

## Stanovenie purínových báz (II) Argentometrické stanovenie 6-merkaptopurínu a niektorých iných purínových báz vedľa seba

K. LINEK, C. PECIAR, M. FEDOROŇKO

ČSAV, Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, Bratislava

V rámci analytického štúdia purínových báz sme vypracovali nové metódy na argentometrické stanovenie 6-merkaptopurínu, ako aj zmesi 6-merkaptopurín—hypoxantín a 6-merkaptopurín—teofylín za potenciometrickej indikácie ekvivalentového bodu. 6-Merkaptopurín sa v súčasnej dobe osvedčil pri liečení leukémie [1]. Vyrába sa z hypoxantínu pôsobením sírnika fosforečného [2, 3]; týmto spôsobom vyrobený 6-merkaptopurín obsahuje ako nečistotu nezreagovaný hypoxantín.

Na stanovenie samotného 6-merkaptopurínu bola vypracovaná metóda polarografická [4, 5], fotometrická [4], bromátometrická, jodometrická [6], spektrofotometrická [7, 8] a argentometrická [9]. Argentometrické stanovenie je založené na tvorbe ťažko rozpustnej striebornej soli, ktorá vzniká reakciou 6-merkaptopurínu s nadbytkom dusičnanu strieborného; po odfiltrovaní zrazeniny sa nadbytok  $\text{AgNO}_3$  titruje odmerným roztokom rodanidu amónneho.

Na stanovenie hypoxantínu bola vypracovaná metóda spektrofotometrická [8, 10] a argentometrická [11]. Pri argentometrickom stanovení sa zo zmesi purínových báz izoluje hypoxantín vo forme striebornej soli, zrazenina sa rozpustí v kyseline dusičnej a ióny  $\text{Ag}^+$  sa titrujú roztokom rodanidu amónneho. Podľa údajov v literatúre hypoxantín ruší argentometrické stanovenie 6-merkaptopurínu, pretože sa zráža súčasne [4, 6]. Hypoxantín a 6-merkaptopurín vedľa seba možno stanoviť spektrofotometricky [12, 13].

Argentometrické stanovenie teofylínu za potenciometrickej indikácie ekvivalentového bodu je opísané v prácach [14, 15].

Cieľom tejto práce bolo vypracovať rýchlu a presnú metódu na stanovenie 6-merkaptopurínu a niektorých ďalších purínových báz vedľa seba; volili sme argentometrické stanovenie za potenciometrickej indikácie ekvivalentového bodu.

### Experimentálna časť

#### Reagencie

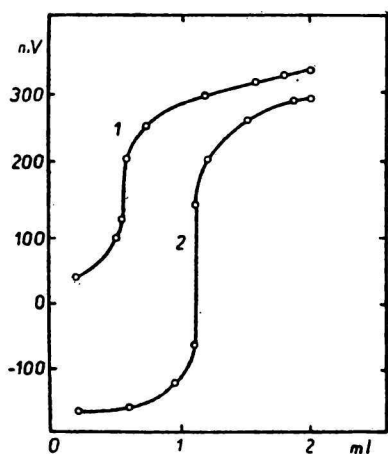
6-Merkaptopurín (monohydrát) a hypoxantín potrebnej čistoty sme pripravili dvojnásobnou kryštalizáciou z vody. Čistotu látok sme si overili elementárnou analýzou, spektrofotometricky v ultrafialovej oblasti [8] a chromatograficky [16].

## Aparatúra

Spektrofotometrické merania sa robili na univerzálnom spektrofotometri Zeiss s kremennou optikou. Na potenciometrické titrácie sa použil „Multoscop V“ (Laboratorní potřeby, Praha). Ako indikačná elektróda sa použila strieborná a ako porovnávacia nasýtená kalomelová elektróda. Hodnoty pH sa merali na pH-metri „Metrohm 142 E“.

