

# Piperazinil-kinazolin szerkezetű $\alpha$ -adrenerg receptor gátlók összehasonlító fiziko-kémiai és stabilitás vizsgálata\*

Stevlik Klára gyh.<sup>1</sup>, Gyéresi Árpád<sup>2</sup>, Ludányi Krisztina<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Gógyszerészeti Kar, 5. év, <sup>2</sup>Gyógyszerészeti Kémiai Tanszék,

<sup>3</sup>Semmelweis Egyetem Budapest, Gyógyszerészeti Intézet

## Studiul fizico-chimic comparativ și al stabilității blocantelor $\alpha$ -adrenergice din seria derivaților de piperazinil-chinazolină

Blocantele  $\alpha$ 1-adrenergice selective au o importanță deosebită în terapia antihipertensivă. Scopul lucrării a fost efectuarea unui studiu analitic comparativ în seria derivaților de piperazinil-chinazolină (prazosin, terazosin și doxazosin) privind identificarea și separarea acestora și analiza compușilor lor de degradare utilizând metode cromatografice (pe strat subțire-CSS, de lichide sub presiune-CLP cu detectare MS) și spectrofotometrică în UV.

## Physico-chemical and stability study of piperazinyl-quinazoline $\alpha$ -adrenergic blocking agents

The  $\alpha$ 1-selective adrenergic blocking agents have been used for a long time in the treatment of hypertension. The aim of our work was a comparative study between piperazinyl-quinazoline derivatives (prazosin, terazosin, doxazosin), the identification and separation of these substances and the analysis of their degradation products, using modern analytical chromatographic (TLC, HPLC-MS) and UV-spectrophotometric methods.

Orvostudományi Értesítő, 2007, 80 (2): 141-144

www.emeogysz.ro

\*A Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem XIV. Tudományos Diákköri Konferenciáján díjnyertes dolgozat

Napjainkban a hipertónia egyike a leggyakrabban előforduló szív-érrendszeri megbetegedéseknek. A jelenlegi gyógyszerkutatások célja a szelektív  $\alpha$ 1- és  $\alpha$ 2-receptorokat bénító vegyületek előállítása. Ezek közül az  $\alpha$ 1-receptort szelektíven bénító piperazinil-kinazolin szerkezetű vegyületek váltak széles körben felhasznált gyógyszerekké [3, 4, 7]. A szakirodalom számos modern analitikai módszert említ ezen vegyületek vizsgálatára: UV-spektrofotometria, IR-spektroszkópia, vékonyréteg-kromatográfia (VRK), NMR-spektroszkópia, tömegspektrometria [1, 2, 8, 11].

A tömegspektrometria, mint anyagvizsgálati módszer egyre nagyobb teret hódít a műszeres analitikai kémiában. Rohamos elterjedését nagy hatékonyságának köszönheti, mivel igen kis mennyiségű anyagról rövid idő alatt nagyszámú információt képes nyújtani. Nagy előnye, hogy elválasztástechnikai módszerekkel kapcsolható (HPLC-MS, LC-MS, GC-MS), így többkomponensű elegyek vizsgálatára is alkalmas. A tömegspektroszkópiás analízis során a vizsgálandó anyagból ionokat állítunk elő, és a keletkezett szabad állapotú ionokat tömeg/töltés arány szerint elválasztjuk [9].

## Vizsgálati anyag és módszer

Vizsgált vegyületeink: Prazosin (Minipress, 2 mg tableták, Pfizer), Doxazosin (Sigma-Aldrich), Terazosin (Egis-Budapest), valamint metanol, acetonitril, TFA-trifluor-acetát, etil-acetát, dietil-amin analitikai minőségben. Alkalmazott módszereinkhez felhasznált berendezések: Cary 3E UV-VIS spektrofotométer, Agilent 1100 HPLC-MSD kromatográfias rendszer ESI (Electro Spray Ionization) módban, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, „Merck” 20 × 20 cm-es kromatográfias lemezek.

### A. A vegyületek azonosítási és szétválasztási módszerei

1. *UV-spektrofotometria:* Az UV-spektrofotometria az Európai Gyógyszerkönyvben (E. Ph. 5.0) a Prazosin-hidroklorid cikkelyénél, azonosítási módszerként szerepel. Ezt a módszert alkalmaztuk a három rokonszerkezetű

vegyület vizsgálatánál.

