

Рекомендована д.ф.н., професором П.О.Безуглим

УДК 543.42.062:535.24:615.214.24:547.821

## ВИВЧЕННЯ МЕТОДІВ ІЗОЛЮВАННЯ ДОНОРМІЛУ З ОБ'ЄКТІВ БІОЛОГІЧНОГО ПОХОДЖЕННЯ

В.В.Болотов, І.М.Іванчук, Л.Ю.Клименко

Національний фармацевтичний університет

**Вивчені умови ізолювання донормілу з біологічного матеріалу за допомогою методів О.О.Васильєвої, Стаса-Отто та В.П.Крамаренка, а також методики, запропонованої О.В.Удаловим. Запропоновано експресну методику ізолювання донормілу хлороформом з попередньою очисткою біологічного матеріалу гексаном, що дозволяє виділити до 80% препарату. Запропоновані методики ідентифікації донормілу в отриманих витяжках методом ТШХ.**

За даними наукової літератури снодійні засоби посідають певне місце серед ліків, що призводять до отруєнь, як випадкових, так і навмисних [12, 13, 15]. Серед них останнім часом широко трапляється і донорміл — снодійний засіб групи етаноламінів, що в Україні належить до препаратів безрецептурного відпуску на відміну від інших препаратів, які застосовуються для лікування розладів сну, і тому є вельми популярним серед усіх верств населення [9, 10, 17]. Клінічна картина отруєнь донормілом і морфологічні зміни в організмі при цьому не є характерними та мають багато спільного з препаратами групи бензодіазепінів та особливо з димедролом [14, 16-18], тому в діагностиці цих отруєнь велику увагу приділяють результатам хіміко-токсикологічних досліджень.

На першому етапі цих досліджень необхідно провести ізолювання препарату з біологічного матеріалу з максимальним виходом.

Ми поставили за мету вивчити можливості ізолювання донормілу з біологічного матеріалу за допомогою загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів: О.О.Васильєвої, Стаса-Отто, В.П.Крамаренка [6, 7], а також за методикою, запропонованою О.В.Удаловим [8], що є модифікацією методу Стаса-Отто. Крім того, для виділення донормілу з біологічного матеріалу цікаво використати методики ізолювання хлороформом (з та без попередньої очистки гексаном), запропоновані раніше для снодійного препарату зопіклону [5].

Для розробки оптимальних методик виявлення препарату з біологічного матеріалу попередньо нами встановлено, що хлороформ екстрагує до-

норміл із водних розчинів у лужному середовищі, при цьому при одноразовій екстракції в органічний шар переходить близько 90% препарату. Ступінь одноразової екстракції донормілу з водних розчинів діетиловим етером сягає максимуму (75%) при рН = 10-12. Гексан практично не екстрагує донорміл із водних розчинів ні в кислому, ні в лужному середовищі.

### Експериментальна частина

При дослідженні виділення донормілу з біологічного матеріалу використовували модельні суміші препарату з печінкою, що не зазнала гнилісних змін, взятою від трупа людини, яка загинула від травм. Для цього до 10 г подрібненої печінки (розмір частинок не повинен перевищувати 1 мм) додавали 1,00 мл розчину донормілу в воді очищеної (1000 мкг препарату), ретельно перемішували і залишали на добу. Готували також контрольні суміші печінки з розчинником (вода очищена), дослідження яких проводили паралельно з основними.

Кількість донормілу, що використовували для проведення модельних дослідів, було розраховано, виходячи з даних наукової літератури щодо кількості препарату в органах і тканинах людини при смертельних отруєннях [14, 17].

Ізолювання донормілу з біологічного матеріалу проводили за методиками, описаними в роботах [5-8].

При цьому отримували: 25 мл витяжки 1 (за О.О.Васильєвою), 25 мл витяжки 2 (за В.П.Крамаренком), 25 мл витяжки 3 (за Стасом-Отто), 25 мл витяжки 4 (за О.В.Удаловим), 100 мл витяжки 5 (ізолювання хлороформом), 100 мл витяжки 6 (ізолювання хлороформом з наступною екстракційною очисткою) та 100 мл витяжки 7 (ізолювання хлороформом з попередньою очисткою біологічного матеріалу гексаном).