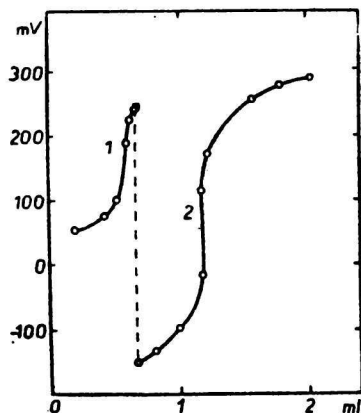
*Postup pri stanovení samotného 6-merkaptopurínu, 6-merkaptopurínu a hypoxantínu vedľa seba a 6-merkaptopurínu a teofylínu vedľa seba*

Argentometricky sme stanovili 6-merkaptopurín v prostredí  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  za potenciometrickej indikácie ekvivalentového bodu, pričom sa na jednu grammolekulu 6-merkaptopurínu spotrebujú dva gramekvivalenty  $\text{AgNO}_3$ . V prostredí  $0,2 \text{ N-H}_2\text{SO}_4$  vzniká pri titrácii 6-merkaptopurínu potenciálový skok pri spotrebe jedného ekvivalentu  $\text{AgNO}_3$  (obr. 1). Ak sme po titrácii v kyslom prostredí roztok neutralizovali  $\text{NaOH}$  a pH upravili tetraboritanom sodným, vznikol pri titrácii ďalší potenciálový skok za spotreby druhého ekvivalentu  $\text{AgNO}_3$  (obr. 2).



Obr. 1. Pribeh potenciometrických titračných kriviek stanovenia 6-merkaptopurínu. 1. v prostredí  $0,2 \text{ N-H}_2\text{SO}_4$ ; 2. v prostredí  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ .

Na osi úsečík: ml  $0,1 \text{ N-AgNO}_3$ .  
Na osi poradnic: potenciál striebornej elektródy v mV oproti nasýtenej kalomelovej elektróde.

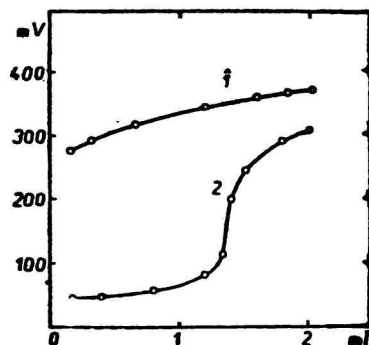


Obr. 2. Pribeh potenciometrických titračných kriviek stanovenia 6-merkaptopurínu.

1. v prostredí  $0,2 \text{ N-H}_2\text{SO}_4$ ;  
2. v prostredí  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ .

--- pokles potenciálu po neutralizácii kyseliny sírovej a po pridaní  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ .  
Na osi úsečík: ml  $0,1 \text{ N-AgNO}_3$ .  
Na osi poradnic: potenciál striebornej elektródy v mV oproti nasýtenej kalomelovej elektróde.

Pri titrácii hypoxantínu v prostredí  $0,2 \text{ N-H}_2\text{SO}_4$  roztokom  $\text{AgNO}_3$  nevzniká potenciálový skok. V prostredí  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  (pH 9) vzniká potenciálový skok za spotreby  $1,76 \pm \pm 0,02$  ekvivalentu, čo zodpovedá 88 % teoretickej spotreby  $\text{AgNO}_3$  (obr. 3). Vlastnosť hypoxantínu, že pri jeho titrácii v kyslom prostredí nevzniká potenciálový skok, sme



Obr. 3. Priebec potenciometrických titračných kriviek stanovenia hypoxantínu.

1. v prostredí 0,2 N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;

2. v prostredí Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.

Na osi úsečíek: ml 0,1 N-AgNO<sub>3</sub>.  
Na osi poradnic: potenciál striebornej elektródy v mV oproti nasýtenej kalomelovej elektróde.

využili na jeho stanovenie v zmesi so 6-merkaptopurínom. V kyslom prostredí sa titruje prvý ekvivalent, v prostredí Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> druhý ekvivalent 6-merkaptopurínu a celkový hypoxantín. Hypoxantín v zmesi so 6-merkaptopurínom reaguje takisto ako samotný za spotreby ca 2 ekvivalentov AgNO<sub>3</sub> (88 %). Priebec potenciometrickej titračnej krivky stanovenia zmesi 6-merkaptopurínu a hypoxantínu je obdobný priebec krivky na obr. 2.

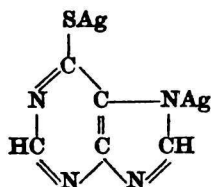
Pri titracii samotného teofylínu v prostredí Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> odmerným roztokom AgNO<sub>3</sub> vzniká potenciálový skok za spotreby jedného ekvivalentu AgNO<sub>3</sub>. V prostredí 0,2 N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> je strieborná soľ teofylínu rozpustná natoľko, že pri titracii nevzniká potenciálový skok a tým je možné stanoviť teofylín a 6-merkaptopurín vedľa seba. Priebec titrácie je podobný ako pri stanovení hypoxantínu a 6-merkaptopurínu vedľa seba s tým rozdielom, že na tvorbu striebornej soli teofylínu sa spotrebuje jeden ekvivalent AgNO<sub>3</sub>.

