

Производство биологически активных веществ : учеб. пособие: в 2 ч. / Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев. – Х. : НТУ «ХПИ». – Ч. 1., 2013. – 304 с.

2. Машкина О. С. Генетическая инженерия и биобезопасность : учеб. пособие / О. С. Машкина, А. К. Буторина. – Воронеж : ВГУ, 2005. – 71 с.

3. Основы фармацевтической биотехнологии: учеб. пособие / Т. П. Прищеп, В. С. Чучалин, К. Л. Зайков и др. – Ростов н/Д. : Феникс, 2006. – 256 с.

4. Технологія пробіотиків : підруч. / С. О. Старовойтова, О. І. Скроцька, Ю. М. Пенчук, Т. П. Пирог – К. : НУХТ, 2012. – 96 с.

5. Modern direction in chemistry, biology, pharmacy and biotechnology: monograph / editor in chief V. Novikov. – Lviv: Lviv Polytechnic, 2015. – 256 p.

УДК 543: 615.22.224:54.61/062/001.08

## АНАЛІТИЧНА ДІАГНОСТИКА ГОСТРИХ ОТРУЄНЬ ФЕНІГІДИНОМ

*Погосян О.Г.*

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

**Вступ.** Для лікування серцево-судинних захворювань широке застосування знаходять антагоністи іонів кальцію, зокрема фенігідин (ніфедипін). Передозування фенігідином неодноразово призводило до гострих отруєнь [3]. При цьому аналітична діагностика гострих отруєнь лікарськими речовинами становить значні труднощі та передбачає експресне виявлення токсичної екзогенної речовини в біологічних середовищах організму людини (крові, сечі).

Фенігідин (ніфедипін, корінфар) – диметиловий етер (2,6-диметил-4-(2'-нітрофеніл)-1,4-дигідропіридин – 3,5-дикарбонової кислоти – антиангінальний препарат, який широко використовується при лікуванні серцево-судинної патології. Фенігідин відноситься до списку Б (LD<sub>50</sub> при пероральному введенні мишам становить 590 мг/кг) [1, 2], тому він може бути причиною гострих або смертельних отруєнь [3, 5]. Особливо обережного підходу потребує призначення фенігідину разом з β-адреноблокаторами, оскільки відомі випадки розвитку тяжкої гіпотензії та серцевої недостатності на фоні комбінованої терапії [2, 3]. Оскільки клінічна картина отруєнь фенігідином нехарактерна, то хіміко-токсикологічні дослідження біологічних рідин (крові та сечі) мають особливе значення для встановлення клінічного діагнозу отруєння.

Тому розробка методів судово-хімічного аналізу фенігідину в біологічних рідинах є актуальною задачею.

**Мета дослідження.** Метою наших досліджень була розробка методики виділення фенігідину з крові та сечі методом рідинно-рідинної екстракції з подальшим виявленням та кількісним визначенням препарату в отриманих екстрактах за допомогою широко впроваджених в практику хіміко-токсикологічного аналізу методів [1, 4]: хімічного, тонкошарової хроматографії (ТШХ), УФ-спектрофотометрії.

**Методи дослідження. Методика ізолювання фенігідину з сечі.** До 50 мл сечі додавали 1 мл етанольного розчину фенігідину, що містить від 200 до 1000 мкг препарату, та залишали на добу. До 50 мл модельної суміші додавали 10%

розчин кислоти хлоридної до рН 5 або 25% розчин амоній гідроксиду до рН 9. Після цього суміш двічі екстрагували хлороформом по 20 мл. Емульсією, що утворювалася, руйнували центрифугуванням на протязі 15 хв зі швидкістю 3000 об/хв. Центрифугат фільтрували крізь паперовий фільтр з 1 г безводного натрій сульфату, попередньо змочений хлороформом. Фільтрат кількісно переносили в мірну колбу місткістю 50 мл і доводили об'єм хлороформом до мітки. Раніше нами було встановлено, що одержана таким чином хлороформна витяжка не потребує додаткового хроматографічного очищення. Для одержання розчинів порівняння використовували «холості» досліди. Слід відзначити, що оптична густина, одержана в цих дослідах, не перевищувала 0,02-0,05. В одержаних хлороформних витяжках фенігідін виявляли методами ТШХ, УФ-спектроскопії, реакціями забарвлення. Кількісне визначення фенігідину в одержаній витяжці виконували фотоелектроколориметричним методом.

