

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**БАГУЛЯ ОЛЕКСАНДР ВІКТОРОВИЧ**

УДК 615.213:543.062.061:543.544:543.42

**ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ  
ДИФЕНІНУ**

**15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата фармацевтичних наук**

**ХАРКІВ – 2014**

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано на кафедрі токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету Міністерства охорони здоров'я України.

**Науковий керівник:** доктор фармацевтичних наук, професор  
**БОНДАР Володимир Степанович**  
Національний фармацевтичний університет,  
професор кафедри токсикологічної хімії

**Офіційні опоненти:** доктор фармацевтичних наук, доцент  
**КАПЛАУШЕНКО Андрій Григорович**  
Запорізький державний медичний університет,  
завідуючий кафедрою фізикоїдної хімії

кандидат фармацевтичних наук, доцент  
**ГАЛЬКЕВИЧ Ірина Йосифівна**  
Львівський національний медичний університет  
імені Данила Галицького, завідувача кафедрою  
токсикологічної та аналітичної хімії

Захист відбудеться «06» червня 2014 р. о 12<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті за адресою:  
61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4).

Автореферат розіслано «30» квітня 2014 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
професор

О. А. Рубан

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Дифенін є одним з найстаріших антиконвульсантів, який ефективно використовується в медичній практиці до сьогодення часу. Даний препарат є одним із перших протисудомних засобів, якому не властива седативна дія.

Проте дифенін характеризується значною кількістю побічних ефектів, особливо з боку центральної нервової системи, – ністагм, атаксія, уповільнена мова, погіршення координації тощо. В окремих випадках дифенін сприяє необоротному ураженню мозочка.

Особливістю препарату є те, що існує значна варіабельність концентрацій дифеніну в крові, при яких можуть спостерігатися токсичні реакції. Ністагм з'являється, як правило, при концентрації 20 мг/л, атаксія – 30 мг/л, дизартрія та летаргія – вище за 40 мг/л. В той же час описано випадки, коли концентрація дифеніну в крові перевищує 50 мг/л, але при цьому відсутні ознаки токсичності. Є дані про застосування препарату у дозах, що в 25 разів перевищують терапевтичну. При цьому спостерігається позитивний терапевтичний ефект і відсутні побічні реакції. Крім того, дифенін має нелінійну кінетику, – це призводить до того, що ферментна система може бути «насиченою» вже при концентраціях дифеніну, що не перевищують терапевтичні значення. Збільшення ж дози призводить до наростання концентрації до токсичного рівня.

Критичний огляд доступних нам літературних джерел показав, що фармакологічному і клінічному вивченню дифеніну присвячено значну кількість робіт, проте інформація про його хіміко-токсикологічний аналіз вкрай недостатня – способи його ізолювання та дослідження в біосубстратах не розроблено.

Для сучасної діагностики отруєнь, враховуючи наведені особливості препарату, важливістю набувають саме результати хімічного аналізу дифеніну в біологічних об'єктах, що підтверджує актуальність та необхідність розробки методик його хіміко-токсикологічного дослідження.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертацію виконано згідно з планом науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету та проблемної комісії «Фармація» НАМН та МОЗ України за темою: «Хімічний синтез і аналіз біологічно-активних речовин, створення лікарських засобів синтетичного походження» (номер державної реєстрації 0103U000475).

**Мета і задачі дослідження.** Метою дисертаційної роботи є обґрунтування схеми хіміко-токсикологічного дослідження об'єктів біологічного походження на дифенін, що включає методики його ізолювання із біологічних рідин та твердих тканин, методики виявлення та кількісного визначення дифеніну в отриманих витягах, а також методики додаткової очистки витягів із біологічних об'єктів.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити такі задачі:

– проаналізувати та узагальнити дані наукової літератури відносно фі-

зико-хімічних, фармакологічних та токсикологічних властивостей дифеніну та інших протисудомних лікарських засобів, що на сьогодні застосовуються у медичній практиці;

- запропонувати кольорові реакції для попереднього виявлення дифеніну, виділеного з біологічного матеріалу;
- розробити чутливі методики виявлення та ідентифікації дифеніну за допомогою методу тонкошарової хроматографії (ТШХ), що дозволять відрізнити його від препаратів, що можуть застосовуватись для супутньої терапії, а також очистити витяги з біологічного матеріалу від спі-екстрактивних речовин;
- розробити методики виявлення дифеніну та препаратів, що можуть застосовуватись разом з ним, методами вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та газорідинної хроматографії (ГРХ);
- розробити методики кількісного визначення дифеніну, придатні для цілей хіміко-токсикологічного аналізу (ВЕРХ, ГРХ, екстракційно-фотометричну, УФ-спектрофотометричну);
- вивчити вплив природи органічних розчинників та рН середовища на ступінь екстракції дифеніну з водних розчинів;
- дослідити можливість застосування загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання органічних речовин кислотного та основного характеру до дифеніну;
- розробити індивідуальні методики виділення дифеніну з біологічних тканин та рідин організму (крові, сечі);
- дослідити можливості виявлення та кількісного визначення дифеніну в біологічному матеріалі, що піддався гнилісним змінам.

*Об'єкт дослідження.* Хіміко-токсикологічний аналіз дифеніну.

*Предмет дослідження.* Методики ізолювання дифеніну із об'єктів біологічного походження, методики його виявлення та кількісного визначення у модельних розчинах та витягах із біологічного матеріалу, методики очистки отриманих витягів із біологічного матеріалу, схема хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на дифенін.

*Методи дослідження.* Для ідентифікації дифеніну в модельних розчинах та витягах із біологічного матеріалу використовували методи ТШХ, ГРХ, ВЕРХ та УФ-спектроскопії, кольорові реакції; для кількісного визначення дифеніну – оптичні (УФ-спектрофотометрія, екстракційна фотометрія) та хроматографічні (ВЕРХ та ГРХ) методи. Для ізолювання дифеніну із біологічного матеріалу використовували загальноприйняті методи О. О. Васильєвої, Стаса–Отто, П. Валова, а також методику ізолювання шляхом настоювання та перколяції попередньо висушеного біологічного матеріалу органічними розчинниками.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше виконано комплекс системних досліджень дифеніну як об'єкта хіміко-токсикологічного аналізу.

Вперше встановлено хроматографічну поведінку дифеніну в загальноприйнятих в хіміко-токсикологічному аналізі системах розчинників, в тому чи-

слі і таких, що застосовуються в загальному ТШХ-скринінгу органічних речовин кислотного та основного характеру. Встановлено основні хроматографічні параметри дифеніну при дослідженні методами ВЕРХ та ГРХ.

Розроблено нові УФ-спектрофотометричні, екстракційно-фотометричну, ГРХ- та ВЕРХ-методику кількісного визначення дифеніну; показано можливість їх застосування для цілей хіміко-токсикологічного та криміналістичного аналізу.

Встановлено оптимальні значення рН середовища (2 – 3) та органічні розчинники (хлороформ, діетиловий етер), що забезпечують високий ступінь екстракції дифеніну з водних розчинів. Вперше порівняно ступені ізолювання дифеніну із біологічного матеріалу за допомогою загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів виділення органічних речовин кислотного та основного характеру. Розроблено індивідуальні методики ізолювання дифеніну із біологічного матеріалу – шляхом настоювання з підлуженою водою та комбінованої екстракції попередньо висушеного біологічного матеріалу ацетоном, а також методики виділення дифеніну з біологічних рідин організму (крові, сечі). За результатами досліджень подано заявку на одержання патенту України на корисну модель.

Вперше вивчено терміни зберігання дифеніну в тканинах печінки при гнитті біологічного матеріалу.

На підставі виконаних досліджень вперше запропоновано схему хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на дифенін.

**Практичне значення одержаних результатів.** Комплекс проведених досліджень став підставою для обґрунтування схеми хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на дифенін, що покладено в основу підготовлених методичних рекомендацій «Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на дифенін», які рекомендовано застосовувати в практичній роботі відділень судово-медичної токсикології для вирішення питань щодо отруєння дифеніном, в клінічних лабораторіях з метою визначення дифеніну в біологічних рідинах, а також у криміналістичному аналізі.

Розроблені методики хіміко-токсикологічного дослідження дифеніну впроваджено в науково-педагогічний процес кафедри клінічної біохімії, судово-медичної токсикології та фармації Харківської медичної академії післядипломної освіти, кафедри токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету, кафедри неорганічної та токсикологічної хімії Запорізького державного медичного університету, кафедри токсикологічної та аналітичної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, кафедри хімії фармацевтичного факультету Івано-Франківського національного медичного університету, кафедри фармацевтичної хімії та фармакогнозії ДЗ «Луганський державний медичний університет», кафедри хімії Донецького національного медичного університету ім. М. Горького, в практику роботи відділень судово-медичної токсикології Черкаського, Житомирського, Херсонського та Харківського обласного бюро судово-медичної експертизи.

