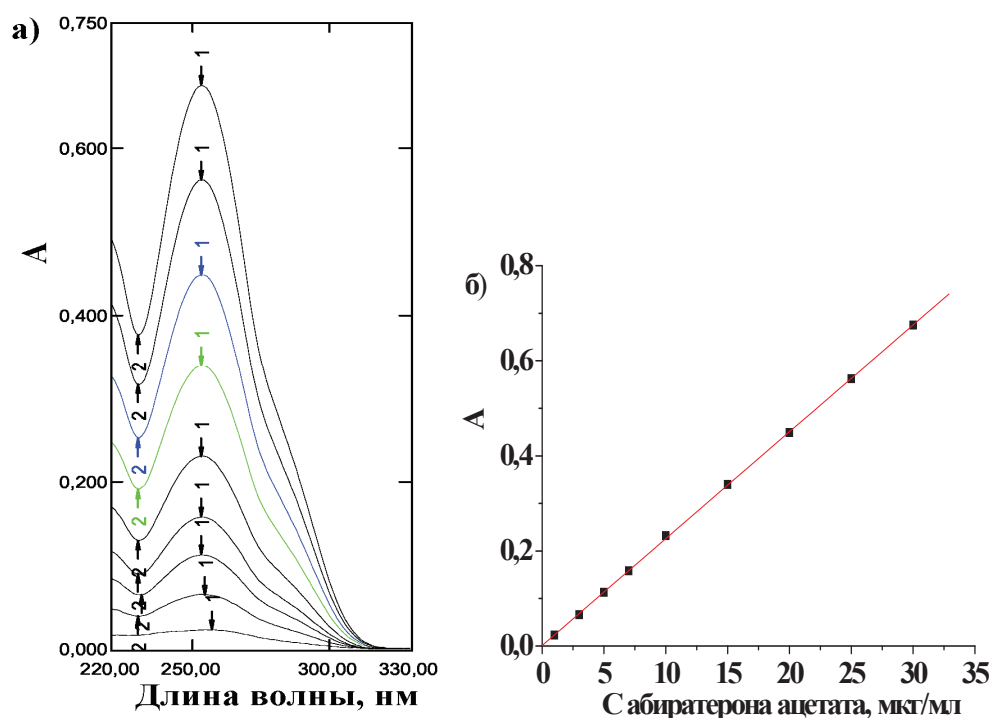


Рис. 1. Спектры поглощения растворов различной концентрации АА (а) и градуировочный график для его определения СФ-методом (б).

Зависимость А от  $C_{\text{АА}}$  (рис. 1, б) описывается уравнением  $A = 0.0013 + 0.0225 C_{\text{АА}}$  ( $R = 0.9999$ ) и линейна в интервале концентраций АА 1.0–30.0 мкг/мл. Предел обнаружения составляет 0.35 мкг/мл.

### Люминесцентное определение АА по собственной люминесценции

Как видно из рис 2, максимум возбуждения люминесценции АА наблюдается при  $\lambda = 253$  нм и совпадает с максимумом длины волны в спектре его поглощения (рис. 1, а).

#### Градуировочный график

Для построения градуировочного графика в ряд мерных колб объемом 10.0 мл вносили по 0.5; 1.0 мл рабочего раствора АА (1.0 мкг/мл), 0.3; 0.5; 0.8 мл рабочего раствора АА (10.0 мкг/мл) и по 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6; 0.7 мл рабочего раствора АА (100.0 мкг/мл). Растворы доводили до 10.0 мл этиловым спиртом и перемешивали. Параллельно измеряли  $I_{\text{люм}}$  этилового спирта в этих условиях ( $I_{\text{хол}}$ ). Через 5 минут измеряли  $I_{\text{люм}}$  ( $I_{\text{АА}}$ ) при  $\lambda_{\text{эмис}} = 350$  нм ( $\lambda_{\text{возб}} = 253$  нм) (рис. 3, а).