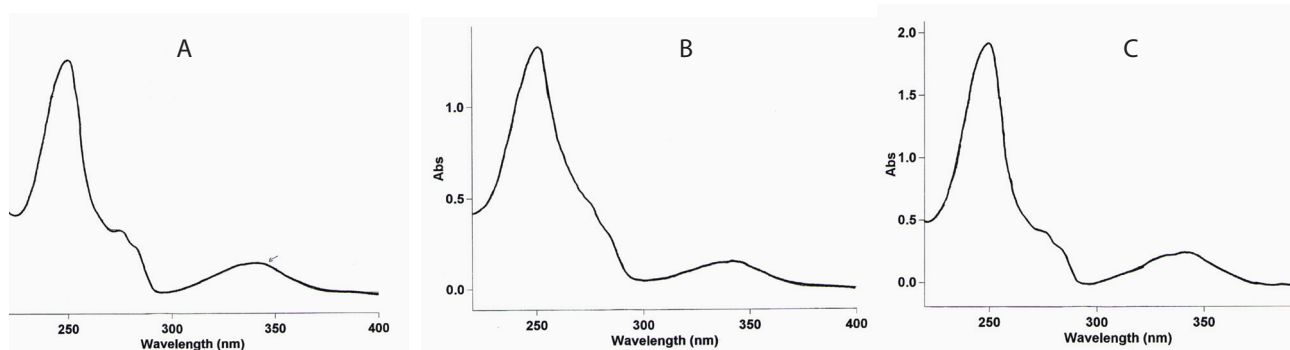
A spektrumok felvételéhez a vegyületek 20  $\mu$ g/ml koncentrációjú metanolos oldatait használtuk. A spektrumokat Cary 3E, UV-VIS spektrofotométer segítségével vettük fel a  $\lambda$ =220-400 nm hullámhossz tartományban.

2. *Vékonyréteg-kromatográfia (VRK):* A módszer azonosításra és egyben szétválasztásra is szolgál. Az Európai Gyógyszerkönyvben (E. Ph. 5.0) a Prazosin-hidroklorid cikkelyénél leírt módszert tekintettük kiindulópontnak. Vegyületeink 0,4 mg/ml koncentrációjú oldatait VRK lemezen (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 20 × 20 cm) kifejlesztettük 15 cm fronttávolságig. Kifejlesztőszerként dietil-amin-etil-acetát (5:95) v/v keverékét alkalmaztuk. A kromatogramokat UV-fényben ( $\lambda$ =254 nm) értékeltük.

1.táblázat. A vizsgált  $\alpha$ -adrenerg receptorgátlók szerkezeti adatai

| 1-(4-amino-6,7-dimetoxi-kinazolinil)karbonil piperazin |                                 |                |
|--------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------|
| Elnevezés                                              | R                               | Gyógyszerkönyv |
| Terazosin                                              | tetrahidrofurán-2-il            | [10, 11]       |
| Prazosin                                               | furán-2-il                      | [10, 11, 12]   |
| Doxazosin                                              | 2,3-dihidro-1,4benzodioxin-2-il | [11, 12]       |





1. ábra. A vizsgált vegyületek UV-spektrumai (A-Doxazosin, B- Prazosin, C- Terazosin)

3. *HPLC-MS vizsgálatok:* Vegyületeink 40 µg/ml koncentrációjú metanolos oldatait nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiába injektáltuk. Mozcófázisként acetonitril-víz (0,1% TFA) (20:80) v/v arányú keverékét alkalmaztuk. A kromatografálást fordított fázisú oszlopon (15 cm × 2,1 mm, 5 µm szemcseméretű töltet), 0,5 ml/perc áramlási sebesség mellett 15 percig végeztük. Az elegyből történő hatékony szétválasztás érdekében gradiens módszert alkalmaztunk: az oldószerkelet összetételét a mérés folyamán változtattuk, hogy késleltessük az egyes anyagok leválását az oszlopról, amelyek igen közeli retenció idővel rendelkeztek.