**Особистий внесок здобувача.** Разом з науковим керівником визначено мету та завдання досліджень, розроблено методичні підходи, згідно з якими підібрано методи виконання експериментальної частини дисертації. Особисто проведено патентно-інформаційний пошук, експериментальні дослідження, статистичну обробку, аналіз та систематизацію отриманих результатів, сформульовано висновки роботи. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертантом наведено результати власних експериментальних досліджень, взято участь в аналізі та узагальненні отриманих даних, у написанні статей.

Дослідження методом вискоелективної рідинної хроматографії проведено на базі НВФ «Аналітика» (м. Харків, директор – В. Ф. Першин), газорідинної хроматографії – на базі ТОВ «Дослідний завод» «ДНЦЛЗ» (м. Харків, директор – В. Б. Демьохін).

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати та положення дисертаційної роботи викладено і обговорено на Всеукраїнському конгресі «Сьогодення та майбутнє фармації» (Харків, 2008), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні проблеми судово-токсикологічної науки і практики» (Харків, 2009), VII Національному з'їзді фармацевтів України «Фармація України. Погляд у майбутнє» (Харків, 2010), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Діагностичні та організаційні питання щодо створення системи забезпечення якості клінічних лабораторних досліджень» (Київ, 2010), науково-практичній конференції завідувачів відділеннями судово-медичної токсикології «Організаційні та практичні питання судово-медичної токсикології» (Дніпропетровськ, 2011), III з'їзді токсикологів України «Сучасні проблеми токсикології. Безпека їжі та середовища життєдіяльності людини» (Київ, 2011), науково-практичній конференції «Актуальні питання експериментальної, клінічної медицини та фармації» (Луганськ, 2012), XX Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Actual questions of development of new drugs» (Харків, 2013), III Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Теоретичні та практичні підходи до вирішення сучасних питань фармацевтичної та медичної науки» (Луганськ, 2013), I науково-практичній конференції з міжнародною участю «Розбудова системи контролю якості клінічних лабораторних досліджень в Україні» (Київ, 2013).

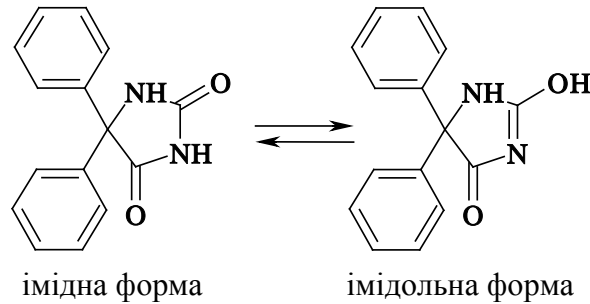
**Публікації.** Матеріали дисертаційної роботи опубліковано у 11 наукових роботах, серед яких 5 статей у наукових фахових виданнях (2 – за кордоном) та 6 тез доповідей.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, п'яти розділів експериментальних досліджень, висновків, 13 додатків (38 стор.) та списку використаних джерел. Дисертацію викладено на 201 сторінці друкованого тексту (обсяг основного тексту 142 сторінки), ілюстровано 77 таблицями, 13 рисунками, 5 схемами. Перелік використаної літератури містить 165 джерел, серед яких 68 – іноземні.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Сучасний стан та проблеми дослідження протиепілептичних засобів (огляд літератури)

Дифенін (фенітоїн) належить до антиепілептичних лікарських засобів; за хімічною структурою являє собою 5,5-дифенілімідазолідин-2,4-діон; існує у двох таутомерних формах – імідній та імідольній:



В огляді літератури проведено узагальнення даних щодо фармакологічних та токсикологічних властивостей дифеніну в порівнянні з іншими препаратами, що застосовуються для лікування епілепсії; детально висвітлено зафіксовані випадки отруєнь препаратом, а також інформацію стосовно рівня концентрації його в органах та тканинах людини за умов гострих та летальних отруєнь.

### Об'єкти та методи дослідження

В розділі наведено інформацію щодо фізико-хімічних властивостей дифеніну та препаратів, що можуть бути застосовані разом з ним, а також викладено загальні методики досліджень, що використано в роботі.

### Розробка методик виявлення дифеніну за допомогою якісних реакцій та методу ТШХ

Для розробки якісних реакцій для попереднього виявлення дифеніну було вивчено його взаємодію з деякими реагентами, що широко застосовуються в хіміко-токсикологічному аналізі. Реакції проводили на хроматографічних пластинках Sorbfil в присутності деяких інших лікарських речовин з протиепілептичною активністю. Такий спосіб виконання якісних реакцій дозволяє підвищити їх чутливість.

Результати проведених реакцій наведено в табл. 1.

У більшості проведених якісних реакцій для дифеніну зафіксовано такі ж результати як для фенобарбіталу та етосуксиміду – лише дія реактивів Драгендорфа та Лібермана дозволяє віддиференціювати їх один від одного.

Реактиви Маркі, Ермана, Шейблера, ФПН, Фреде, Манделіна, розчин кобальту тіоціанату, кислота сульфатна концентрована та кислота нітратна концентрована з досліджуваними речовинами не дали позитивних результатів.

Вивчено хроматографічну поведінку дифеніну в присутності деяких інших лікарських препаратів з групи протисудомних засобів та дибамку методом тонкошарової хроматографії з використанням трьох типів тонких шарів (табл. 2 та 3).

**Результати якісних реакцій дифеніну і деяких інших речовин з протисудомною активністю  
із загальноприйнятими в хіміко-токсикологічному аналізі реагентами**

Реагент	Забарвлення / чутливість, мкг				
	дифенін	фенобарбітал	етосуксимід	карбамазепін	дибамк
реактив Цвіккера	рожево-фіолетове / 0,1	рожево-фіолетове / 0,1	рожево-фіолетове / 0,1	–	–
реактив Діллє–Копані	фіолетове / 0,1	фіолетове / 0,1	фіолетове / 0,1	–	–
реактив Копані–Цвіккера	фіолетове / 0,1	фіолетове / 0,1	фіолетове / 0,1	–	–
реакція з піридином і солями купруму (II)	синьо-фіолетове / 0,1	синьо-фіолетове / 0,1	синьо-фіолетове / 0,1	–	–
насичений розчин меркурію (I) нітрату	чорне / 0,1	чорне / 0,1	чорне / 0,1	–	–
реактив Вагнера	коричневе / 1,0	коричневе / 1,0	коричневе / 1,0	коричневе / 1,0	коричневе / 1,0
реактив Бушарда	коричневе / 1,0	коричневе / 1,0	коричневе / 1,0	коричневе / 1,0	коричневе / 1,0
реактив Драгендорфа	оранжеве / 0,1	–	–	оранжеве / 0,1	–
реактив Драгендорфа, модифікований по Муньє	оранжеве / 0,1	–	–	оранжеве / 0,1	–
реактив Лібермана	червоно-оранжеве / 0,1	червоно-оранжеве / 0,1	–	–	–

Примітка:

«–» – забарвлення відсутнє



Таблиця 2

**Результати проявлення плям дифеніну і деяких інших речовин з протисудомною активністю  
на хроматографічних пластинах різними проявниками**

Реагент	Забарвлення / чутливість, мкг				
	дифенін	фенобарбітал	етосуксимід	карбамазепін	дибамк
УФ-світло (на пластинах з УФ-індикатором)	фіолетове / 0,1	фіолетове / 0,1	фіолетове / 0,1	фіолетове / 0,1	фіолетове / 0,1
1% розчин калію перманганату в 0,25 моль/л розчині кислоти сульфатної	–	–	–	–	–
пари йоду	коричневе / 1,0	коричневе / 1,0	коричневе / 1,0	коричневе / 1,0	коричневе / 1,0
5% розчин феруму (III) хлориду	–	–	–	–	–
послідовно реактив Драгендорфа і кислота сульфатна	оранжеве / 0,1	–	–	оранжеве / 0,1	–
50% розчин кислоти сульфатної в етанолі	–	–	–	–	–
послідовно 1,6% розчин меркурію (II) сульфату і 0,2% розчин дифенілкарбазону в етанолі	фіолетове / 0,1	фіолетове / 0,1	фіолетове / 0,1	–	–
0,5% розчин нінгідрину в суміші кислоти хлористоводневої розведеної і ацетону (1:10)	–	–	–	–	–
0,1% водний розчин бромтимолового синього	зелене / 0,1	жовте / 0,1	жовте / 0,1	жовте / 0,1	жовте / 0,1

Примітка:

«–» – забарвлення відсутнє

**Значення  $R_f$  для дифеніну і деяких інших препаратів  
в різних системах розчинників ( $n = 3$ )**

Система розчинників*	Препарати				
	дифенін	фенобарбітал	етосуксимід	карбамазепін	дибамк
1	0,33	0,47	0,50	0,32	0,36
2	0,55	0,65	0,53	0,62	0,87
3	0,53	0,53	0,59	0,17	0,84
4	0,41	0,28	0,66	0,56	0,18
5	0,86	0,85	0,84	0,79	0,46
6	0,54	0,58	0,39	0,75	0,57
7	0,80	0,80	0,70	0,60	0,90
8	0,06	0,02	0,05	0,02	0,12
9	0,54	0,61	0,68	0,56	0,47
10	0,54	0,59	0,25	0,47	0,29
11	0,94	1,00	1,00	1,00	1,00
12	0,93	1,00	1,00	1,00	1,00
13	0,48	0,39	0,66	0,56	0,18
14	0,94	1,00	1,00	1,00	1,00
15	0,77	0,78	0,78	0,73	0,76
16	0,60	0,64	0,66	0,58	0,62
17	0,50	0,58	0,70	0,62	0,65
18	0,75	0,92	0,88	0,91	0,90

Примітки:

\*1. хлороформ – ацетон (80:20); 2. етилацетат; 3. хлороформ – метанол (90:10); 4. етилацетат – метанол – 25% розчин амоніаку (85:10:5); 5. метанол; 6. метанол – *n*-бутанол (60:40); 7. метанол – 25% розчин амоніаку (100:1,5); 8. циклогексан – толуен – діетиламін (75:15:10); 9. хлороформ – метанол (90:10); 10. ацетон; 11. хлороформ – діоксан – ацетон – 25% розчин амоніаку (47,5:45:5:2,5); 12. толуен – ацетон – етанол – 25% розчин амоніаку (45:45:7,5:2,5); 13. етилацетат – метанол – 25% розчин амоніаку (85:10:2,5); 14. хлороформ – *n*-бутанол – 25% розчин амоніаку (70:40:5); 15. толуол – етанол – гексан (6:1:3); 16. толуол – етанол – гексан (6:3:1); 17. хлороформ – ізопропанол (95:5); 18. хлороформ – етанол – 25% розчин амоніаку (85:10:2,5).

При використанні систем розчинників 7, 8, 9, 10 пластини попередньо обробляли 0,1 моль/л розчином калію гідроксиду в метанолі, а потім висушували за температури 110°C протягом 30 хв. В системі розчинників 6 пластини попередньо обробляли 0,1 моль/л розчином натрію броміду.

Дослідження проводили в 18 системах розчинників, серед яких системи 1 – 10 рекомендовано як стандартні Міжнародним комітетом з систематичного токсикологічного аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів, системи 11 – 14 застосовують в загальному ТШХ-скринінгу органічних речовин, системи 15 – 18 вивчено з метою підбору оптимальної системи розчинників для дослідження дифеніну.

Вивчено відношення дифеніну до проявників, які застосовуються в загальному ТШХ-скринінгу органічних речовин кислотного та основного характеру.

Результати проявлення плям дифеніну наведено в табл. 2.

Таким чином, при виконанні неспрямованого аналізу дифеніну можна виявити послідовною обробкою пластин реактивом Драгендорфа та кислотою сульфатною, 0,1% водним розчином бромтимолового синього та послідовною обробкою пластин 1,6% розчином меркурію (II) сульфату і 0,2% розчином дифенілкарбазону в етанолі.

### **Розробка методик визначення дифеніну за допомогою оптичних методів аналізу**

Для ідентифікації дифеніну отримано його УФ-спектри в 96% етанолі та 0,1 моль/л розчині натрію гідроксиду (рис. 1).

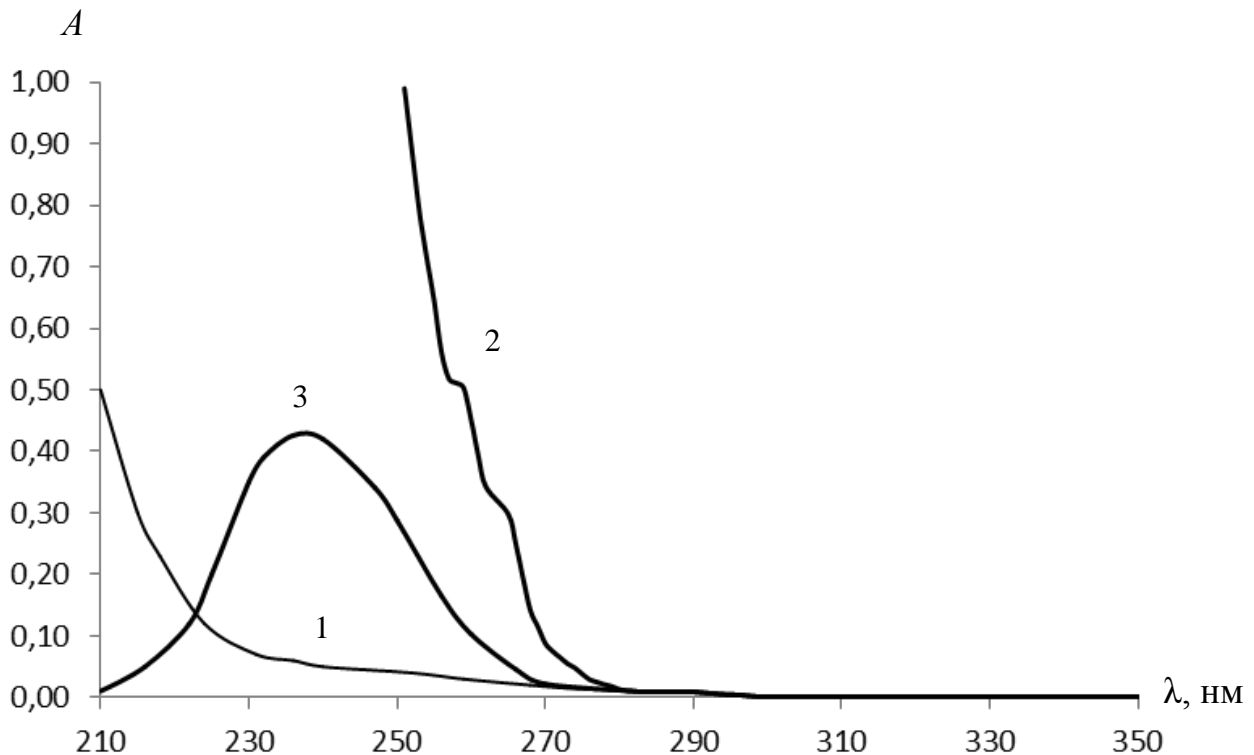


Рис. 1. УФ-спектри дифеніну:

- 1 – в 96% етанолі ( $l = 10$  мм; концентрація 10 мкг/мл);
- 2 – в 96% етанолі ( $l = 10$  мм; концентрація 250 мкг/мл);
- 3 – в 0,1 моль/л розчині натрію гідроксиду  
( $l = 10$  мм; концентрація 50 мкг/мл)

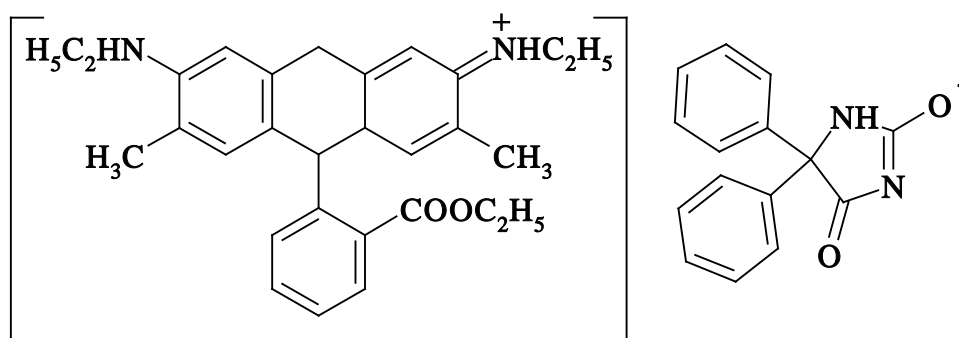
Встановлено, що в спектрі абсорбції дифеніну в 96% етанолі відсутні чіткі максимуми, проте при збільшенні концентрації розчину до 250 мкг/мл спостерігається два плато – за довжин хвиль 257 – 259 нм ( $A = 0,511$ ) та 263 – 265 нм ( $A = 0,298$ ). Тому для УФ-спектрофотометричного визначення дифеніну, з використанням 96% етанолу як розчинника, ми використовували довжину хвилі 258 нм.