По 5, 10 та 100 мкл витяжок 1-4 та по 10, 20, 50 та 100 мкл витяжок 5-7 використовували для ідентифікації донормілу методом ТШХ.

Кількісне визначення донормілу проводили за УФ-спектрофотометричною та екстракційно-фотометричною методиками в 10 мл витяжок 1-4 та в 20 мл витяжок 5-7 до та після їх ТШХ-очистки.

Таблиця

Результати ізолювання донормілу з біологічного матеріалу (модельні суміші з печінкою) та їх метрологічні характеристики ( $n = 3$ ,  $\alpha = 0,95$ )

Метод ізолювання	Виділено донормілу, % (метод кількісного визначення)
За О.О.Васильєвою	71,24±5,66 (А) 74,88±3,44 (Б) 74,17±4,19 (В)
За В.П.Крамаренком	10,27±4,12 (А) 10,50±0,92 (Б) 10,83±1,79 (В)
За Стасом-Отто	60,87±3,92 (А) 64,88±2,82 (Б) 62,17±3,39 (В)
За О.В.Удаловим	61,24±5,12 (А) 65,81±3,42 (Б) 64,17±4,09 (В)
Метод ізолювання хлороформом	85,17±2,40 (А)
Метод ізолювання хлороформом (після екстракційної очистки)	73,58±3,12 (А)
Модифікований метод ізолювання хлороформом	83,02±2,15 (А) 81,37±3,41 (Б) 79,61±1,84 (В)

Примітки:

А — УФ-спектрофотометричний; Б — екстракційно-фотометричний; В — метод ВЕРХ після ТШХ-очистки.

Кількісне визначення донормілу методом ВЕРХ проводили в 10 мл витяжок 1-4 та в 20 мл витяжок 5-7 після їх очистки за методом ТШХ.

ТШХ-Очистку витяжок із біологічного матеріалу проводили як зазначено в роботі [5].

Ідентифікацію донормілу методом ТШХ проводили на хроматографічних пластинах "Sorbfil" (пластини попередньо обробляли 0,1 М розчином калію гідроксиду в метанолі, а потім висушували при 110°C протягом 30 хв) в системі розчинників хлороформ — метанол (90:10) у присутності "свідка" — донормілу за методикою, розробленою нами раніше [3]. За необхідності пластини попередньо елюювали у хлороформі з метою очистки від співекстрактивних речовин (за цих умов донорміл залишається на лінії старту, а співекстрактивні речовини мігрують до лінії фінішу). Для проявлення плям на пластинах використовували реактив Драгендорфа та пари йоду [11].

Крім того, ідентифікацію донормілу проводили методом реакційної ТШХ за наступною методикою: на лінії старту двох хроматографічних пластин "Sorbfil" наносили зазначену кількість отриманих витяжок. Після висушування проб при кімнатній температурі в ці ж точки вводили по 2 мкл розчину натрію гіпохлориту (0,5 г/л активного хлору) в 6% розчині натрію гідрокарбонату, плями висушували і елюювали пластини в системах розчинників хлороформ — метанол (9:1) і

гексан — діетиловий етер (2:1) відповідно. Після елюювання пластини висушували і обробляли 1% водним розчином *n*-амінодіетиланілінсульфату або 1% розчином калію йодиду у присутності 0,3% крохмалю [4].

**Кількісне визначення донормілу за УФ-спектрофотометричною методикою.** Зазначену кількість витяжок випаровували на водяній бані при температурі 80°C у присутності краплі кислоти хлористоводневої концентрованої до повного видалення органічного шару. Залишок розчиняли в 10,00 мл 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої. Оптичну густину отриманого розчину або відповідного елюату (при проведенні ТШХ-очистки) визначали при  $\lambda = 262$  нм та довжині кювети 10 мм. Концентрацію донормілу в розчині розраховували за допомогою градуювального графіка або за відповідним рівнянням лінійної залежності оптичної густини розчину від його концентрації [1].