#### B. A lúgos bomlás vizsgálata

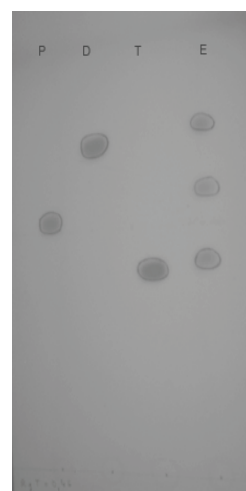
Kísérleteink további célja volt a vegyületek lúgos közegben történő bomlásának tanulmányozása. Vizsgálataink kiindulópontjaként *Bebawy L.I.* és *mtsai [2]* közleménye szolgált. A fő bomlásterméket egy órán át tartó lúgos hidrolízis után azonosítottuk. A vegyületek 5 mg/ml oldatához 50 ml 8%-os NaOH-ot adtunk és egy órán át 80 °C-os vízfürdőben melegítettük [2]. Az oldatból 10 percenként mintát vettünk, megfelelő mennyiségű sósavval semlegesítettük, és az így nyert mintákat VRK lemezekre vittük fel az eredeti (bomlatlan) oldattal együtt. A bomlástermék minták UV-spektrumait is felvettük és ezeket összehasonlítottuk az eredeti, bomlatlan vegyületek abszorpciós spektrumaival. A bomlásvizsgálatra kidolgozott módszer alkalmas szintézis során az átalakulás követésére, illetve az egyes vegyületek esetén az alapszerkezeti egység (mint közti- valamint bomlástermék) kimutatására.

## Eredmények

1. Az UV- spektrofotometriás vizsgálataink egyértelműen igazolják a vizsgált vegyületek szerkezeti analógiáját, mivel a három abszorpciós spektrum lefutása azonos (1. ábra).

A Prazosin-hidroklorid cikkelyénél található spektrális eredmények alapján (E.Ph. 5.0) három abszorpciós maximum értéknek kell lennie, ezek azonban különböző koncentrációjú oldatoknál jeleníthetők meg. Az Európai Gyógyszerkönyv a következő koncentrációjú oldatok spektrális vizsgálatát említi:

- Prazosin 5 µg/ml oldat esetén  $\lambda_{\max} = 247 \text{ nm}$
- Prazosin 25 µg/ml oldat esetén  $\lambda_{\max} = 330 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\max} = 343 \text{ nm}$



2. ábra. A vizsgált vegyületek szétválasztása VRK módszerrel (P=Prazosin, D=Doxazosin, T=Terazosin, E=Elegy)

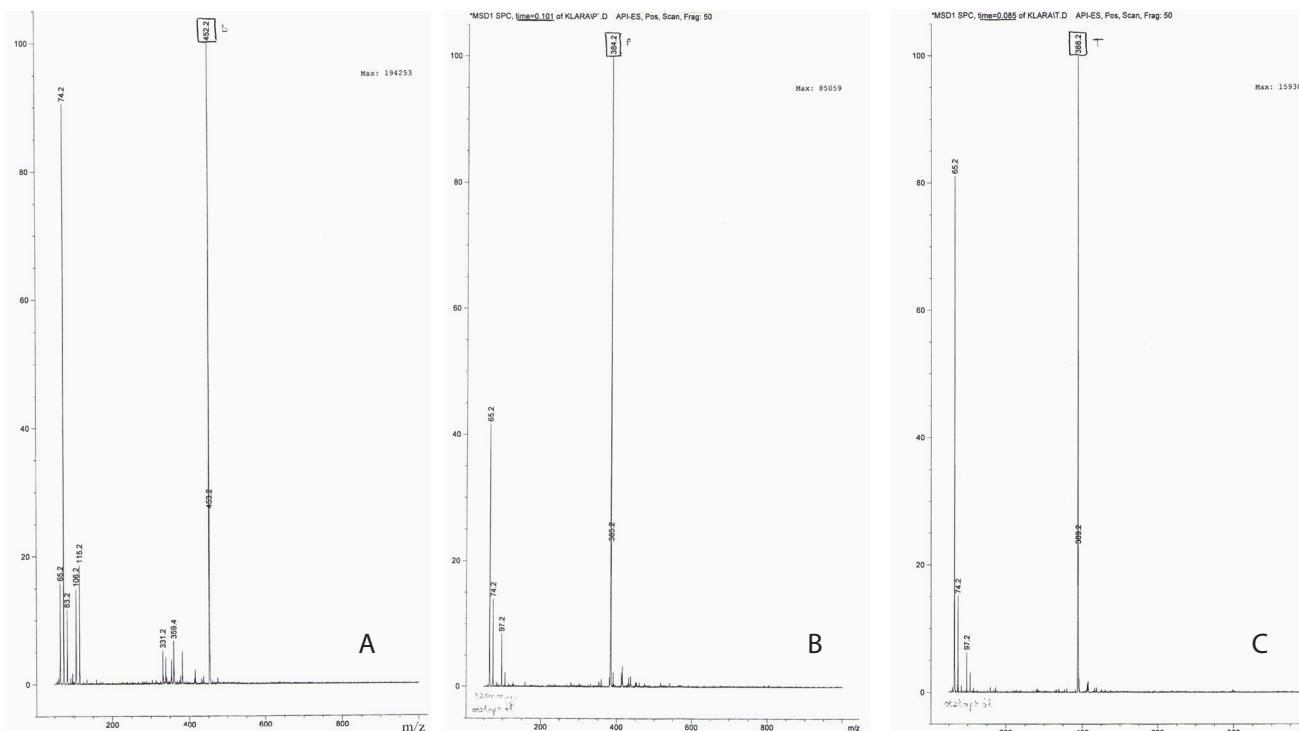
2. *Vékonyréteg-kromatográfia:* VRK módszer segítségével sikeresen megvalósítottuk a három, rokon szerkezetű vegyület elválasztását (2. ábra). A módszer feltételei mellett, az  $R_f$ -értékek növekvő sorrendjében a vegyületek a következőképpen különíthetők el: terazosin ( $R_f=0,46$ ), prazosin ( $R_f=0,57$ ), doxazosin ( $R_f=0,75$ ).