В УФ-спектрі дифеніну в 0,1 моль/л розчині натрію гідроксиду спостерігається максимум абсорбції за довжини хвилі 236 нм. Зазначену довжину хвилі можна застосовувати для УФ-спектрофотометричного визначення дифеніну з використанням 0,1 моль/л розчину натрію гідроксиду як розчинника. Розраховано значення питомих та молярних показників поглинання дифеніну за довжини хвилі 236 нм.

Для кількісного визначення дифеніну розроблено УФ-спектрофотометричні методики та досліджено їх основні валідаційні характеристики – лінійність, правильність та збіжність:

- з використанням як розчинника 96% етанолу – методику можна застосовувати в інтервалі концентрацій від 50 до 450 мкг/мл з відносною невизначеністю середнього результату  $\pm 3,94\%$ .
- з використанням як розчинника 0,1 моль/л розчину натрію гідроксиду – методику можна застосовувати в інтервалі концентрацій від 10 до 100 мкг/мл з відносною невизначеністю середнього результату  $\pm 2,06\%$ .

Розроблено екстракційно-фотометричну методику кількісного визначення дифеніну на основі реакції утворення іонного асоціату з родаміном 6Ж в лужному середовищі, що екстрагується органічними розчинниками і структуру якого можна подати формулою:

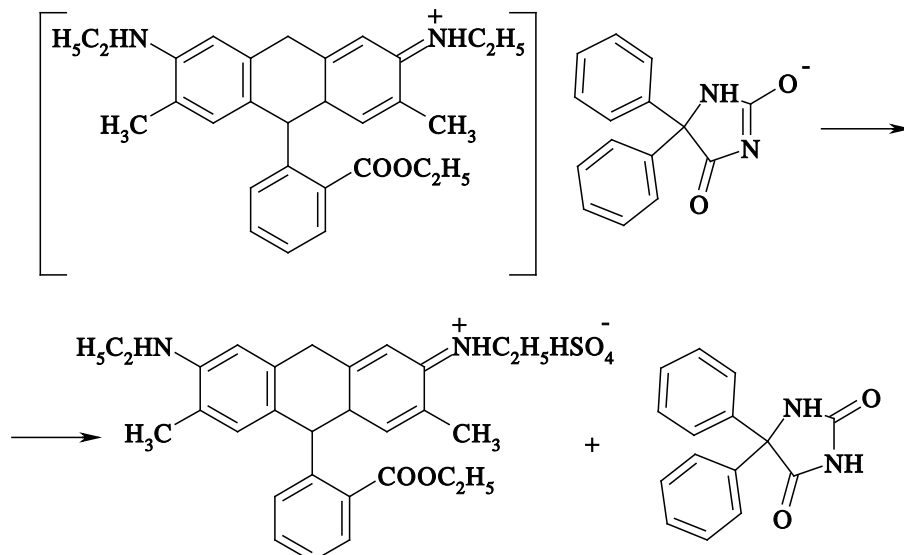


Як органічні розчинники використовували хлороформ і діетиловий етер – розчинники, що найчастіше застосовують в судово-токсикологічному аналізі. Родамін 6Ж не екстрагується діетиловим етером з водних розчинів, і тому не заважає кількісному визначенню дифеніну. Хлороформ екстрагує родамін 6Ж з водних розчинів, і тому не може бути використаний в подальшому для кількісного визначення дифеніну.

Іонний асоціат дифеніну з родаміном 6Ж в найбільшій кількості екстрагується діетиловим етером при рН = 9,0 та вище. Для максимального спрощення процедури проведення кількісного визначення при всіх подальших до-

слідженнях для створення потрібного значення рН середовища використовували 0,1 моль/л розчин натрію гідроксиду.

Аналіз виконували в двох варіантах – безпосередньо вимірюючи оптичну густину етерного шару за довжини хвилі 525 нм, а також для підвищення чутливості методики етерний шар руйнували додаванням до нього 1% розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі:



При цьому одержували інтенсивне червоно-фіолетове забарвлення, пов'язане з вивільненням родаміну 6Ж (оптичну густину вимірювали за довжини хвилі 540 нм). Кількість родаміну 6Ж при цьому еквівалентна кількості дифеніну в іонному асоціаті.

Шляхом дослідження основних валідаційних характеристик – лінійності, правильності та збіжності – показано, що методику можна використовувати при визначенні дифеніну в інтервалі концентрацій від 10 до 140 мкг в пробі. Відносна невизначеність середнього результату становить від  $\pm 6,15\%$  до  $\pm 3,52\%$ .

#### Розробка методик виявлення та кількісного визначення дифеніну за допомогою методів ВЕРХ та ГРХ

Ідентифікацію дифеніну проведено методом ВЕРХ в порівнянні з іншими препаратами групи протисудомних засобів та дибамком з використанням ВЕРХ-аналізатора «Міліхром А-02» (ЗАТ «ЕкоНова», Новосибірськ, РФ).

Умови хроматографування:

- колонка –  $\varnothing 2 \times 75$  мм;  
     обернена фаза ProntoSIL–120–5–C18AQ («Bischoff Analy-  
     sentechnik und Geräte GmbH», Німеччина);  
     ефективність не менше 5000 теоретичних тарілок;
- температура –  $40^{\circ}\text{C}$ ;
- елюент А –  $[4 \text{ моль/л LiClO}_4 - 0,1 \text{ моль/л HClO}_4] - \text{H}_2\text{O} (5:95)$ ;
- елюент Б – ацетонітрил «для ВЕРХ»;
- потік – 100 мкл/хв.;
- градієнт – лінійний від 5% до 100% ацетонітрилу за 40 хв., потім 100%

ацетонітрил протягом 3 хв.;

- детектор – УФ-спектрофотометричний за 4 довжин хвиль (210, 220, 230 та 240 нм).

Встановлено основні хроматографічні параметри дифеніну за зазначених умов – час та об'єм утримування, спектральні відношення (табл. 4 та рис. 2), а також мінімальну концентрацію речовини в розчині, що можна визначити за допомогою наведеної методики.

Таблиця 4

**Основні хроматографічні параметри дифеніну, етосуксиміду, фенобарбіталу, карбамазепіну та дибамку при визначенні методом ВЕРХ**

Речовина	Час утримування $t_R$ , хв.	Об'єм утримування $V_R$ , мкл	$R (S_\lambda / S_{210})$			
			210нм / 210нм	220нм / 210нм	230нм / 210нм	240нм / 210нм
дифенін	25,581	2558,1	1,0000	0,5359	0,2062	0,1134
етосуксимід	10,621	1062,1	1,0000	0,3125	0,2224	0,2135
фенобарбітал	18,372	1837,2	1,0000	0,5057	0,1978	0,1131
карбамазепін	26,597	2659,7	1,0000	0,8677	0,5293	0,4467
дибамк	27,655	2765,5	1,0000	0,2778	0,0289	0,0128