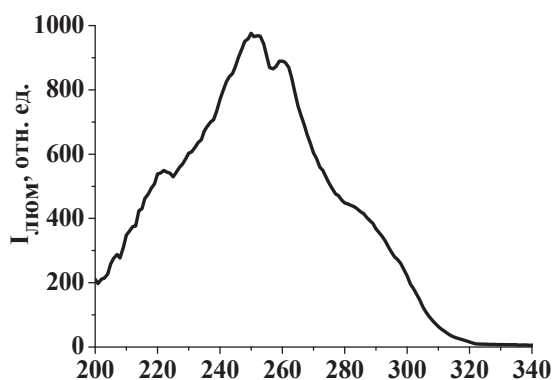


Рис. 2. Спектр возбуждения люминесценции АА ( $\lambda_{\text{эмис}} = 350$  нм; щели 5-5; усиление 620).

По полученным данным с учетом холостой пробы ( $I_{\text{АА}} - I_{\text{хол}}$ ) строили градуировочный график, который описывается уравнением  $I_{\text{люм}} = 0.727 + 137.054 C_{\text{АА}}$  ( $R = 0.9979$ ) и линеен в интервале концентраций АА 0.05–7.0 мкг/мл. Предел обнаружения составляет 0.017 мкг/мл (рис. 3, б).

С увеличением концентрации АА (>7.0 мкг/мл) наблюдается концентрационное тушение его люминесценции.

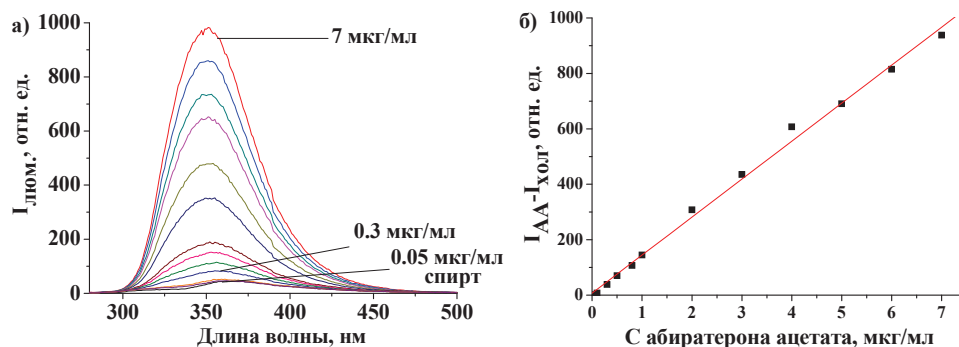


Рис. 3. Спектры собственной люминесценции (а) и градуировочный график для люминесцентного определения АА (б) ( $\lambda_{\text{возб}} = 253$  нм; щели 5-5; усиление 620).

### Люминесцентное определение АА по тушению эмиссии зонда Tb(III)-R

Ранее нами был предложен люминесцентный зонд на основе комплекса Tb(III)-R (R=1-бутил-4-гидрокси-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоновой кислоты-(4-метил-пиридин-2-ил)-амида) [8, 9] для определения лекарственных препаратов по тушению ими интенсивности люминесценции комплекса. Установлено, что в оптимальных условиях образования комплекса Tb(III)-R (рН = 7.0-9.5) при введении разных количеств абиратерона ацетата наблюдается уменьшение 4f-люминесценции (рис. 4, а).

