

МОЗ УКРАЇНИ
УКРАЇНСЬКИЙ ЦЕНТР НАУКОВОЇ МЕДИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ
ТА ПАТЕНТНО ЛІЦЕНЗІЙНОЇ РОБОТИ
(УКРМЕДПАТЕНТІНФОРМ)

ІНФОРМАЦІЙНИЙ
ЛИСТ

про наукову (науково-технічну) продукцію, отриману за результатами наукової, науково-технічної та науково-організаційної діяльності підприємств, установ, організацій Міністерства охорони здоров'я України, Міністерства освіти і науки України, Національної академії медичних наук України призначену для практичного застосування у сфері охорони здоров'я

м. Київ

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
Український центр наукової медичної інформації
та патентно-ліцензійної роботи
(Укрмедпатентінформ)

ІНФОРМАЦІЙНИЙ ЛИСТ

ПРО НОВОВВЕДЕННЯ В СФЕРІ ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я

№193 - 2020

Випуск з проблеми
«Фармація»
Підстава: витяг ЕПК
«Фармація»
Протокол № 109 від 10.03.20 р.

НАПРЯМ ВПРОВАДЖЕННЯ:
ФАРМАЦІЯ

ВИЗНАЧЕННЯ КЛОНІДИНУ У СЕЧІ ХРОМАТОГРАФІЧНИМИ
МЕТОДАМИ

УСТАНОВИ-РОЗРОБНИКИ:

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
МОЗ УКРАЇНИ

УКРМЕДПАТЕНТИНФОРМ
МОЗ УКРАЇНИ

А В Т О Р И:

проф. О.О. МАМІНА,
проф. В.І. КАБАЧНИЙ,
доц. О.В. ЛОЗОВА,
доц. Н.Ю. БОНДАРЕНКО

м. Київ

Суть впровадження: методика визначення клонідину у сечі хроматографічними методами, яка складається з екстрагування препарату хлороформом, очистки витягів, ідентифікації та кількісного визначення при застосуванні тонкошарової та високоефективної рідинної хроматографії.

Пропонується для впровадження в практику роботи бюро судово-медичної експертизи, токсикологічних та наркологічних центрів, клінічних лабораторій по вивченню лікарських речовин у біологічних об'єктах методика визначення клонідину у сечі при використанні тонкошарової (ТШХ) та високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Клонідину гідрохлорид - N-(2,6-дихлорфеніл)-4,5-дигідро-1H-імідазол-2-аміну гідрохлорид є гіпотензивним лікарським засобом. Клонідин застосовують для лікування гіпертонічного кризу, артеріальної гіпертензії. Гіпотензивний ефект клонідину супроводжується зниженням серцевого викиду і зменшенням периферичного опору судин, в тому числі судин нирок. Клонідин викликає зниження внутрішньочного тиску, пов'язане зі зменшенням секреції і поліпшенням відтоку водянистої вологи.

При передозуванні і самолікуванні клонідин може викликати сильну інтоксикацію, яка супроводжується пригніченням функцій центральної нервової системи, серцево-судинної і дихальної систем з розвитком гіпотонії, брадикардії, колапсу, коми.

Клонідин відомий в кримінальній практиці як наркотик, який злочинці використовують для додавання в алкоголь при переведенні жертви у несвідомий стан з наступним пограбуванням та вбивством.

У зв'язку із проведенням терапевтичного моніторингу при використанні клонідину, а також для створення баз даних судово-токсикологічної експертизи для масивів досліджуваних речовин у біологічних об'єктах метою даної роботи є розробка методики визначення клонідину у сечі сучасними високочутливими та селективними ТШХ- та ВЕРХ-методами.

При дослідженнях використовували модельні суміші сечі з клонідином. Для цього до 10,0 мл біологічної рідини додавали 500,0 мкг клонідину гідрохлориду при застосуванні водного розчину лікарської речовини, який вміщував 1000,0 мкг/мл. Модельні суміші та контрольні проби залишали на 1 год при кімнатній температурі.

