

УДК 615.256.4:547.816.3 :340.627

Л.І.Осипчук, І.Й.Галькевич

## МЕТОДИ ВИДІЛЕННЯ СИЛДЕНАФІЛУ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького,  
м. Львів, Україна

e-mail: galkirin@meduniv.lviv.ua

**Резюме:** Вивчена залежність ступеня ізолювання силденафілу із тканин печінки різними розчинниками. Встановлено, що сумішшю ацетонітрилу з перхлоратною кислотою ізолюється 45-48% силденафілу. Для кількісного визначення силденафілу у екстрактах із тканини печінки опрацьовані фотоколориметричні та спектрофотометричні методики. Для експрес-виявлення силденафілу методом тонкошарової хроматографії запропоновано склад двох систем розчинників.

**Ключові слова:** силденафіл, методи виділення, фотоколориметрія, УФ-спектрофотометрія.

**Вступ.** Силденафіл є представником класу інгібіторів фосфодіестерази 5-го типу (ФДЕ–5), який у хімічному відношенні являє собою цитрат 1-[[3-(6,7-дигідро-1-метил-7-оксо-3-пропіл-1-н-піразоло[4,3- $\alpha$ ]піримідин-5-іл)-4-етоксибеніл]сульфоніл]піперазину}.

Даний лікарський засіб (ЛЗ) використовується для лікування еректильної дисфункції<sup>1,3,6</sup>. Наявність цієї патології також може свідчити про захворювання серцево-судинної системи, які вимагають прийому ЛЗ групи органічних нітратів. Органічні нітрати, такі як нітрогліцерин, ізосорбиду динітрат, ізосорбиду мононітрат та інші є донорами NO і підвищують продукцію цГМФ, а інгібітори ФДЕ–5 запобігають розпаду цГМФ то при сумісному прийманні обох ЛЗ можливе підвищення рівня цГМФ, достатне для розвитку істотної гіпотензії у деяких пацієнтів, що часто супроводжується негативними, а інколи і летальними наслідками<sup>7,8,9</sup>. Не зважаючи на це, у проаналізованих джерелах літератури, приділяється незначна увага хіміко-токсикологічному дослідженню силденафілу.

**Мета дослідження** – розробка надійних, репродуктивних та експресних методик виділення силденафілу із об'єктів біологічного походження.

**Матеріали та методи дослідження.** Ми вивчали ефективність методик виділення силденафілу з біологічного матеріалу загальноприйнятими у хіміко-токсикологічному аналізі методами: *О.О. Васильєвої* (ізолювання водою, підкисленою оксалатною кислотою), *Стаса-Отто* (ізолювання спиртом, підкисленим оксалатною кислотою), *В.П. Крамаренка* (ізолювання водою, підкис-

леною сульфатною кислотою)<sup>2</sup>, а також розробили експресний та ефективний метод ізолювання силденафілу сумішшю ацетонітрилу та 70% перхлоратної кислоти (1:1), шляхом дворазового настоювання протягом 1 год.

Для виділення силденафілу традиційними методами нами була проведена незначна їх модифікація, яка полягала у зменшенні наважок біологічного матеріалу до 20 г з відповідним зменшенням об'ємів органічних розчинників, а також заміни процесів проціджування через марлю та фільтрування на центрифугування.

Щоб розробити оптимальні умови виділення силденафілу ми використовували модельні суміші печінки трупа людини, яка загинула від травми в наслідок автомобільної катастрофи. Для досліджень брали 20 г подрібненої печінки. В кожну порцію біологічного матеріалу вносили по 500 мкг силденафілу у вигляді розчину, ретельно перемішували і залишали на 24 год. Паралельно ставили контрольні проби.