**Кількісне визначення донормілу за екстракційно-фотометричною методикою.** Зазначену кількість витяжок випаровували на водяній бані при температурі 80°C у присутності краплі кислоти хлористоводневої концентрованої до повного видалення органічного шару. Залишок розчиняли в 10,00 мл 0,01 М розчину кислоти хлористоводневої. У ділильну лійку вносили 5,00 мл ацетатного буферного розчину з рН = 4,6, додавали 5,00 мл 0,02% розчину метилового оранжевого та 5,00 мл отриманого розчину або 5,00 мл відповідного елюату (при проведенні ТШХ-очистки), до отриманої суміші додавали 10,00 мл хлороформу. Суміш у ділильній лійці струшували протягом 5 хв за допомогою механічного струшувача і залишали на 10 хв для розділення шарів. Збирали 8,00 мл хлороформного шару, відкидаючи його перші та останні порції (близько 1,00 мл), і додавали до нього 2,00 мл 1% розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі. Одержану суміш ретельно перемішували та визначали її оптичну густину на фотоелектроколориметрі КФК-2 (довжина кювети 5 мм, світлофільтр з  $\lambda_{\text{сф}} = 540 \pm 10$  нм). Кількість донормілу в об'ємі розчину розраховували за допомогою градуювального графіка або за відповідним рівнянням лінійної залежності оптичної густини розчину від вмісту донормілу в пробі [1].

Методику кількісного визначення донормілу методом ВЕРХ наведено в літературі [2].

#### Результати та їх обговорення

Результати кількісного визначення донормілу у витяжках із біологічного матеріалу наведені в таблиці.

Для всіх витяжок із біологічного матеріалу в умовах проведення ідентифікації отримано позитивний результат. За допомогою запропонованих методик можна виявити до 0,2 мкг донормілу в пробі. Співекстрактивні речовини в умовах проведення ідентифікації не заважають виявленню донормілу в витяжках із біологічного матеріалу.

Слід підкреслити, що за методом В.П.Крамаренка донорміл із біологічного матеріалу практично не ізолюється. Методи О.О.Васильєвої, Стаса-Отто та О.В.Удалова дозволяють виділити достатньо велику кількість донормілу з біологічного матеріалу. Крім того, за цими методами ми отримуємо витяжки, що є практично звільненими від співекстрактивних речовин, які могли б заважати виявленню донормілу методом ТШХ. Кількісне визначення донормілу в цих витяжках можна проводити за УФ-спектрофотометричною та екстракційно-фотометричною методиками без додаткової ТШХ-очистки, оскільки поглинання в контрольних дослідах для цих випадків не перевищує 5% від поглинання у відповідних основних дослідах.

Найбільш експресним та зручним у виконанні методом ізолювання донормілу з біологічного матеріалу є, на наш погляд, модифікований метод ізолювання хлороформом. Метод дозволяє швидко виділити до 80% препарату. При цьому отримана витяжка звільнена від більшої кількості ліпофільних сполук, завдяки чому є більш зручною в роботі.

Пряме УФ-спектрофотометричне кількісне визначення донормілу в витяжках 5 та 7 є небажаним, оскільки для цих випадків поглинання в

контрольних дослідах сягає 20% від поглинання у відповідних основних дослідах.

Проведення кількісного визначення за методом ВЕРХ після ТШХ-очистки взагалі дозволяє виключити вплив співекстрактивних речовин на результати аналізу.

Запропонована методика ТШХ-очистки дозволяє виділити з пластини не менш як 90% препарату.

#### ВИСНОВКИ

1. Вивчено умови ізолювання донормілу з біологічного матеріалу на модельних сумішах з печінкою за допомогою модифікованих методів О.О.Васильєвої, Стаса-Отто та В.П.Крамаренка, а також методики, запропонованої О.В.Удаловим. З використаних методів найбільш ефективними є метод О.О.Васильєвої та модифікації методу Стаса-Отто, які дозволяють ізолювати 70% та 60% донормілу відповідно. За методом В.П.Крамаренка донорміл практично не ізолюється з біологічного матеріалу.

2. Запропоновано експресну методику ізолювання донормілу за допомогою хлороформу з попередньою очисткою біологічного матеріалу гексаном, що дозволяє виділити до 80% препарату.