3. *HPLC-MS vizsgálat:* HPLC-MS berendezés segítségével a molekulatömeg alapján azonosítottuk a vegyületeket. A molekulák előzetes ionizációja után tömegspektrométerbe vezettük az ionokat, kvadrupól analízátorral szétválasztottuk és ábrázoltuk tömeg/töltés ( $m/z$ ) alapján a kapott jelintenzitás értékeket (3. ábra).

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiai méréshez kidolgozott gradiens módszerünk segítségével lehetőségünk nyílt a három vegyület szétválasztására (4. ábra).

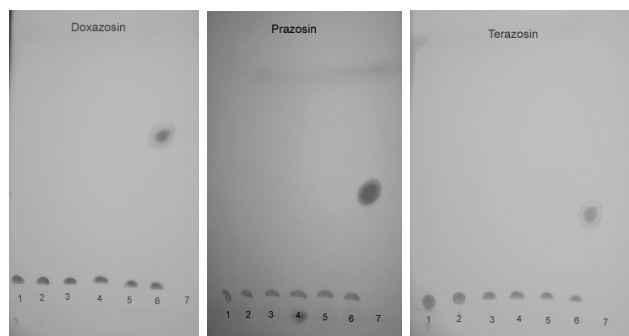
2. táblázat. A gradiens HPLC-MS módszer vizsgálati körülményei

| Kromatografálási idő (perc) | Eluens összetétele |                  |                           |
|-----------------------------|--------------------|------------------|---------------------------|
|                             | Acetonitril %      | Víz (0,1% TFA) % | Áramlási sebesség ml/perc |
| 0-5                         | 20                 | 80               | 0,5                       |
| 5-6                         | 60                 | 40               | 0,5                       |
| 6-15                        | 20                 | 80               | 0,5                       |

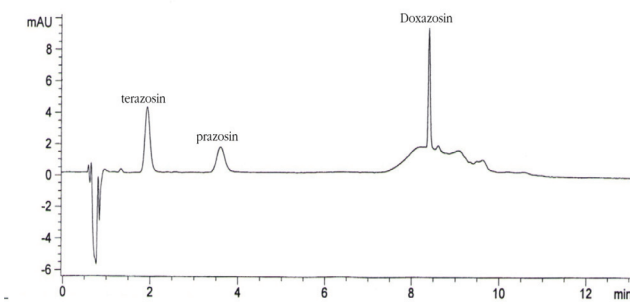


3. ábra. A vizsgált vegyületek tömegspektrumai (A-Doxazosin, B- Prazosin, C- Terazosin)

*Bomlás lúgos közegben:* A fő bomlástermék a – 4-amino-2-piperazin-1-il-6,7-dimetoxi kinazolin – a tanulmányozott vegyületeink esetében VRK módszerrel egyértelműen kimutatható (5. ábra). A 60 perces minta foltját vizsgálva mindhárom vegyület kromatogramján a retenciós faktor értékét azonosnak találtuk:  $R_f=0,12$ . A bomlástermék minták spektrumainak lefutása egyezést mutatott a bomlatlan vegyületek abszorpciós spektrumaival, tehát csupán a piperazinil-kinazolin közös szerkezeti elem játszik szerepet a spektrumok kialakításában a vizsgált hullámhossz tartományban [5, 6].