**Методика ізолювання фенігідину з крові.** До 10 мл донорської крові додавали 1 мл етанольного розчину препарату, який містив від 500 до 2000 мкг фенігідину, перемішували та залишали на добу при кімнатній температурі, а потім виділяли фенігідін за такою методикою. До 10 мл модельної суміші фенігідину з кров'ю додавали 10 мл 10% розчину кислоти трихлорацетатної та перемішували. Потім суміш переносили в центрифужну склянку та центрифугували на протязі 15 хв зі швидкістю 3000-4000 об/хв. Центрифугат підлюговували 50% розчином натрій гідроксиду до рН 8-9 і двічі екстрагували хлороформом по 15 мл. Хлороформний шар відділяли, одержані екстракти фільтрували крізь паперовий фільтр з 1 г безводного натрій сульфату в мірну колбу місткістю 50 мл і доводили хлороформом до позначки.

Одержану хлороформну витяжку використовували для виявлення фенігідину за допомогою кольорових реакцій, методу ТШХ та УФ-спектрофотометрії. Хлороформну витяжку, одержану з іншої проби крові (10 мл) використовували для кількісного визначення фенігідину фотоелектроколориметричним методом.

Вміст фенігідину в 10 мл досліджуваної крові (X, мкг) розраховували за формулою:

$$X = \frac{C \cdot V_0}{V_1},$$

де С – вміст фенігідину у взятій для аналізу частині хлороформної витяжки, знайдений за градувальним графіком, мкг;

$V_0$  – об'єм хлороформної витяжки з крові, мл;

$V_1$  – об'єм частини хлороформної витяжки, взятої для аналізу, мл.

Виявлення фенігідину в екстрактах методом ТШХ проводили з використанням хроматографічних пластинок Sorbfil (силікагель СТХ-1 ВЕ, тип підложки – ПЕТФ, зв'язуюча речовина – силіказоль, фракція – 8 ÷ 12 мкм, товщина шару – 100 мкм, розмір пластинок 10 x 10 см). Для виявлення фенігідину 2,5 мл очищених «кислих» та «лужних» хлороформних витяжок випаровували до мінімального об'єму (0,05 мл) і наносили в одну точку на лінію старту хроматографічної пластинки. На відстані 2 см наносили розчин «свідка» (0,5% розчин фенігідину в хлороформі) в кількості 5 мкл (25 мкг). У

третю точку наносили 0,05 мл хлороформної витяжки, одержаної у «холостому» досліді. Хроматограми розвивали в двох системах розчинників: хлороформ-гексан-етанол (1:7:1) (1) та толуен-ацетон-хлороформ-і-пропанол (30:15:5:1) (2). Після цього пластинки висушували на повітрі і проявляли за допомогою УФ-проміння. При цьому на пластинках спостерігали флюоресцюючі плями співекстрактивних речовин блакитного кольору, які за значенням величини  $R_f$  не співпадали з плямами стандартного розчину фенігідину при проявленні реактивом Драгендорфа у модифікації за Мун'є. При проявленні останнім на хроматограмі на рівні плями «свідка» спостерігали інтенсивно забарвлені в жовтогарячий колір плями фенігідину з «кислої» та «лужної» витяжок з  $R_f$   $0,57 \pm 0,02$  та  $R_f$   $0,60 \pm 0,02$  (відповідно для першої та другої систем розчинників).