Presnosť stanovenia samotného 6-merkaptopurínu, 6-merkaptopurínu a hypoxantínu vedľa seba a 6-merkaptopurínu a teofylínu vedľa seba je  $\pm 1\%$  pre návažky 6-merkaptopurínu a hypoxantínu v množstve 10—30 mg a teofylínu v množstve 10—50 mg v 50 ml roztoku.

Hypoxantín a 6-merkaptopurín sme rozpustili v 50 ml 0,2 N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zahriatím na 60—80 °C. Po ochladení sme roztok titrovali 0,1 N-AgNO<sub>3</sub> za potenciometrickej indikácie ekvivalentového bodu. Po titracii v kyslom prostredí sme roztok neutralizovali 5 N-NaOH na fenolftaleín, pridali sme 10 ml nasýteného roztoku Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> a titrovali sme 0,1 N-AgNO<sub>3</sub> za vzniku druhého potenciálového skoku; pretože reakcia prebieha v heterogénnej fáze, je uštalovanie potenciálu v ekvivalentovom bode pomalé. Teplotu titrovaného roztoku sme počas celej titrácie udržiavali pri 40—45 °C.

## Diskusia

Pri argentometrickom stanovení 6-merkaptopurínu v kyslom prostredí vzniká ťažko rozpustná strieborná soľ substitúciou vodíka merkaptoskupiny v polohe 6; dôkazom toho je skutočnosť, že strieborné soli purínových báz, ktoré vznikli substitúciou na dusíku (teofylín, teobromín), sú v kyslom prostredí rozpustné natoľko, že pri titracii nevzniká potenciálový skok [15, 17]:



strieborná soľ 6-merkaptopurínu

Podobne sa chová hypoxantín štruktúrne veľmi blízky 6-merkaptopurínu. Z hodnôt kyslých disociačných konštánt 6-merkaptopurínu ( $pK_1 = 7,77$ ;  $pK_2 = 10,84$ ) a hypoxantínu ( $pK_1 = 8,94$ ;  $pK_2 = 12,10$ ) [8] je takisto zrejmé, že 6-merkaptopurín môže disociovať a tým aj tvoriť striebornú soľ v kyslejšom prostredí než hypoxantín. Hodnota  $pK_1$  pri hypoxantíne zodpovedá disociácii protónu pyrimidínového kruhu a hodnota  $pK_2$  disociácii protónu imidazolového kruhu. Pri 6-merkaptopuríne nie je zatiaľ poradie disociácie jednoznačne dokázané.

Ak po titrácii v kyslom prostredí roztok neutralizujeme, pridáme  $Na_2B_4O_7$ , a titrujeme ďalej roztokom  $AgNO_3$ , vznikne strieborná soľ na dusíku v polohe 7. Otázka polohy atómu striebra v imidazolovom kruhu súvisí s otázkou polohy protónu, ktorý sa môže viazať na dusíkoch v polohe 7 a 9, ktoré podľa výpočtov elektrónovej hustoty sú rovnocenné [18]. Podľa spektroskopických meraní v ultrafialovej oblasti nastáva v alkalickej oblasti o pH ca 10,77 v dôsledku disociácie presun protónu z dusíka v polohe 7 až na kyslík v polohe 6 v súhlase s rozdielnou elektronegativitou kyslíka a dusíka [19]. Vo vodných roztokoch v alkalickej oblasti pH je reaktívna poloha 7 v imidazolovom kruhu a tvoria sa 7-substituované puríny [20]. Pretože najmenej rozpustné strieborné soli vznikajú v alkalickej oblasti (pH 9 — 11), je pravdepodobnejšia poloha atómu striebra na dusíku v polohe 7 než na dusíku v polohe 9; definitívne môže uvedený problém rozriešiť iba röntgenová štruktúrna analýza.

Pri substitúcii atómu vodíka merkaptoskupiny v polohe 6 atómom striebra vznikne nerozpustná zrazenina a ďalšia substitúcia do polohy 7 prebieha v heterogénnej fáze. Pri takýchto reakciách závisí rýchlosť reakcie nielen od povahy chemického deja, ale súčasne aj od rýchlosti, akou sa reakčné zložky privádzajú do reakčnej oblasti, a od teploty. Pri konštantnej rýchlosti miešania sa rýchlosť reakcie v tomto prípade zvyšuje s teplotou; z uvedených dôvodov je výhodné titrovať pri teplote 40 — 45 °C.