Методика ізолювання клонідину з сечі. До 10,0 мл модельної суміші сечі з клонідином гідрохлоридом додавали 5,0 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної, перемішували та перевіряли за універсальним індикаторним папером рН суміші – 2,0-2,5, залишали на 2 год при постійному перемішуванні. Суміш центрифугували при 6000 об/хв протягом 10 хв, зливали надосадову рідину та тричі екстрагували домішки гексаном порціями по 5,0 мл. Гексанові фази не досліджували.

Водний шар підлюговували 0,1 М розчином натрію гідроксиду до рН 9,0-9,5 і двічі екстрагували клонідин-основу хлороформом порціями по 10,0 мл з наступним центрифугуванням при 6000 об/хв протягом 10 хв. Лужні хлороформні витяги об'єднували та фільтрували через паперовий фільтр («червона стрічка») з 1,0 г натрію сульфату безводного, проводили ТШХ-очистку витягів.

Методика ТШХ - очистки витягів із сечі. Хлороформні витяги випаровували до сухого залишку, який розчиняли в метанолі, після чого кількісно переносили в мірну колбу місткістю 5,0 мл, доводили до мітки метанолом та досліджували ТШХ-методом: 1,0 мл метанольного розчину клонідину упарювали до 0,3-0,5 мл та наносили у вигляді смуги довжиною 2 см на лінію старту хроматографічної пластинки Сорбфіл ПСТХ-П-В-УФ.

На відстані 2 см від смуги наносили в точку 50,0 мкг свідка, використовуючи стандартний метанольний розчин (50,0 мкг/мл) клонідину. На відстані 2 см від точки, яка відповідала свідку, наносили отриманий, як зазначено вище, витяг з контрольної проби. Хроматографування проводили в камері об'ємом 500 см³, в яку вносили 50,0 мл системи органічних розчинників - хлороформ-метанол (90:10) з наступним насиченням камери парами розчинників не менше 30 хв; довжина пробігу фронту рухомої фази – 8 см.

Хроматографічну пластинку висушували при кімнатній температурі, після чого її частину, де знаходився свідок та витяг з контрольної проби, проявляли УФ-світлом (чутливість проявнику – 0,5 мкг речовини у пробі) та реактивом Драгендорфу в модифікації за Мунье (чутливість проявнику – 1,0-3,0 мкг речовини у пробі); R_f клонідину = 0,50-0,53, домішки - на лінії старту або на лінії фінішу.

На рівні знаходження плями стандартного розчину досліджуваної речовини з частини пластинки, яка не була оброблена проявником, знімали шар сорбенту площею 4-5 см², переносили на фільтр та тричі елюювали речовину метанолом по 5,0 мл та фільтрували через фільтр («червона стрічка»). Метанольний розчин упарювали на водяній бані до об'єму 2-3 мл, кількісно переносили в мірну колбу місткістю 5,0 мл, доводили до мітки метанолом та застосовували для кількісного визначення ВЕРХ-методом.

Для підтвердження отриманих даних проводили ТШХ-ідентифікацію клонідину:

- на хроматографічних пластинках Сорбфіл ПСТХ-П-В-УФ у системі органічних розчинників - метанол-н-бутанол (60:40), $R_f = 0,61-0,63$;
- на хроматографічних пластинках Сорбфіл ПСТХ-АФ-А у системі органічних розчинників - етилацетат-метанол-25% розчин амонію гідроксиду (85:10:5), $R_f = 0,64-0,67$.

Методика ВЕРХ – ідентифікації та кількісного визначення. Хроматографування досліджуваної речовини проводили на мікроколоночному рідинному хроматографі «Міліхром А-02» ("ЕкоНова" Новосибірськ, Росія) за уніфікованими ВЕРХ-умовами в обернено-фазному варіанті при застосуванні металеві колонки з неполярним сорбентом Prontosil 120-5C 18 AQ, 5 мкм.