3. Запропоновано методики ідентифікації донормілу в отриманих витяжках методами ТШХ та реакційної ТШХ.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Болотов В.В., Іванчук І.М. // Вісник фармації. — 2005. — №4 (44). — С. 16-19.
2. Болотов В.В., Іванчук І.М. // ЖОФХ. — 2006. — Т. 4, вип. 2 (14). — С. 74-77.
3. Болотов В.В., Клименко Л.Ю., Іванчук І.М. // Вісник фармації. — 2005. — №2 (42). — С. 7-11.
4. Болотов В.В., Клименко Л.Ю., Іванчук І.М. // ЖОФХ. — 2008. — Т. 6, вип. 2 (22). — С. 76-79.
5. Болотов В.В., Клименко Л.Ю. // Вісник фармації. — 2006. — №3 (47). — С. 26-30.
6. Крамаренко В.Ф. Токсикологическая химия. — К.: Вища школа, 1989. — 456 с.
7. Токсикологическая химия: Учеб. для вузов / Под ред. Т.В.Плетеневой. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. — 512 с.
8. Удалов А.В. // Лабораторный журн. — 2003. — №1 (3), июль. — С. 54-58.
9. Bayley M., Walsh F.M., Valaske M.J. // Clin. Pediatr. (Phila). — 1975. — May. — Vol. 14 (5). — P. 507-509, 514.
10. Bockholdt B., Klug E., Schneider V. // Forensic Sci. Int. — 2001. — Jun. 1. — Vol. 119 (1). — P. 138-140.
11. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals body fluids and postmortem material. — 2-nd ed. — London: The Pharm. Press, 1986. — 1200 p.
12. Haga S. // Tidsskr Nor Laegeforen. — 2003. — Feb. — Vol. 123 (4). — P. 473-474.
13. Jonsson A., Holmgren P., Ahlner J. // Forensic Sci. Int. — 2004. — Vol. 143. — P. 53-59.
14. Koppel C., Tenczer J., Ibe K. // Hum. Toxicol. — 1987. — Sep. — Vol. 37 (9). — P. 355-359.
15. Lahti R.A., Vuori E. // Forensic Sci. Int. — 2003. — Vol. 136. — P. 35-46.
16. Leybishkis B., Fasseas P., Ryan K.F. // Am. J. Med. Sci. — 2001. — Jul. — Vol. 322 (1). — P. 48-49.
17. Siek T.J., Dunn W. // J. Forensic Sci. — 1993. — May. — Vol. 38 (3). — P. 713-720.
18. Soto L.F., Miller C.H., Ognibere A.J. // Postgrad. Med. — 1993. — Jun. — Vol. 93 (8). — P. 227-229, 232.

УДК 543.42.062:535.24:615.214.24:547.821

ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДОВ ИЗОЛИРОВАНИЯ ДОНОРМИЛА ИЗ ОБЪЕКТОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

В.В.Болотов, И.М.Иванчук, Л.Ю.Клименко

Изучены условия изолирования донормила из биологического материала с помощью методов А.А.Васильевой, Стаса-Отто и В.Ф.Крамаренко, а также методики, предложенной А.В.Удаловым. Предложена экспрессная методика изолирования донормила хлороформом с предварительной очисткой биологического материала гексаном, которая позволяет выделить до 80% препарата. Предложены методики идентификации донормила в полученных извлечениях методом ТСХ.

UDC 543.42.062:535.24:615.214.24:547.821

THE STUDY OF DONORMIL ISOLATION METHODS FROM THE OBJECTS OF BIOLOGICAL ORIGIN

V.V.Bolotov, I.M.Ivanchuk, L.Yu.Klimenko

The conditions of donormil isolation from the biological material by the methods of A.A.Vasilyeva, Stas-Otto and V.F.Kramarenko, as well as the method suggested by A.V.Udalov have been studied. The express method of donormil isolation by chloroform with the preliminary purification of the biological material by hexane, which allows isolating up to 80% of medicine, has been suggested. The methods of donormil identification in the extracts obtained by the TLC have been suggested.