Substitúcia atómov vodíka atómami striebra v molekule hypoxantínu prebieha súčasne na dusíkoch v polohe 1 a 7. Väzba atómu striebra na dusík v polohe 1 je zrejmá a potvrdzuje ju skutočnosť, že monohydroxypuríny majú podľa spektroskopických meraní v ultrafialovej a infračervenej oblasti v polohe 1 a 6 skupinu  $-NH-CO-$  [21].

Hypoxantín reaguje v prostredí tetraboritanu sodného s dvoma ekvivalentmi  $\text{AgNO}_3$ ; potenciálový skok vzniká predčasne, výsledky sú však reprodukovateľné a zodpovedajú  $88 \pm 1\%$  teoretickej spotreby. Podobný jav sme už pozorovali v našej predchádzajúcej práci pri argentometrickom stanovení zmesi teofylínu a teobromínu, kde celková spotreba odmerného činidla na titráciu obidvoch látok bola v prostredí tetraboritanu sodného (pH 9) nižšia o ca 6 % a v prostredí uhličitanu sodného (pH 10) nižšia o ca 10 % [16]. Nižšie výsledky sú zapríčinené blízkymi hodnotami súčinov rozpustnosti strieborných solí teofylínu a teobromínu. Strieborná soľ teofylínu vzniká väzbou atómu striebra s atómom dusíka v polohe 7 a strieborná soľ teobromínu väzbou na dusíku v polohe 1, teda ako pri hypoxantíne, iba s tým rozdielom, že hypoxantín má obidve substituovateľné polohy v jednej molekule.

Priebeh titrácie zmesi 6-merkaptopurínu a teobromínu je identický s titráciou samotného 6-merkaptopurínu; v kyslom prostredí sa stitruje prvý gramekvivalent a v prostredí  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  druhý gramekvivalent molekuly 6-merkaptopurínu. Potenciálový skok zodpovedajúci tvorbe striebornej soli teobromínu je potlačený, hoci pri titracii samotného teobromínu v prostredí  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  vzniká zreteľne potenciálový skok, čo je ďalším dôkazom, že na dusíku v polohe 7 sa tvoria menej rozpustné strieborné soli než na dusíku v polohe 1 [17].

*Ďakujeme prof. dr. J. Zýkovi z Karlovej univerzity v Prahe za podnetné pripomienky k rukopisu a dr. A. Černému z Výskumného ústavu pre farmáciu a biochémiu v Prahe za vzorky hypoxantínu a 6-merkaptopurínu.*

### Súhrn

Vypracovala sa argentometrická metóda na stanovenie 6-merkaptopurínu a hypoxantínu vedľa seba a 6-merkaptopurínu a teofylínu vedľa seba za potenciometrickej indikácie ekvivalentového bodu. Presnosť stanovenia pre návažky 6-merkaptopurínu a hypoxantínu v množstve 10 — 30 mg a teofylínu v množstve 10 — 50 mg v objeme 50 ml je  $\pm 1\%$ . Spôsob stanovenia spočíva v titracii v kyslom (prostredie 0,2 N- $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a v alkalickom prostredí (roztok  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , o pH ca 9); pri tvorbe striebornej soli na atóme dusíka vzniká potenciálový skok len v alkalickom prostredí, kým pri tvorbe striebornej soli na atóme síry i v kyslom i v alkalickom prostredí. Diskutuje sa o polohe atómov striebra v molekule strieborných solí 6-merkaptopurínu a hypoxantínu.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПУРИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ (II)  
АРГЕНТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ 6-МЕРКАПТОПУРИНА  
И НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ ПУРИНОВЫХ ОСНОВАНИЙ ПРИ ИХ СОВМЕСТНОМ  
ПРИСУТСТВИИ

К. Линек, Ц. Пециар, М. Федороňко

ЧСАН, Химический институт Словацкой академии наук,  
Братислава

Был разработан аргентометрический метод определения 6-меркаптопурина и гипоксантина при совместном присутствии, а также 6-меркаптопурина и теофилина при совместном присутствии, причем эквивалентная точка устанавливалась потенциометрически. Точность определения для навесок 6-меркаптопурина и гипоксантина в количестве 10—30 мг и теофилина в количестве 10—50 мг в объеме 50 мл является равной  $\pm 1\%$ . Основой методики является титрование в кислой (среда 0,2 н- $H_2SO_4$ ) и щелочной средах (раствор с *pH* приблизительно 9); при образовании соли серебра на атоме азота происходит потенциальный скачок только в щелочной среде, в то время, как при образовании серебряной соли на атоме серы как в кислой, так и в щелочной. В работе также обсуждается расположение атомов серебра в молекуле серебряных солей 6-меркаптопурина и гипоксантина.