При елююванні препарату з колонки використовували суміші розчинників - ацетонітрилу з 0,2 М розчином літію перхлорату у 0,005 М розчині кислоти хлорної. Для досліджень використовували ацетонітрил «для ВЕРХ» («Кріохром», С.-Петербург), профільтрований через мембрану «владипор» МФА-МА-N-2 з розміром пор 0,15-0,25 мкм, дегазований вакуумуванням. Лінійний градієнт від елюенту А (5 % ацетонітрилу та 95% буферного розчину) до елюенту Б (100% ацетонітрилу) протягом 40 хв створював умови

для виходу з колонки усіх складових частин проби у вигляді вузьких зон. Регенерація колонки проводилась протягом 2 хв сумішшю розчинників (2% ацетонітрилу та 98% буферного розчину).

Об'єм проби для введення складав 4 мкл; оптимальний рівень тиску створювався двошприцевим градієнтним насосом (2,8 – 3,2 МПа), елюювання досліджуваної речовини проводили з постійною швидкістю - 100 мкл/хв при температурі термостату - 37 - 40°C. Детектування речовини виконували із застосуванням двопробеневого мультихвильового УФ-спектрофотометру у діапазоні довжин хвиль 190-360 нм за 8 значеннями довжини хвилі: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 та 300 нм.

Ідентифікацію клонідину проводили за параметрами утримування – абсолютним часом утримування ($t_{\text{абс}} = 10,06 - 11,00$ хв), об'ємом утримування ($V_{\text{абс}} = 1005,82 - 1100,78$ мкл), а також за спектральними відношеннями - 0,515, 0,207, 0,064, 0,017, 0,014, 0,016, 0,014.

Концентрацію клонідину в отриманих розчинах (С, мкг/мл) розраховували за допомогою градуювального графіку або за відповідним рівнянням лінійної залежності площі піка клонідину від його концентрації. При кількісному визначенні клонідину лінійність градуювального графіку у координатах ($S, \text{мм}^2$) - (С, мкг/мл) спостерігалась в інтервалі концентрацій 5,0 - 100,0 мкг/мл. Межа визначення клонідину складала 5,0 мкг / мл або 20,0 нг у пробі.

Кількісне визначення клонідину проводили при застосуванні рівняння градуювального графіку $S = 0,5 \cdot 10^{-4} C + 1,8 \cdot 10^{-3}$, коефіцієнти регресії якого були розраховані методом найменших квадратів. Коефіцієнт кореляції складав 0,9964.

За результатами дослідження встановлено, що при ізолюванні клонідину із сечі за розробленими методиками можна виділити 36,9 – 40,2% речовини ($\varepsilon = \pm 4,13\%$, $RSD x = 1,48\%$).

Інформаційний лист складено за матеріалами НДР «Органічний синтез та аналіз БАР, розробка лікарських засобів на основі синтетичних та напівсинтетичних субстанцій». № НДР: 0114U000943. Термін виконання: 2014-2023 рр.

За додатковою інформацією з даної проблеми слід звертатися до авторів листа: Національний фармацевтичний університет, вул.Пушкінська, 53, м. Харків, 61002.

Відповідальний за випуск: О. Мислицький

Підписано до друку 12.11.2020 Друк. арк. 0,13. Обл.-вид. арк. 0,08. Тир. 112 прим.

Замовлення № 193. Фотоофсетна лаб. Укрмедпатентінформ МОЗ України, 04071, м. Київ, вул. Межигірська, 43, каб. 46.

Шановний колего!

Інформаційний лист є анотованим описом наукової (науково-технічної) продукції, що входить до Переліку наукової (науково-технічної) продукції, призначеної для впровадження досягнень медичної науки у сферу охорони здоров'я (Наказ МОЗ України та НАМН від 13.11.2013 №969/97 «Про удосконалення впровадження досягнень медичної науки у сферу охорони здоров'я», зареєстрований в Міністерстві юстиції України 05.12.2013 за № 2068/24600).

Інформаційний лист спрямований для використання керівниками структурних підрозділів (відповідного профілю) закладів охорони здоров'я України для моніторингу передових технологій діагностики та лікування з подальшим їх упровадженням у практику (Наказ МОЗ України від 14.03.2011 №142 «Про вдосконалення державної акредитації закладів охорони здоров'я»).