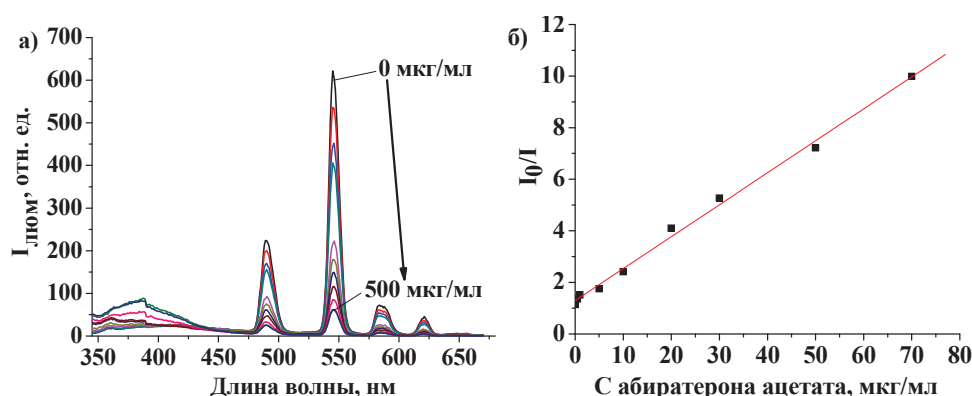


Рис. 4. Спектры люминесценции комплекса Tb(III)-R в присутствии различных концентраций АА (а) и градуировочный график в координатах Штерна-Фольмера (б) для его люминесцентного определения ( $C_{Tb(III)} = C_R = 1 \times 10^{-5}$  моль/л, рН = 7.5;  $\lambda_{возб} = 317$  нм, щели 5-5; усиление 650).

#### Градуировочный график

Для построения градуировочного графика в ряд мерных колб объемом 10.0 мл вносили по 0.5 мл рабочего раствора АА (1.0 мкг/мл); по 0.1; 0.2; 0.3; 0.5; 0.7 мл рабочего раствора АА (10.0 мкг/мл) и 0.1; 0.3; 0.5; 0.7 мл рабочего раствора АА (100.0 мкг/мл) и 0.1; 0.2; 0.3; 0.5; 0.70; 1.0 мл рабочего раствора АА (1000 мкг/мл). Содержание этилового спирта во всех растворах составляет 1.0 мл (10%, об/об). В каждую колбу добавляли по 1.0 мл  $1 \times 10^{-4}$  моль/л раствора хлорида тербия (III), 0.1 мл  $1 \times 10^{-3}$  моль/л раствора R, 0.4 мл 40%-ного раствора уротропина. Параллельно готовили раствор контрольной пробы, который содержит все компоненты, кроме АА. Растворы доводили до 10.0 мл водой и перемешивали. Через 5 минут измеряли  $I_{люм}$  при  $\lambda_{эмис} = 545$  нм ( $\lambda_{возб} = 317$  нм). По полученным данным строили градуировочный график в координатах Штерна-Фольмера (рис. 4, б), который описывается уравнением  $I_0/I = 1.293 + 0.124 C_{AA}$  ( $R = 0.9979$ ) и линеен в интервале концентраций 0.05–70.0 мкг/мл.

Обнаруженный нами эффект тушения предложен для люминесцентного определения абиратерона ацетата с пределом его обнаружения 0.017 мкг/мл.

**Ход анализа**

Таблетки «Зитига» (ZYTIGA, Patheon Inc., Канада) (абиратерона ацетата 250 мг)

Для трех предложенных вариантов СФ и Фл определения АА представлен общий ход анализа. Для заключительной стадии измерения аналитических сигналов (оптической плотности и  $I_{\text{люм}}$ ) в табл. 1 приведены аликвоты конечного анализируемого раствора и вместимости мерных колб для окончательного разбавления.

20 предварительно взвешенных таблеток препарата растирают в ступке до порошкообразного состояния. Навеску порошка, эквивалентную средней массе таблетки, помещают в мерную колбу вместимостью 250.0 мл, растворяют в 70 мл этилового спирта и доводят до метки тем же растворителем (1000 мкг/мл, раствор А). Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр «синяя лента», отбрасывая первые порции фильтрата.

10.0 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 100.0 мл и доводят до метки тем же растворителем (100 мкг/мл, раствор Б).

$V_1$  мл раствора помещают в мерную колбу вместимостью  $V_2$  мл, прибавляют все реагенты как при построении градуировочных графиков и проводят соответствующие измерения.