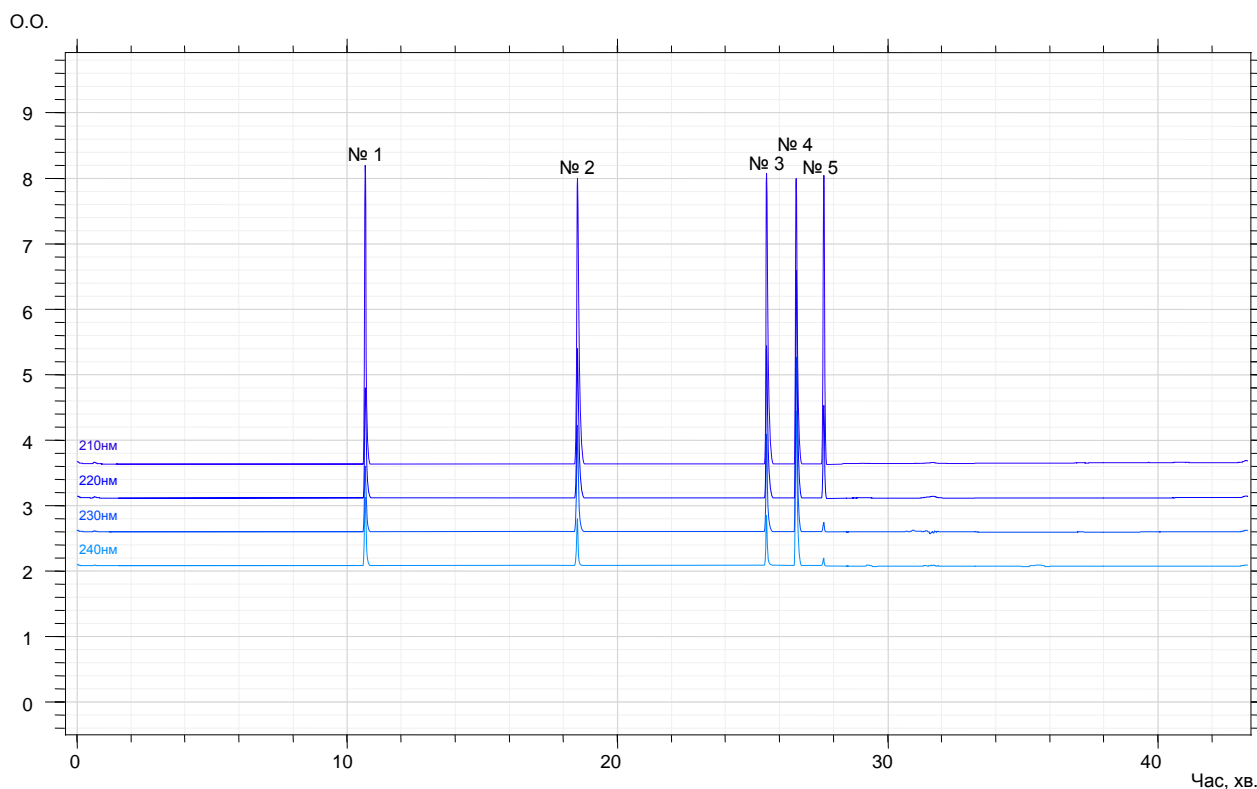


Рис. 2. Хроматограма розчинів етосуксиміду (1), фенобарбіталу (2), дифеніну (3), карбамазепіну (4) та дибамку (5), що отримана за методом ВЕРХ

Таким чином, можна говорити, що ВЕРХ-методика із застосуванням ВЕРХ-аналізатора «Міліхром А-02» забезпечує задовільне розділення дифеніну та інших речовин з протисудомною активністю.

Мінімальна концентрація дифеніну в розчині, що можна визначити за допомогою наведеної методики, становить 1 мкг/мл, що відповідає вмісту речовини у введеній пробі 2 нг.

Для дифеніну розроблено також методику кількісного визначення за допомогою методу ВЕРХ з використанням як розчинника 96% етанолу за зазначених вище умов. Площа піків розчинів дифеніну лінійно залежить від його концентрації в діапазоні концентрацій від 20 мкг/мл до 2000 мкг/мл з відносною невизначеністю середнього результату  $\pm 2,29\%$ .

Підібрано умови виявлення дифеніну за допомогою методу ГРХ в присутності інших речовин з протиепілептичною активністю.

Хроматографування проводили на газо-рідинному хроматографі HP 6890 Hewlett Packard.

Умови хроматографування:

- колонка – HP-1 розміром  $\varnothing 0,32$  мм  $\times$  30 м з товщиною шару 100% диметилполісилоксану 1 мкм;
- температура термостату колонки – 165°C (2 хв.), підвищення температури зі швидкістю 20°C/хв. до 290°C (витримують протягом 20 хв.);
- температура випарника – 280°C;
- детектор – полум'яно-іонізаційний;
- температура детектора – 300°C;
- об'ємна швидкість газу-носія (гелій) – 3 мл/хв.;
- поділ потоку – 1:5.

Основні хроматографічні параметри досліджених речовин при визначенні методом ГРХ за зазначеною методикою наведено в табл. 5, а типова хроматограма – на рис. 3.

Таблиця 5

**Основні хроматографічні параметри дифеніну, етосуксиміду, фенобарбіталу та дибамку при визначенні методом ГРХ**

Речовина	Час утримування $t_R$ , хв.	Площа піку $S$	Ефективність колонки $N$	Коефіцієнт симетрії $T$	Ступінь розділення $R_S$
етосуксимід	2,099	447,1	31138	1,1	19,2
фенобарбітал	5,562	165,2	337080	2,0	81,0
дифенін	7,492	447,9	318441	1,0	42,5
дибамк	9,647	313,5	233056	0,8	34,5

Таким чином, можна зазначити, що розроблена ГРХ-методика забезпечує задовільне розділення дифеніну та інших речовин з протиепілептичною активністю.

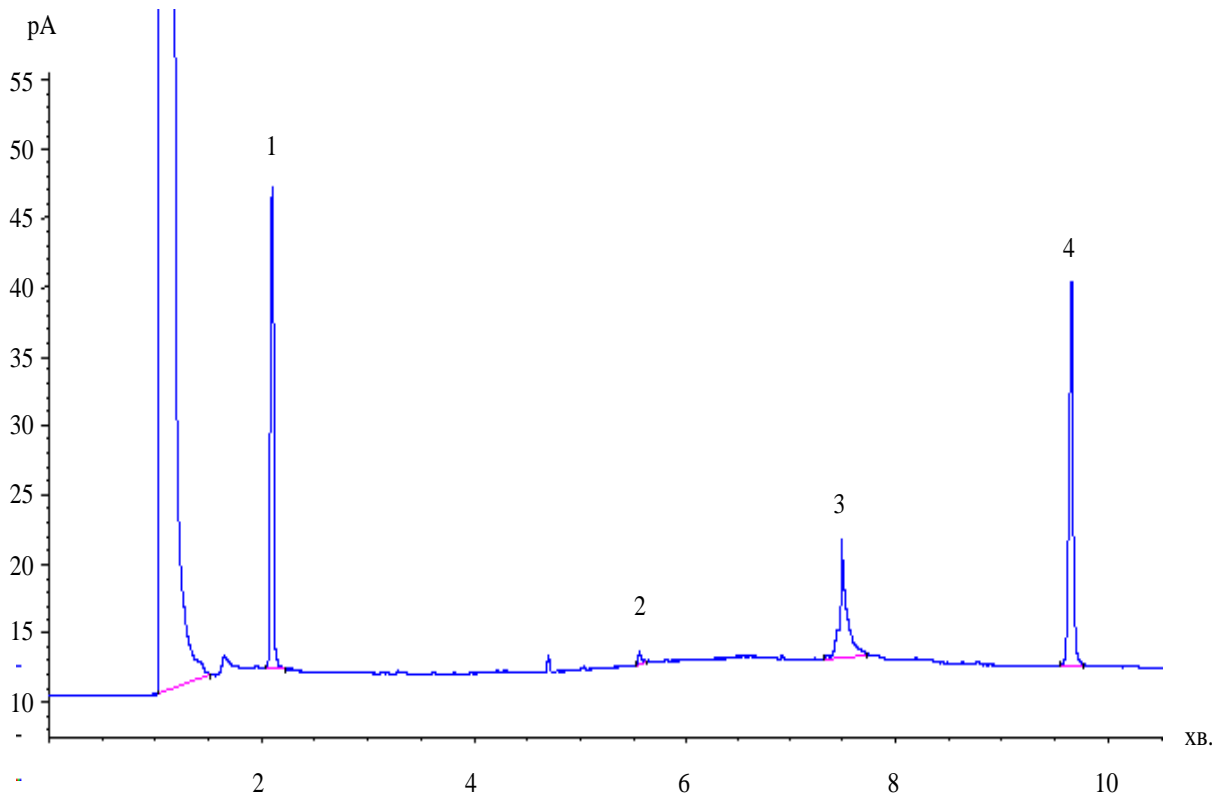


Рис. 3. Хроматограма розчинів етосуксиміду (1), фенобарбіталу (2), дифеніну (3) та дибамку (4), що отримана за методом ГРХ

Для дифеніну розроблено також методику кількісного визначення за допомогою методу ГРХ з використанням як розчинника 96% етанолу за зазначених вище умов. Площа піків розчинів дифеніну лінійно залежить від його концентрації в діапазоні концентрацій від 10 мкг/мл до 100 мкг/мл з відносною невизначеністю середнього результату  $\pm 2,03\%$ .

#### **Дослідження умов екстракції дифеніну з водних розчинів органічними розчинниками. Розробка методик ізолювання дифеніну із біологічного матеріалу**

Для розробки оптимальних умов ізолювання дифеніну із біологічного матеріалу попередньо вивчено екстракцію речовини із водних розчинів широко застосовуваними в хіміко-токсикологічному аналізі органічними розчинниками в залежності від рН середовища (рис. 4).

Потрібне значення рН середовища створювали за допомогою універсальних буферних розчинів з рН від 2,0 до 12,0.

Встановлено, що хлороформ та діетиловий етер можна використовувати для екстракції дифеніну із «кислого» витягу з біологічного матеріалу.

Показано, що гексан практично не екстрагує дифенін із водних розчинів незалежно від рН середовища, тому його можна використовувати для очистки як «кислого», так і «лужного» витягу із біологічного матеріалу.