При виявленні фенігідину у витяжках використовували кольорові реакції з натрій періодатом в концентрованій кислоті сульфатній (оранжево – червоне забарвлення, чутливість 2 мкг в пробі) та калій персульфатом в концентрованій кислоті сульфатній (коричневе забарвлення, чутливість 5 мкг в пробі). Проведені паралельно кольорові реакції з витяжками, одержаними в «холостих» дослідях, показали, що співекстрактивні речовини не дають зазначених реакцій.

Підтвердження присутності фенігідину в екстрактах проводили також УФ-спектрофотометричним методом. Для цього елюювали фенігідін з непроявленої полоси хроматограми на рівні, що відповідав місцю знаходження плями «свідка» фенігідину, метанолом, елюат фільтрували через паперовий фільтр та випаровували. Попередньо нами було встановлено, що ступінь елюювання фенігідину з шару сорбенту метанолом складав 99,2%. Отриманий залишок розчиняли в 5 мл 0,1М розчину кислоти хлоридної. Оптичну густину визначали на спектрофотометрі СФ-46 при  $\lambda_{\max} = 236$  нм, кювета з товщиною шару рідини 10 мм. УФ-спектр одержаного розчину був аналогічним спектру розчину фенігідину – стандарту в 0,1М розчині кислоти хлоридної та мав смугу поглинання при  $\lambda_{\max} = 236$  нм  $\pm 2$  нм.

Кількісний вміст фенігідину в елюатах з хроматограми визначали УФ-спектрофотометричним методом за допомогою попередньо встановленого рівняння градуовального графіка:  $y=0,0132x$ . Світлопоглинання розчинів підлягало закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 10 до 100 мкг/мл. Як розчин порівняння застосовували розчин, отриманий у «холостому» досліді.

**Основні результати.** Ізолювання фенігідину з біологічних рідин доцільно проводити хлороформом з лужного середовища при рН 8-9. Попередньо проведене вивчення умов екстракції фенігідину з водних розчинів у залежності від рН середовища та природи органічного розчинника показало, що в найбільшій мірі зазначена речовина екстрагується хлороформом при зміні рН середовища від 2 до 12 (ступінь екстракції складала від 82 до 96%, для діетилового етеру ступінь екстракції при вказаному значенні рН не перевищувала 78%).

В ході розробки методик виділення фенігідину з сечі та крові було



встановлено, що одержана хлороформна витяжка не потребує додаткової хроматографічної очистки.

Застосовані нами кольорові реакції, методи ТІХ та УФ-спектрофотометрії виявилися досить чутливими для виявлення досліджуваних нами меж концентрацій фенігідину в біологічних рідинах.

Результати кількісного визначення фенігідину, виділеного з крові, а також з підкисленої та підлуженої сечі, наведені в табл. 1-2. Як видно, за допомогою запропонованої методики рідинно-рідинної екстракції з лужного середовища (рН 8-9) з крові можливо виділити  $55 \pm 5,2\%$  фенігідину, з підкисленої сечі  $64,2 \pm 3,3\%$ , з підлуженої сечі –  $75 \pm 2,5\%$  препарату.

Таблиця 1

Результати кількісного визначення фенігідину, виділеного з крові, УФ-спектрофотометричним методом (середнє з п'яти визначень)

Додано фенігідину до 10 мл крові, мкг	Виділено фенігідину		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
500	275	55,0	$\bar{X} = 54,84$
700	350	50,0	$S = 4,01$
1000	525	52,5	$S_{\bar{x}} = 1,79$
1500	850	56,0	$\Delta\bar{X} = 4,96 \quad \varepsilon = 9,04$
2000	1350	60,7	$\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 54,84 \pm 4,9$

Таблиця 2

Результати кількісного визначення фенігідину, виділеного з підкисленої та підлуженої сечі, УФ-спектрофотометричним методом (середнє з п'яти визначень)