Таблица 1  
Аликвоты анализируемого раствора ( $V_1$ ) и объемы мерных колб ( $V_2$ ) для окончательного разбавле

Метод	$V_1$ , мл	$V_2$ , мл
СФ	10.0 (раствор Б)	50.0
Собственная флуоресценция	5.0 (раствор Б)	100.0
Сенсибилизированная люминесценция	0.3 (раствор А)	10.0

Параллельно готовят для каждой методики аналогичные растворы рабочего стандартного образца АА и проводят соответствующие измерения как при построении градуировочных графиков.

Растворы использовали свежеприготовленными.

Разработанные методики использованы для выполнения теста «Количественное определение» таблетированной лекарственной формы «Зитига» (ZYTIGA, Patheon Inc., Канада). Результаты определения АА представлены в табл. 2. Предлагаемые методики характеризуются удовлетворительными метрологическими характеристиками и простотой выполнения.

**Выводы**

Разработаны методики СФ и два варианта Фл определения нового противоопухолевого препарата абиратерона ацетата (АА): по его собственной люминесценции и по тушению абиратероном ацетатом сенсибилизированной люминесценции комплекса Tb(III).

Таблица 2

Результаты определения абиратерона ацетата в таблетках «Зитига»  
(«ZYTIGA, Patheon Inc.», Канада) по 250 мг (n = 5, P = 0.95)

Метод	X, мг	$X_{cp} \pm \Delta X$	$S_r$
СФ	254	250.2 ± 3.6	0.011
	252		
	248		
	247		
	250		
Собственная флуоресценция	251	250.8 ± 6.1	0.020
	254		
	247		
	257		
	245		
Сенсибилизированная люминесценция	249	249.4 ± 8.5	0.027
	245		
	254		
	258		
	241		

Предложенные методики экспрессны, обладают удовлетворительными метрологическими характеристиками и могут быть использованы в тестах «Растворение», для определения остаточных количеств абиратерона ацетата в смывах с поверхностей фармооборудования при контроле качества его очистки.

### Литература

1. The United States Pharmacopeia – 2013 (<http://www.usp.org>).
2. *Moreira V. M. A., Vasaitis T. S., Njar V. C. O., Salvador J. A. R.* Synthesis and evaluation of novel 17-indazole androstene derivatives designed as CYP17 inhibitors – 2007. – Vol. 72. – P. 939–948.
3. *Kumar S. V., Rudresha G., Gurav S., Zainuddin M., Dewang P., Kethiri R.R., Rajagopal S., Mullangi R.* Validated RP-HPLC/UV method for the quantitation of abiraterone in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study in rats // *J. Fluoresc.* – 2013. – Vol. 27, №2. – P. 203–207.
4. *Gurav S., Punde R., Farooqui J., Zainuddin M., Rajagopal S., Mullangi R.* Development and validation of a highly sensitive method for the determination of abiraterone in rat and human plasma by LC-MS/MS-ESI: application to a pharmacokinetic study / *Biomed. chromatography* – 2012. – Vol. 26, №6. –P. 761–768.
5. *Wani T. A.* Highly sensitive ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of abiraterone in human plasma / *Anal. Methods* – 2013. – Vol. 5. – P. 3693–3699.
6. *Gong A, Zhu X.*  $\beta$ -cyclodextrin sensitized spectrofluorimetry for the determination of abiraterone acetate and abiraterone / *J. Fluoresc.* – 2013. – Vol. 23, №6. –P. 1279–1286.
7. *Українець І. В., Ель Каяль С. А., Горохова О. В., Сидоренко Л. В.* Синтез та протитуберкульозна активність метилзаміщених піридил-2-амідів 1-R-2-оксо-4-гідроксигінолін-3-карбонових кислот // *Фармацевтичний журнал.* – 2004. – № 4. – С. 47–53.
8. *Леоненко И.И., Александрова Д.И., Егорова А.В., Антонович В.П., Українець І.В.* Определение прогестерона с использованием эффекта тушения комплексного соединения Tb(III) / *Вісн. Одеськ. нац. ун-ту. Хімія.* – 2010 – Т. 15, Вип. 2. – С. 29–39.
9. *Leonenko I., Aleksandrova D., Yegorova A.* Determination of carvedilol by its quenching effect on the luminescence of terbium complex in dosage form / *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research.* – 2011. – Vol. 68, № 3. – P. 325–330.