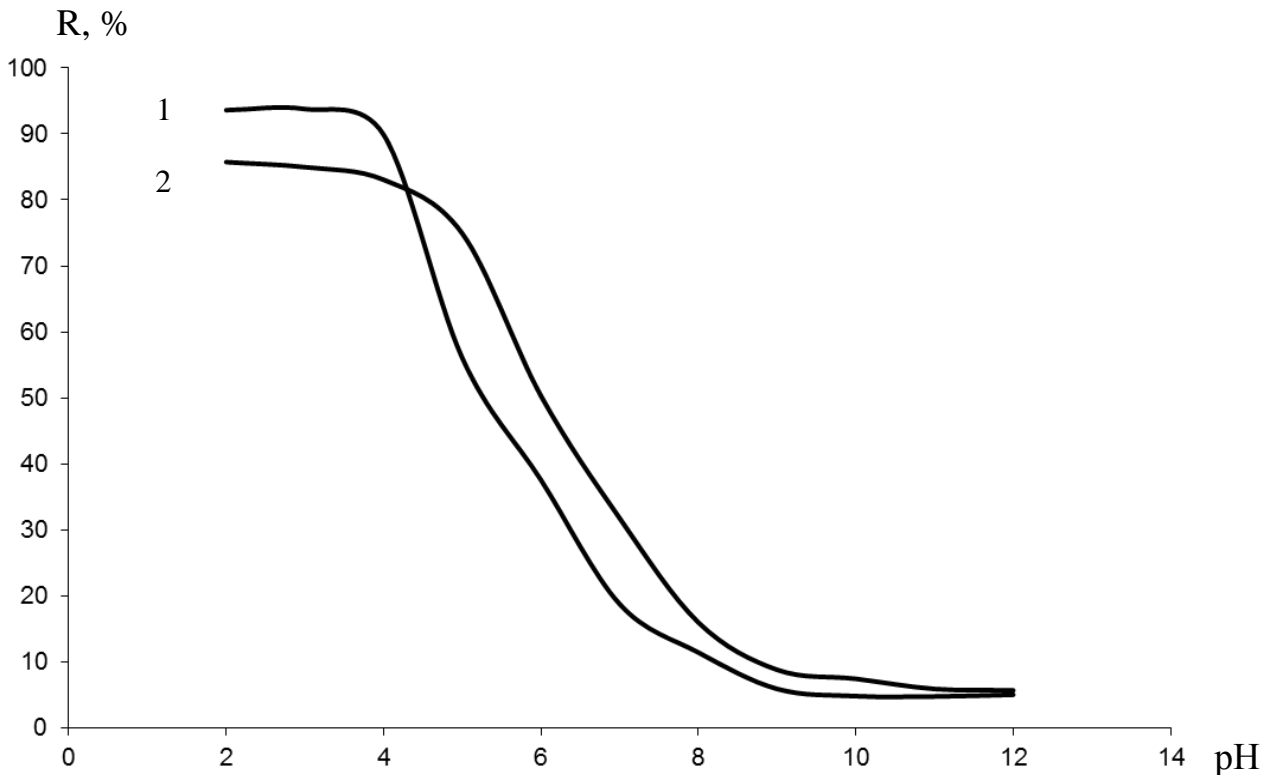


Рис. 4. Залежність ступеня екстракції дифеніну з водних розчинів від рН середовища і природи органічного розчинника: 1 – хлороформ; 2 – діетиловий етер

При дослідженні виділення дифеніну із біологічного матеріалу та біологічних рідин використовували модельні суміші препарату з печінкою, що не зазнала гнилісних змін, кров'ю та сечею. Кількість дифеніну (4000 мкг), що використовували для проведення модельних дослідів, було розраховано виходячи з даних наукової літератури щодо кількості препарату в біологічних рідинах та тканинах людини при смертельних отруєннях.

Вивчено можливість ізолювання дифеніну із біологічного матеріалу за допомогою загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів О. О. Васильєвої, Стаса–Отто, В. П. Крамаренка – методи забезпечують ізолювання до 60% дифеніну, що дозволяє не втратити препарат в ході виконання непрямого аналізу.

Досліджено ступінь ізолювання дифеніну з біологічного матеріалу за допомогою модифікованого окремого методу ізолювання, що використовується в роботі з барбітуратами (метод П. Валова) – метод є вельми ефективним і в роботі з дифеніном (ступінь ізолювання сягає 73 – 74%).

Запропоновано окремі методики ізолювання дифеніну із біологічного матеріалу шляхом комбінованої статичної та динамічної екстракції хлороформом та ацетоном після висушування біологічного матеріалу трикратною кількістю натрію сульфату безводного.

Ізолювання дифеніну із біологічних рідин організму запропоновано проводити за допомогою екстракції хлороформом з кислого середовища. Формені елементи крові осаджують або 0,1 моль/л розчином кислоти хлористоводневої, або 10% розчином кислоти трихлорацетатної.

Кількісні параметри розроблених методик ізолювання дифеніну із біологічного матеріалу наведено в табл. 6.

Таблиця 6

**Результати ізолювання дифеніну  
із об'єктів біологічного походження ( $n = 3$ ;  $P = 0,95$ )**

Метод ізолювання	Виділено дифеніну, %			
	А*	Б	В	Г
за О. О. Васильєвою	59 ± 5	59 ± 8	59 ± 5	60 ± 3
за В. П. Крамаренком	57 ± 6	58 ± 6	56 ± 4	56 ± 3
за Стасом–Отто	51 ± 5	51 ± 5	51 ± 3	50 ± 3
за П. Валовим	74 ± 5	73 ± 4	74 ± 3	74 ± 3
ізолювання хлороформом	71 ± 5	71 ± 5	71 ± 3	71 ± 3
ізолювання ацетоном	75 ± 6	74 ± 5	75 ± 3	75 ± 3
ізолювання із крові 1	60 ± 5	62 ± 4	62 ± 3	62 ± 3
ізолювання із крові 2	64 ± 5	63 ± 4	64 ± 3	64 ± 3
ізолювання із сечі	77 ± 6	78 ± 5	75 ± 4	73 ± 4

\*Методика кількісного визначення:

- А – УФ-спектрофотометрична ( $\lambda = 258$  нм);
- Б – екстракційно-фотометрична;
- В – ВЕРХ-методика після ТШХ-очистки;
- Г – ГРХ-методика після ТШХ-очистки

Запропоновано методику ТШХ-очистки витягів із об'єктів біологічного походження шляхом елюювання пластин в системі розчинників етилацетат – метанол – 25% розчин амоніаку (85:10:5). Попередньо пластини елюють в хлороформі – один раз або, за необхідності, двічі. За цих умов дифенін залишається на лінії старту, а співекстрактивні речовини мігрують до лінії фінішу. З пластин дифенін елюють 0,001 моль/л розчином калію гідроксиду в метанолі. Методика дозволяє виділити з пластини не менш як 98% препарату.

За результатами проведених досліджень запропоновано схему спрямованого аналізу біологічного матеріалу на дифенін (рис. 5).

Встановлено термін зберігання дифеніну в біологічному матеріалі при його гнитті – показано, що після 3 тижнів зберігання кількість дифеніну у біологічному матеріалі стабілізується і навіть через 3 місяці із біологічного матеріалу ізолюється до 50% дифеніну.