Методика виділення силденафілу з біологічного матеріалу сумішшю ацетонітрилу та 70% перхлоратної кислоти (1:1): 20 г подрібненої печінки, що містить силденафіл, заливали 10 мл суміші ацетонітрилу та 70% перхлоратної кислоти (1:1) і настоювали протягом 1 год. при перемішуванні. Після цього витяжку зливали, а біологічний матеріал ще раз настоювали сумішшю ацетонітрилу з 70% перхлоратною кислотою (1:1) протягом 1 год. Витяжки об'єднували і центрифугували 15 хв. зі швидкістю 5000 об/хв. Центрифугати переносили в ділительні лійки та доводили 30% розчином натрію гідроксиду до рН 8 (за

універсальним індикатором). Екстракцію силденафілу проводили двічі 1,2-дихлоретаном (порціями по 10 мл). Органічний розчинник відганяли до суха, а сухий залишок розчиняли в метанолі. У попередніх дослідженнях ми встановили, що силденафіл найкраще екстрагується 1,2-дихлоретаном при рН 6-8<sup>5</sup>.

Для виявлення силденафілу у витяжках з біологічного матеріалу використовували метод хроматографії в тонких шарах сорбенту на пластинках «*Sorbfil*» (силікагель СТХ-1А, тип підкладки ПЕТФ, розмір пластинок 10x10 см) та УФ-спектрофотометрію.

На лінію старту хроматографічної пластинки наносили проби: стандартний розчин силденафілу, метанольний розчин одержаний з витяжки біологічного матеріалу з ЛЗ та метанольний розчин витяжки з біоматеріалу, отриманої в контрольному досліді.

Хроматографування проводили в 2-ох підтверджуючих системах розчинників: етилацетат-ацетон-діетиламін (15:10:1) (система 1) та хлороформ-ацетон-діетиламін (6:5:1) (система 2). Фронт системи розчинників становив 8 см. Після хроматографування плями досліджуваної речовини проявляли опромінюючи пластинку УФ-світлом (при цьому спостерігали фіолетово-голубу флюоресценцію, характерну для силденафілу), з наступною їх обробкою реактивом *Драгендорфа*<sup>4</sup>.

Кількісне визначення виділеного силденафілу проводили методом УФ-спектрофотометрії та екстракційно-фотометричним методом<sup>5</sup>. Для перевірки достовірності результатів ізолювання запропонованими методами в модельні проби печінки, масою по 20 г вносилися різні кількості ЛЗ.

УФ-спектрофотометричне визначення силденафілу: 5 мл дихлоретанової витяжки, отриманої одним із вказаних методів ізолювання, поміщали у чашку, органічний розчинник випаровували на водяному огрівнику (40°C), сухий залишок розчиняли в 5 мл метанолу.

Оптичну густину виміряли на спектрофотометрі СФ-56 при довжині хвилі 292 нм (кювета 10 мм). Питомий показник поглинання метанольного розчину силденафілу при цій довжині хвилі становить 271,69±3,92.

Паралельно проводили визначення силденафілу в досліджуваних розчинах за допомогою методу екстракційної фотометрії, який ґрунтується на утворенні іонного асоціату з бромкрезоловим зеленим при рН 4,5<sup>5</sup>.

Екстракційно-фотометричне визначення силденафілу: 5 мл дихлоретанової витяжки, отриманої одним із вказаних методів ізолю-

вання, поміщали у чашку та випаровували на водяному огрівнику (40°C). Сухий залишок змивали 10 мл хлороформу і переносили його в ділительну лійку об'ємом 50 мл, додавали по 0,5 мл 0,2% розчину бромкрезолового зеленого і по 9,5 мл універсального буферного розчину з рН 4,5. Суміш в ділительній лійці збовтували 1 хв., шар хлороформу відокремлювали, а водну фазу повторно збовтували з 5 мл хлороформу. Хлороформові витяжки об'єднували і збовтували 1 хв. з 10 мл 0,1 М розчину гідроксиду натрію. Лужну водну витяжку відділяли, а хлороформову фазу ще раз збовтували з 5 мл розчину натрію гідроксиду. Лужні витяжки об'єднували і при необхідності доводили розчином натрію гідроксиду до 15 мл.

Оптичну густину забарвлених у синій колір водних розчинів вимірювали з допомогою фотоелектроколориметра КФК-2МП (кювета з товщиною поглинаючого шару 20 мм,  $\lambda_{\text{ef}}$  597±10 нм). Вимірювання проводили відносно розчину порівняння.