Додано фенігідину до 50 мл сечі, мкг	Виділено фенігідину з підкисленої сечі		Метрологічні характеристики	Виділено фенігідину з підлуженої сечі		Метрологічні характеристики
	мкг	%		мкг	%	
200	135	67,5	$\bar{X} = 66,16$	145	72,5	$\bar{X} = 74,32$
300	200	66,6	$S = 1,49$	215	71,6	$S = 2,33$
500	337,5	67,5	$S_{\bar{x}} = 0,66$	375	75,0	$S_{\bar{x}} = 1,04$
700	450	64,2	$\Delta\bar{X} = 1,83$ $\varepsilon = 2,76$	525	75,0	$\Delta\bar{X} = 2,88$ $\varepsilon = 3,87$
1000	650	65,0	$\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 66,16 \pm 1,83$	775	77,5	$\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 74,32 \pm 2,88$

**Висновки.** Розроблені ефективні методики рідинно-рідинної екстракції фенігідину з біологічних рідин хлороформом з лужного середовища (рН 8-9), що дозволяють виділити з крові  $55 \pm 5,2\%$ , з підкисленої сечі –  $64,2 \pm 3,3\%$  та з підлуженої сечі –  $75 \pm 2,5\%$  фенігідину.

Доведена можливість використання кольорових реакцій, методу ТІХ, УФ-спектрофотометрії для виявлення та кількісного визначення фенігідину в одержаних біологічних екстрактах.

### Список літератури

1. Косов, Ю. Г. // Идентификация нифедипина физико-химическими методами / Ю. Г. Косов// Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр./ Пятигорск, 2005. – Вып. 60. – С. 241 – 242.
2. Машковский, М.Д. Лекарственные средства: 15-е изд. – М.: ООО «Издательство Новая Волна», 2006. – С. 429 – 430.
3. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов: учебное пособие для вузов / Под ред. Н.И. Калетиной. – М.: ГОЭТАР-Медиа, 2008. – 1016 с.
4. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material: 4-th edition / A. C. Moffat; M.D. Osselton; B. Widdop [et al.]. – London, Chicago: Pharmaceutical Press, 2011. – 2736 p.
5. Raemch, K.D. Pharmacokinetics and metabolism of nifedipin / K. D. Raemch, J. Sommer // Hypertension. – 1983. – vol. 5. – P. 1118 – 1124.

УДК 541.183:577.15/17

### ВИБІР УМОВ ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ФЕНІГІДИНУ МЕТОДОМ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ ІМПУЛЬСНОЇ ПОЛЯРОГРАФІЇ

*Погосян О.Г.*

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

**Вступ.** Серцево-судинні захворювання посідають перше місце серед інших форм патології. Для лікування нападів стенокардії використовується досить широкий арсенал засобів, що мають антиангінальну дію. Зокрема до них відносяться антагоністи кальцію, які є ефективними для лікування стенокардії і артеріальної гіпертонії, серед яких одним з широко застосовуваних є фенігідин. Фенігідин (ніфедипін, корінфар)–2,6-диметил-4-(2-нітрофеніл)-1,4-дигідропіридин-3,5-дикарбонової кислоти диметиловий етер, відноситься до препаратів списку Б і в літературі описані випадки отруєння цим препаратом [1, 3].

Судово-медична діагностика інтоксикацій антиангінальними препаратами складає важку задачу. Це пояснюється тим, що обставини отруєння часто невідомі, а клінічне виявлення його досить неспецифічне. Крім того, препарати цієї групи в організмі не викликають суттєвих органічних перетворень з характерними морфологічними змінами.

Тому розробка методів судово-хімічного аналізу фенігідину, які до теперішнього часу недостатньо розроблені, є актуальним завданням і виявляються основним засобом підтвердження отруєння антиангінальними препаратами.

**Мета дослідження.** Вивчити та обґрунтувати умови для кількісного визначення фенігідину методом диференційної імпульсної полярографії. Для цього провести вибір розчинника, буферних систем та іонної сили розчинів для полярографування, а також розробити умови полярографування розчинів для проведення кількісного визначення фенігідину.