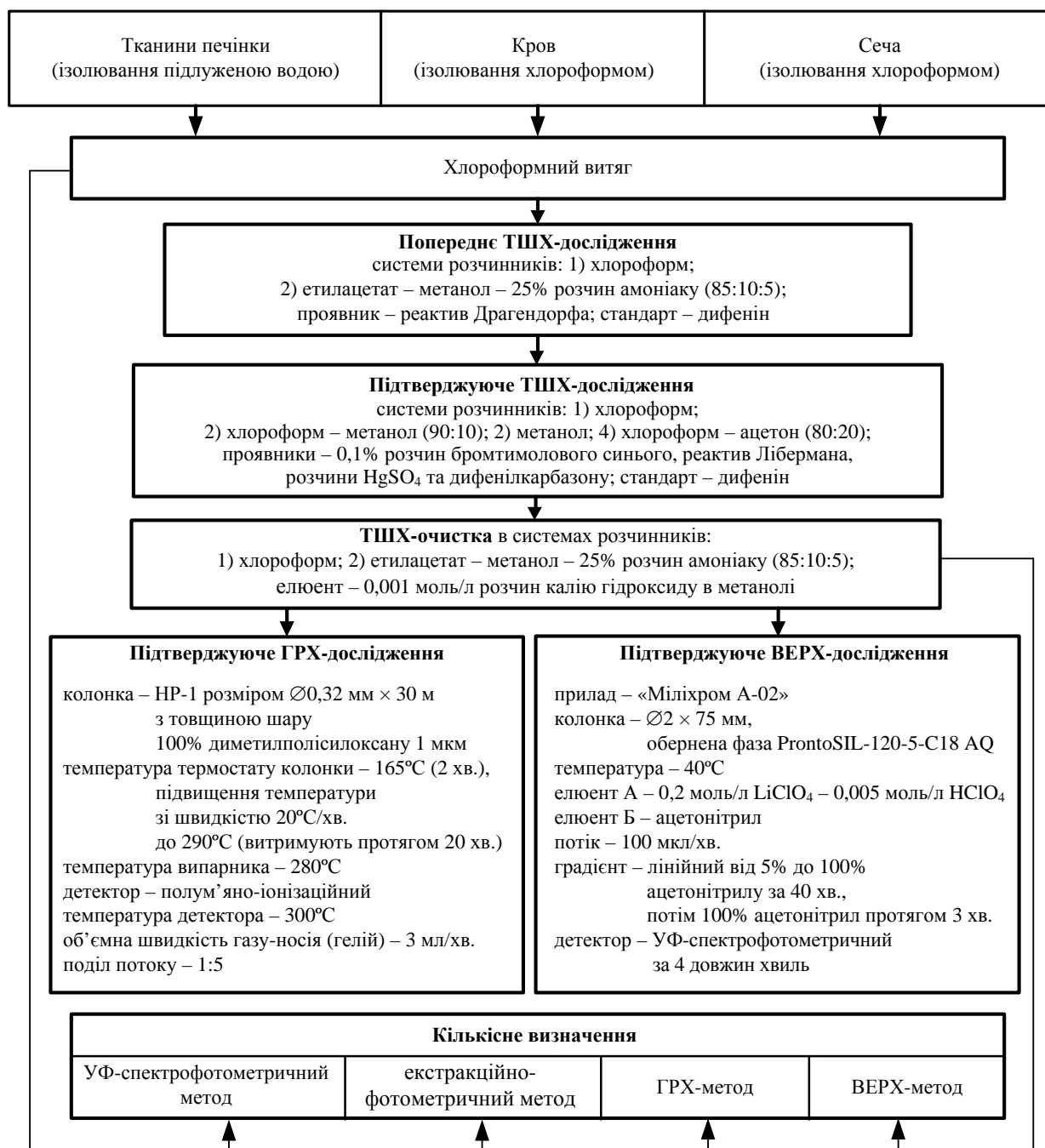


Рис. 5. Схема спрямованого аналізу біологічного матеріалу на дифенін

## ВИСНОВКИ

Шляхом виконання комплексу системних досліджень вперше запропоновано покроковий алгоритм виконання спрямованого хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на дифенін, обґрунтовано його окремі етапи – методики ізолювання препарату, очистки отриманих витягів із біологічного матеріалу, виявлення за допомогою комплексу кольорових реакцій, методів УФ-спектроскопії, ТШХ, ГРХ та ВЕРХ, а також кількісного визначення. Загальну схему ТШХ-скринінгу органічних отрут доповнено операціями, що дозволяють не втратити дифенін при проведенні неспрямованого дослідження.

1. Розроблено чутливі методики ідентифікації дифеніну та деяких інших речовин протисудомної дії за допомогою якісних реакцій та методу тонкошарової хроматографії – підбрано реактиви та системи розчинників, що дозволяють віддиференціювати їх один від одного, досліджено хроматографічну поведінку речовин в загальноприйнятих в хіміко-токсикологічному аналізі системах розчинників, вивчено їх відношення до проявників, що застосовуються в загальному ТШХ-скринінгу токсичних речовин.
2. Розроблено дві методики кількісного визначення дифеніну методом УФ-спектрофотометрії –  $\lambda = 258$  нм (розчинник – 96% етанол) та  $\lambda = 236$  нм (розчинник – 0,1 моль/л розчин натрію гідроксиду); методики дають можливість визначити препарат у межах концентрації від 50 мкг/мл до 450 мкг/мл та від 10 мкг/мл до 100 мкг/мл відповідно; відносна невизначеність середнього результату становить  $\pm 3,94\%$  та  $2,06\%$  відповідно; та методом екстракційної фотометрії (з використанням як реагенту ксантенового барвника родаміну 6Ж, що утворює з дифеніном іонний асоціат) – методика дає можливість визначити від 10 мкг до 140 мкг дифеніну у пробі; відносна невизначеність середнього результату коливається від  $\pm 6,15\%$  до  $\pm 3,52\%$  в залежності від кількості виконуваних додаткових операцій. Розроблені методики апробовано на витягах із об'єктів біологічного походження як до, так і після їх ТШХ-очистки.
3. Проведено аналіз дифеніну в порівнянні з іншими протисудомними препаратами та дибамком методами ВЕРХ (з використанням ВЕРХ-аналізатора «Міліхром А-02») та ГРХ; показано, що застосовувані методики забезпечують задовільне розділення досліджених препаратів.
4. Розроблено методики кількісного визначення дифеніну методами ВЕРХ (методика лінійна в діапазоні концентрацій від 20 мкг/мл до 2000 мкг/мл; відносна невизначеність середнього результату становить  $\pm 2,29\%$ ) та ГРХ (методика лінійна в діапазоні концентрацій від 10 мкг/мл до 100 мкг/мл; відносна невизначеність середнього результату становить  $\pm 2,03\%$ ). Показано можливість застосування розроблених ГРХ- та ВЕРХ-методик для кількісного визначення дифеніну у витягах із біологічного матеріалу після їх ТШХ-очистки.
5. Встановлено оптимальні умови екстракції дифеніну із водних розчинів – найбільш високий ступінь екстракції забезпечують хлороформ та діетиловий етер в кислому середовищі.
6. Вперше досліджено можливість застосування загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання органічних речовин кислотного та основного характеру – О. О. Васильєвої, Стаса–Отто та В. П. Крамаренка – для виділення дифеніну із біологічного матеріалу. Встановлено ефективність ізолювання дифеніну з біологічного матеріалу за допомогою модифікованого окремого методу, що використовується в роботі з барбітуратами (метод П. Валова), – метод забезпечує виділення  $\sim 75\%$  препарату.

7. Розроблено індивідуальні методики ізолювання дифеніну із біологічного матеріалу за допомогою хлороформу і ацетону та методики виділення дифеніну з біологічних рідин організму (крові, сечі). Запропоновано методику очищення дифеніну від співекстрактивних речовин у витягах із біологічного матеріалу із застосуванням методу ТШХ.
8. Встановлено термін зберігання дифеніну в біологічному матеріалі при його гнитті – після 3 тижнів зберігання кількість дифеніну у біологічному матеріалі стабілізується і навіть через 3 місяці із біологічного матеріалу ізолюється до 50% дифеніну.

### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. *Бондар В. С.* Застосування вискоелективної рідинної хроматографії в аналізі дифеніну / *В. С. Бондар, О. В. Багуля* // Укр. мед. альм. – 2012. – Т. 15, №5 (додаток). – С. 45 – 47. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка статті).
2. *Бондар В. С.* Розробка умов визначення дифеніну методом газорідинної хроматографії, придатних для цілей хіміко-токсикологічного аналізу / *В. С. Бондар, О. В. Багуля, О. В. Байдак* // Укр. мед. альм. – 2013. – Т. 16, №1. – С. 53 – 54. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка статті).
3. *Бондарь В. С.* Сравнительная оценка методов изолирования дифенина из биологического материала / *В. С. Бондар, А. В. Багуля* // Фармация Казахстана. – 2013. – №10. – С. 32 – 35. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка статті).
4. *Бондарь В. С.* Качественные реакции и ТСХ в химико-токсикологическом анализе дифенина / *В. С. Бондар, А. В. Багуля* // Фармация Казахстана. – 2013. – №7. – С. 38 – 40. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка статті).
5. *Бондар В. С.* Екстракційно-фотометричне визначення дифеніну / *В. С. Бондар, О. В. Багуля, І. О. Нефьодов* // Укр. біофармац. журн. – 2013. – №3 (26). – С. 56 – 59. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка статті).
6. *Багуля О. В.* Ізолювання дифеніну водою, підкисленою кислотою оксалатною / *О. В. Багуля, В. С. Бондар* // Укр. мед. альм. – 2013. – Т. 16, №1 (додаток). – С. 154 – 155. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка тез).
7. *Багуля О. В.* Необхідність хіміко-токсикологічного дослідження дифеніну / *О. В. Багуля, В. С. Бондар* // Сучасні проблеми судово-токсикологічної на-

- уки і практики: матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 9 – 10 квіт. 2009 р., Харків. – Х.: Вид-во НФаУ, 2009. – С. 126 – 128. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка тез).
8. *Бондар В. С.* Розробка методів ідентифікації дифеніну, придатних для хіміко-токсикологічного аналізу / *В. С. Бондар, Ю. П. Медведєва, О. В. Багуля* // Сьогодні та майбутнє фармації: тез. доп. Всеукр. конгр., 16 – 19 квіт. 2008 р., Харків. – Х.: Вид-во НФаУ, 2008. – С. 81. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка тез).
  9. *Багуля О. В.* Розділення та ідентифікація протиепілептичних засобів / *О. В. Багуля, В. С. Бондар* // Фармація України. Погляд у майбутнє: матеріали VII Нац. з'їзду фармацевтів України, 15 – 17 верес. 2010 р., Харків. – Х., 2010. – Т. 1. – С. 128. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка тез).
  10. *Багуля О. В.* Хіміко-токсикологічне дослідження протиепілептичного засобу дифеніну / *О. В. Багуля, В. С. Бондар* // Сучасні проблеми токсикології. Безпека їжі та середовища життєдіяльності людини: матеріали III Нац. з'їзду токсикологів України, 18 – 19 груд. 2011 р., Київ. – Сучас. пробл. токсикології. – 2011. – №5. – С. 145 – 146. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка тез).
  11. *Bondar V. S.* Development of the isolation procedure for phenytoin using sodium hydroxyde / *V. S. Bondar, O. V. Bagulya* // Actual Questions of Development of New Drugs: Book of Abstracts of XX International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Students Devoted to the 90th Anniversary of Doctor of Science in Pharmacy, Professor Dmitri Pavlovych Salo, April 25 – 26, 2013, Kharkiv. – Kharkiv: NUPh, 2013. – P. 77. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка тез).