Кількісний вміст виділеного з біологічного матеріалу силденафілу визначали за градувальним графіком, для побудови якого використовували розчин стандартного зразку силденафілу.

**Результати дослідження та їх обговорення.** При ТШХ аналізі в системі 1 значення  $R_f$  силденафілу становить 0,47-0,48, а в системі 2 – 0,60-0,61. Межа виявлення силденафілу на хроматографічних пластинках при проявці УФ-світлом 15 мкг в пробі, а реактивом *Драгендорфа* – 1 мкг в пробі.

Забарвлені розчини силденафілу підпорядковуються основному закону світлопоглинання в межах концентрацій від 8 до 120 мкг ЛЗ в пробі. Межа визначення складає 8 мкг в 15 мл кінцевого об'єму.

Результати ізолювання силденафілу із біологічного матеріалу з використанням різних методик наведені в таблицях 1-2. Зокрема, водою, підкисленою оксалатною кислотою, ізолюється 25-28% силденафілу. Деяко вищі результати виділення отримано при ізолюванні підкисленим спиртом та водою, підкисленою розчином сульфатної кислоти (33-36% та 34-38% відповідно). При ізолюванні сумішню ацетонітрилу та 70% перхлоратної кислоти (1:1) з біологічного матеріалу можна виділити 45-48% препарату (табл. 2).

Відносна похибка екстракційно-фотоколориметричного визначення силденафілу в екстрактах складає ±3,0%, а методом УФ-спектроскопії ±3,8%. Всі результати досліджень є надійними, оскільки вкладаються в границі довірчого інтервалу.

Таблиця 1. Результати ізолювання силденафілу із біологічного матеріалу різними методами

Метод виділення	Внесено силденафілу, мкг	Виділено силденафілу		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
О.О.Васильєвої	500	125,0	25,0	$\bar{X} = 26,79$
	500	141,5	28,3	$S = 1,21$
	500	132,15	26,43	$S_x = 0,54$
	500	135,0	27,0	$\bar{X} \pm \Delta X = 26,79 \pm 1,5$
	500	136,0	27,2	$\varepsilon = \pm 5,6 \%$
В.П. Крамаренка	500	191,5	38,3	$\bar{X} = 36,98$
	500	190,0	38,0	$S = 1,41$
	500	174,5	34,9	$S_x = 0,63$
	500	187,5	37,5	$\bar{X} \pm \Delta X = 36,98 \pm 1,75$
	500	181,0	36,2	$\varepsilon = \pm 4,73 \%$
Стаса-Отто	500	165,0	33,0	$\bar{X} = 34,39$
	500	172,5	34,5	$S = 1,33$
	500	180,0	36,0	$S_x = 0,59$
	500	165,6	33,12	$\bar{X} \pm \Delta X = 34,39 \pm 1,65$
	500	176,65	35,33	$\varepsilon = \pm 4,8 \%$

Таблиця 2. Результати кількісного визначення силденафілу, виділеного з біологічного матеріалу сумішшю ацетонітрилу та 70% перхлоратної кислоти (1:1)

Внесено силденафілу до 20 г печінки	Визначено методом УФ-спектрофотометрії		Метрологічні характеристики	Визначено екстракційною фотометрією		Метрологічні характеристики
	мкг	%		мкг	%	
100	48,04	48,04	$\bar{X} = 47,21\%$	48,0	48,0	$\bar{X} = 46,5\%$
200	97,2	48,60	$S = 1,46$	90,0	45,0	$S = 1,12$
300	135,0	45,0	$S_x = 0,65$	138,0	46,0	$S_x = 0,5$
400	186,0	46,49	$\bar{X} \pm \Delta X = 47,21 \pm 1,81$	186,0	46,5	$\bar{X} \pm \Delta X = 46,68 \pm 1,39$
500	239,7	47,94	$\varepsilon = \pm 3,8\%$	235,0	47,0	$\varepsilon = \pm 3,0\%$

**Висновки:**

1. Вивчена залежність ступеня ізолювання силденафілу із тканини печінки різними розчинниками. Встановлено, що сумішшю ацетонітрилу та 70% перхлоратної кислоти (1:1) із біологічної проби ізолюється 45-48% силденафілу.
2. Для експрес-виявлення силденафілу методом ТПХ запропоновано дві системи розчинників: етилацетат-ацетон-диетиламін (15:10:1) і хлороформ-ацетон-диетиламін (6:5:1).
3. Для кількісного визначення силденафілу запропоновано використовувати екстракційно-фотоколориметричний метод на основі реакції з бромкрезоловим зеленим та метод УФ-спектрометрії.