Стаття надійшла до редакції 28.10.13

**І. І. Леоненко<sup>1</sup>, Ю. В. Скрипинець<sup>1</sup>, А. В. Єгорова<sup>1</sup>, Г. В. Анельчик<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Фізико-хімічний інститут ім. О.В.Богатського НАН України,  
Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна

<sup>2</sup>ТДВ «ІНТЕРХІМ», Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна

## **СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ТА ЛЮМІНЕСЦЕНТНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АБІРАТЕРОНУ АЦЕТАТУ**

Запропоновано методики спектрофотометричного (СФ) та флуориметричного (Фл) визначення нового протипухлинного препарату абіратерону ацетату (АА). СФ методика заснована на вимірюванні світлопоглинання етанольного розчину АА за довжини хвилі 253 нм. Градувальний графік (ГГ) лінійний в інтервалі концентрацій АА 1.0-30.0 мкг/мл, межа виявлення (МВ) дорівнює 0.35 мкг/мл.

Розроблено два варіанти Фл визначення АА: за його власною люмінесценцією ( $\lambda_{\text{збудж}}=253$  нм;  $\lambda_{\text{люм}}=350$  нм) та за гасінням абіратероном ацетатом сенсibilізованої люмінесценції комплексу Tb(III). ГГ у разі нативної флуоресценції лінійний в інтервалі 0.05-7.0 мкг/мл, ГГ в координатах Штерна-Фольмера лінійний в інтервалі концентрацій 0.05-70.0 мкг/мл. МВ в обох люмінесцентних методиках дорівнює 0.017 мкг/мл.

**Ключові слова:** спектрофотометрія, флуориметрія, сенсibilізована люмінесценція тербію(III), абіратерону ацетат

**I. I. Leonenko<sup>1</sup>, Yu. V. Skripinets<sup>1</sup>, A. V. Yegorova<sup>1</sup>, G. V. Anelchik<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>A. V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of the National Academy of Sciences of  
Ukraine, Lustdorfskaya doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine

<sup>2</sup>“INTERCHEM”, Lustdorfskaya doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine

## **SPECTROPHOTOMETRIC AND LUMINESCENCE DETERMINATION OF ABIRATERONE ACETATE**

The methods of the spectrophotometric (SP) and fluorimetric (FL) determination of a new anticancer drug, abiraterone acetate (AA) have been proposed. SP method is based on measurement of light absorbance of ethanol solution of AA at a wavelength 253 nm. The calibration graph (CG) is linear in the concentration range 1.0–30.0 AA  $\mu\text{g/ml}$ , the limit of detection (LOD) is 0.35  $\mu\text{g/ml}$ .

Two versions of FL determination of AA: on its native luminescence ( $\lambda_{\text{ex}}=253$  nm;  $\lambda_{\text{lum}}=350$  nm) and on quenching sensitized luminescence of the terbium(III) complex by abiraterone acetate have been developed. CG in the case of native fluorescence is linear in the range of 0.05–7.0  $\mu\text{g/ml}$ , Stern-Folmer calibration curve is linear in the interval of concentrations of AA 0.5–70  $\mu\text{g/ml}$ . LOD of both fluorescent methods is 0.017  $\mu\text{g/ml}$ .

**Key words:** spectrophotometry, fluorimetry, sensitized luminescence of terbium (III), abiraterone acetate