**Багуля О. В. Хіміко-токсикологічне дослідження дифеніну. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія. – Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2014.

Дисертацію присвячено хіміко-токсикологічному дослідженню дифеніну.

Розроблено методики виявлення дифеніну за допомогою кольорових реакцій, методів УФ-спектроскопії, ТШХ, ВЕРХ та ГРХ в присутності інших протисудомних лікарських засобів та дибамку.

Розроблено дві методики кількісного визначення дифеніну методом УФ-спектрофотометрії ( $\lambda = 258$  нм та  $\lambda = 236$  нм), методом екстракційної фотометрії з використанням як реагенту ксантенового барвника родаміну 6Ж, методами ВЕРХ та ГРХ. Розроблені методики апробовано на витягах із об'єктів біологічного походження до та після їх ТШХ-очистки.

Порівняно ефективність загальних методів ізолювання органічних речовин кислотного характеру щодо дифеніну та розроблено індивідуальні методи ізолювання дифеніну із біоматеріалу.

Запропоновано покроковий алгоритм хіміко-токсикологічного аналізу біоматеріалу на дифенін та доповнення до загальної схеми ТШХ-скринінгу органічних речовин, що дозволяють не втратити дифенін при проведенні неспрямованого дослідження.

**Ключові слова:** дифенін, хіміко-токсикологічний аналіз, оптичні методи аналізу, хроматографічні методи аналізу, кольорові реакції, екстракція, ізолювання із біоматеріалу.

**Багуля А. В. Химико-токсикологическое исследование дифенина. – Рукопись.**

Диссертация на соискание научной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия. – Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, Харьков, 2014.

Диссертационная работа посвящена систематическому химико-токсикологическому исследованию дифенина.

Разработаны чувствительные методики идентификации дифенина и некоторых других веществ с противосудорожной активностью с помощью качественных реакций и метода тонкослойной хроматографии – подобраны реактивы и системы растворителей, которые позволяют отдифференцировать их один от другого, исследовано хроматографическое поведение веществ в общепринятых в химико-токсикологическом анализе системах растворителей, изучено их отношение к проявителям, которые применяются в общем ТСХ-скрининге токсичных веществ.

Разработаны две методики количественного определения дифенина методом УФ-спектрофотометрии –  $\lambda = 258$  нм (растворитель – 96% этанол) и  $\lambda = 236$  нм (растворитель – 0,1 моль/л раствор натрия гидроксида); методики дают возможность определять препарат в пределах концентраций от 50 мкг/мл до 450 мкг/мл и от 10 мкг/мл до 100 мкг/мл соответственно; относительная неопределенность среднего результата составляет  $\pm 3,94\%$  и  $2,06\%$  соответственно; и методом экстракционной фотометрии (с использованием в качестве реагента ксантенового красителя родамина 6Ж, который образует с дифенином ионный ассоциат) – методика дает возможность определить от 10 мкг до 140 мкг дифенина в пробе; относительная неопределенность среднего результата колеблется от  $\pm 6,15\%$  до  $\pm 3,52\%$  в зависимости от количества выполняемых дополнительных операций. Разработанные методики апробированы на извлечениях из объектов биологического происхождения как до, так и после их ТСХ-очистки.

Проведен анализ дифенина в сравнении с другими противосудорожными препаратами и дибамком методами ВЭЖХ (с использованием ВЭЖХ-

анализатора «Милихром А-02») и ГЖХ; показано, что применяемые методики обеспечивают удовлетворительное разделение исследованных веществ.

Разработаны методики количественного определения дифенина методами ВЭЖХ (методика линейна в диапазоне концентраций от 20 мкг/мл до 2000 мкг/мл; относительная неопределенность среднего результата составляет  $\pm 2,29\%$ ) и ГЖХ (методика линейна в диапазоне концентраций от 10 мкг/мл до 100 мкг/мл; относительная неопределенность среднего результата составляет  $\pm 2,03\%$ ). Показана возможность применения разработанных ГЖХ- и ВЭЖХ-методик для количественного определения дифенина в извлечениях из биологического материала после их ТСХ-очистки.

Установлены оптимальные условия экстракции дифенина из водных растворов – наиболее высокую степень экстракции обеспечивают хлороформ и диэтиловый эфир в кислой среде.

Впервые исследована возможность применения общепринятых в химико-токсикологическом анализе методов изолирования органических веществ кислотного и основного характера – А. А. Васильевой, Стаса–Отто и В. Ф. Крамаренко – для выделения дифенина из биологического материала. Установлена эффективность изолирования дифенина из биологического материала с помощью модифицированного частного метода, который используется в работе с барбитуратами (метод П. Валова), – метод обеспечивает выделение  $\sim 75\%$  препарата.

Разработаны индивидуальные методики изолирования дифенина из биологического материала с помощью хлороформа и ацетона и методики выделения дифенина из биологических жидкостей организма (крови, мочи). Предложена методика очистки дифенина от соэкстрактивных веществ в извлечениях из биологического материала с применением метода ТСХ.

Установлен срок сохраняемости дифенина в биологическом материале при его гниении – после 3 недель хранения количество дифенина в биологическом материале стабилизируется и даже через 3 месяца из биологического материала изолируется до 50% дифенина.

Впервые предложен пошаговый алгоритм выполнения направленного химико-токсикологического анализа биологического материала на дифенин, обоснованы его отдельные этапы – методики изолирования препарата, очистки полученных извлечений из биологического материала, обнаружения с помощью комплекса цветных реакций, методов УФ-спектроскопии, ТСХ, ГЖХ и ВЭЖХ, а также количественного определения. Общая схема ТСХ-скрининга органических ядов дополнена операциями, которые позволят не потерять дифенин при проведении ненаправленного исследования.

**Ключевые слова:** дифенин, химико-токсикологический анализ, оптические методы анализа, хроматографические методы анализа, цветные реакции, экстракция, изолирование из биоматериала.



**Bagulya O. V. The chemical and toxicological investigation of phenytoin. – A manuscript.**

Thesis for the Candidate's scientific degree in Pharmacy on the speciality 15.00.02 – pharmaceutical chemistry and pharmacognosy. – National University of Pharmacy, Ministry of Public Health of Ukraine, Kharkiv, 2014.

Thesis is devoted to phenytoin chemical and toxicological research.

The methods of phenytoin detection with the help of coloured reactions, methods of UV-spectroscopy, TLC, HPLC and GLC in the presence of other anti-convulsant medicines and dibamk have been developed.

Two methods of phenytoin quantitative determination by the method of UV-spectrophotometry ( $\lambda = 258$  nm and  $\lambda = 236$  nm), by the method of extraction photometry using rhodamine 6G xanthene dye as the reagent, by the methods HPLC and GLC have been developed. The developed methods have been approved by the extracts from the objects of biological origin before and after their TLC-purification.

Efficiency of isolation general methods of organic substances with acid properties has been compared in relation to phenytoin and individual methods of phenytoin isolation from biomaterial have been developed.

The step-by-step algorithm of chemical and toxicological analysis of biomaterial for phenytoin presence has been offered and supplement to the general scheme of TLC-screening of organic substances that allows not to lose phenytoin when carrying out undirected research has been added.

**Key words:** phenytoin, chemical and toxicological analysis, optical methods of analysis, chromatographic methods of analysis, coloured reactions, extraction, isolation from biomaterial.

Підписано до друку 29. 04. 2014 р.

Формат 60×84 1/16. Папір офсетний. Друк ризографічний.

Умовн. друк. арк. 0,9. Наклад 100 прим. Зам. № б/н.

Надруковано СПД ФО Степанов В. В., м. Харків, вул. Ак. Павлова, 311