**Література:**

1. Каневский А.С. Варденафил: селективный ингибитор фосфодиэстеразы-5 для лечения эректильной дисфункции / А.С. Каневський, Б.Т. Никула // Здоров'я України. – 2007. – №23. – С.51-52.
2. Крамаренко В.П. Токсикологічна хімія / В.П. Крамаренко. – К.: Вища шк., 1995. – С. 158-183.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковський. – М.: Новая волна, 2006. – 1206 с.
4. Осипчук Л.І. Експрес-методи ідентифікації силденафілу в судово-хімічній практиці / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич, А.С. Кузьмицька // Актуальні проблеми профілактичної медицини. Збірник наукових праць. Випуск дев'ятий. – Львів. – 2011. – С. 143-146.
5. Осипчук Л.І. Вивчення умов екстракції силденафілу органічними розчинниками / Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич // Фармацевтичний журнал. – 2008. – №1. – С.83-87.
6. Efficacy and safety of vardenafil in patients with erectile dysfunction. Results of the Mexican

- 
- Multicentric Study / M. Sotomayorde-Zavaleta, E. Rubio-Aurioles, G. Feria-Bernal [et al] // Rev. Invest. Clin. – 2004. – V.56. – №5. – P. 572-579.
7. Hellstrom W.J. Current safety and tolerability goes out in men with the capable straightened dysfunction, receptive coolants of arbiter PDE-5 / W.J. Hellstrom // Int. J. Clin. Pract. – 2007. – V.61. – №9. – P. 1547-1554.
8. Reffelmann T. Cardiovascular effects of phosphodiesterase 5 inhibitors / T. Reffelmann, R.A. Kloner // Curr. Pharm. Des. – 2006. – V.12, №27. – P. 3485-3494.
9. Sildenafil and vardenafil but not nitroglycerin limit myocardial infarction through opening of mitochondrial K(ATP) channels when administered at reperfusion following ischemia in rabbits / F.N. Salloum, Y. Takenoshita, R.A. Ockaili [et al] // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2007. – V.42. – №2. – P. 453-458.
- 

УДК 615.256.4:547.816.3 :340.627

#### МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ СИЛДЕНАФИЛА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Л.И. Осипчук, И.И. Галькевич

Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, г. Львов, Украина

**Резюме:** Изучена зависимость степени изолирования sildenafil из ткани печени различными растворителями. Установлено, что смесью ацетонитрила с перхлоратной кислотой изолируется 45-48% sildenafil. Для количественного определения sildenafil в экстрактах из ткани печени разработаны фотоколориметрические и спектрофотометрические методики. Для экспресс-идентификации sildenafil методом хроматографии в тонком слое сорбента предложено состав двух систем растворителей.

**Ключевые слова:** sildenafil, методы выделения, фотоколориметрия, УФ-спектрофотометрия.

---

UDC 615.256.4:547.816.3 :340.627

#### METHODS OF SILDENAFIL ISOLATION FROM BIOLOGICAL MATERIAL

L.I. Osypchuk, I.J. Halkevych

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

**Summary:** dependence of sildenafil isolation efficiency from liver on different solvents is studied. Is established that acetonitrile with perchlorate acid mixture isolates 45-48% of sildenafil. Photocolorimetric and UV-spectrophotometric techniques are elaborated for sildenafil quantification in extracts from liver tissue. Two liquid systems for thin-layer chromatographic identification of sildenafil are proposed.

**Keywords:** sildenafil, isolation, biological tissue, photocolorimetry, UV-spectrophotometry.

---

Надійшла до редакції 23.12.2013 р.