5. ábra. A bomlástermék minták vizsgálata VRK módszerrel 1-6: az 5mg/ml koncentrációjú oldatból nyert hidrolizált minták foltjai 10-60 percig, 7: az eredeti oldat



4. ábra. A vizsgált vegyületek szétválasztása HPLC-MS módszerrel

3. táblázat. Az abszorpciós spektrumok jellemzői

| Elnevezés | A mért abszorpciós maximumok (nm) |        |
|-----------|-----------------------------------|--------|
| Doxazosin | 247,40                            | 342,30 |
| Terazosin | 247,80                            | 342,60 |
| Prazosin  | 247,60                            | 343,0  |

## Következtetések

A három szerkezetileg analóg piperazinil-kinazolin származék azonosítása és szétválasztása maradéktalanul megvalósítható VRK valamint HPLC-MS módszerrel.

Az UV-spektrofotometriás módszer a vegyületek megkülönböztetésére nem alkalmas, mivel az acilező rész kromofór csoportot nem tartalmaz. A három vegyület esetében a fő bomlástermék a szerkezeti alapvázal – 4-amino-2-piperazin-1-il-6,7-dimetoxi kinazolin – azonos, amint ezt a kromatográfiai és spektrális vizsgálataink egyaránt bizonyítják.

*Köszönetnyilvánítás*

Jelen dolgozat a CEEPUS (Central European Exchange Program For University Studies) program keretében az ELTE valamint a SOTE (Budapest) intézeteiben került kivitelezésre.

zésre. Köszönettel tartozunk Prof. Dr. Klebovich Imrének, a Semmelweis Gyógyszerészeti Intézet Igazgatójának, Prof. Dr. Dibó Gábornak, Dr. Vass Elemérnek, és a Kémiai Kutató Laboratórium dolgozóinak, akik segítségemre voltak jelen dolgozatom gyakorlati részének kivitelezésében.

## Irodalom

1. Bakshi M., Ojha T., Singh S. - *Validated specific HPLC methods for determination of prazosin, terazosin and doxazosin in the presence of degradation products formed under ICH-recommended stress conditions*, J. Pharm. and Biomed. Anal., 2004, 34:19-26.
2. Bebawy L.I., Moustafa A.A., Abo-Talib N.F. - *Stability indicating methods for the determination of doxazosin mesylate and celecoxib*, J. Pharm. and Biomed. Anal., 2002, 27:779.
3. Cristea Aurelia Nicoleta - *Tratat de farmacologie 2006*, Editura Medicală, București, 2006.
4. Fürst Zsuzsanna - *Farmakológia*, Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2006, 522-524.
5. Görög S. - *Spektrofotometriás gyógyszeranalízis*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1993, 390-400.
6. Görög S. et al. - *Elavult módszereknek tekinthetők-e az ultraibolya spektroszkópia és spektrofotometria a gyógyszeranalitikában?*, Acta Pharmaceutica Hungarica, 1999, 69:60-68.
7. Muresan Ana, Palage Mariana - *Medicația în bolile cardiovasculare*, Editura Medicală Universitară „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, 2005, 45-49.
8. Ojha T., Bakshi M., Chakraborti A.K., Singh S. - *The ICH guidance in practice: stress decomposition studies on three piperazinyl quinazoline adrenergic receptor-blocking agents and comparison of their degradation behaviour*, J. Pharm. and Biomed. Anal., 2003, 31:775-783.
9. Tóth G., Balázs B. - *Szerves vegyületek szerkezet-felderítése*, Műegyetemi Kiadó, Budapest, 2005, 92-132.
10. \*\*\*British Pharmacopoeia 2007, London, The Stationery Office, 2006.
11. \*\*\*European Pharmacopoeia 5.0, Council of Europe, Strasbourg, 2002, 2:2295-2297; Supplement 5.5, 2005, 4222-4223, Supplement 5.6, 2006, 4685-4687.
12. \*\*\*United States Pharmacopoeia 30, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2007.