DIE BESTIMMUNG DER PURINBASEN (II)  
ARGENTOMETRISCHE BESTIMMUNG VON 6-MERKAPTOPURIN  
UND ANDERER PURINBASEN NEBENEINANDER

K. Linek, C. Peciar, M. Fedoroňko

ČSAV, Chemisches Institut der Slowakischen Akademie der Wissenschaften,  
Bratislava

Es wird eine argentometrische Methode zur gleichzeitigen Bestimmung von 6-Merkaptopurin und Hypoxantin einerseits, und von 6-Merkaptopurin und Theophyllin andererseits, mit potentiometrischer Indikation des Äquivalenzpunktes ausgearbeitet. Bei Einwaagen des 6-Merkaptopurins und des Hypoxantins von 10—30 mg, des Theophyllins von 10—50 mg in das Volumen von 50 ml, beträgt die Genauigkeit der Bestimmung  $\pm 1\%$ . Die Bestimmung beruht auf einer Titration in saurem (0,2 n- $H_2SO_4$ ) und basischem Medium (eine  $Na_2B_4O_7$  Lösung vom *pH* cca 9). Bei der Bildung des Ag-Salzes an dem Stickstoffatom wird ein Potentialsprung nur im basischen Medium erhalten. Bei Bildung des Ag-Salzes an dem Schwefelatom werden Potentialsprünge sowohl im basischen als auch im sauren Medium beobachtet. In der Arbeit wird auch die Lage der Ag-Atome in den Silbersalzen von 6-Merkaptopurin und Hypoxantin diskutiert.

LITERATÚRA

1. Bernard J., *Sang* 25, 840 (1954).
2. Elion G. B., Burgi E., Hitchings G. H., *J. Am. Chem. Soc.* 74, 411 (1952).
3. Černý A., Semonský M., *Českoslov. farm.* 7, 402 (1958).

4. Vachek J., *Českoslov. farm.* **9**, 126 (1960).
5. Horn G., Zuman P., *Collection* **25**, 3401 (1960).
6. Jančík F., Buděšinský B., Činková O., *Českoslov. farm.* **6**, 108 (1957).
7. Gastovo F., Pileri A., *Rass. med. sper.* **1**, 122 (1954); *Chem. Abstr.* **51**, 8194 (1957)
8. Mason S. F., *J. Chem. Soc.* **1954**, 2071.
9. Blažek J., Stejskal Z., *Českoslov. farm.* **5**, 29 (1956).
10. Michl H., Haberler F., *Monatsh.* **85**, 779 (1954).
11. Hitchings G. H., *J. Biol. Chem.* **143**, 43 (1942).
12. Braschi A., Cerri O., *Boll. chim. farm.* **96**, 148 (1957); *Chem. Abstr.* **51**, 12435 (1957).
13. Takeji Noto, Hiroshi Sawada, Yoshishige Sato, Nakatomi Fukuda, Yoshiyuki Inoue, Tanabe Seiyaku Kenkyu Nempô **3**, 53 (1958); *Chem. Abstr.* **52**, 18094 (1958).
14. Hoch B., Tomíček O., *Čas. čes. lékárnictva*, Věd. příl. **63**, 186 (1950).
15. Peciar C., Linek K., *Chem zvesti* **14**, 425 (1960).
16. Macek K., *J. Chromatography* **4**, 156 (1960).
17. Peciar C., Linek K., *Chem. zvesti* **15**, 895 (1961); Čs. pat. 105 405.
18. Alonso J. I. F., Sebastian R. D., *Compt. rend.* **1960**, 2576.
19. Cavalieri L. F., Fox J. J., Stone A., Chang N., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 1119 (1954).
20. Mokřý J., Kompíš I., Čs. pat. 95 344.
21. Brown D. J., Mason S. F., *J. Chem. Soc.* **1957**, 682.

Do redakcie došlo 18. 3. 1963

*Adresa autorov:*

*Inž. Kazimír Linek, inž. Cyril Peciar, inž. Michal Fedoroňko, C. Sc., Chemický ústav SAV, Bratislava, Dúbravská cesta.*