Синтез і аналіз біологічно активних сполук та лікарських засобів

УДК 615.256.4:547.816.3]:340.627

Л.І. Осипчук, І.Й. Галькевич

ВИБІР РЕАГЕНТА-ОСАДЖУВАЧА ПРИ ІЗОЛЮВАННІ СИЛДЕНАФІЛУ З КРОВІ МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ

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

e-mail: *galkirin@meduniv.lviv.ua*

Резюме: Розроблено умови кількісного визначення силденафілу в крові методом газової хроматографії – мас-спектрометрії. Для очистки біологічної проби застосовано осадження білкової фракції та метод твердофазної екстракції. Вивчено залежність результатів кількісного визначення силденафілу в крові після очистки методом твердофазної екстракції в залежності від природи депротеїнізатора. Оптимальним реагентом для депротеїнізації при ізолюванні силденафілу з крові методом твердофазної екстракції є 10% розчин $ZnSO_4$., ізолюється до 60,2% засобу.

Ключові слова: силденафіл, кров, твердофазна екстракція, осадження білків, газова хроматографія – мас-спектрометрія.

Вступ. Лікарські засоби (ЛЗ) із групи інгібіторів фосфодіестерази 5-го типу найчастіше призначаються для лікування еректильної дисфункції. Одним із представників цього класу є силденафіл[2,3,8]. Даний ЛЗ відпускається без рецепта, у зв'язку з чим не всі особи, що застосовують його, поінформовані про токсичні та побічні ефекти, які виникають при одночасному прийманні з органічними нітратами[4,5,6]. Смертельні випадки, що описані в літературі, в більшості випадків зумовлені таким поєднанням[6,7].

При наданні невідкладної допомоги потрібно провести швидке підтвердження наявності силденафілу у біологічних рідинах, зокрема крові. Результати дослідження значною мірою залежать від методу очистки біологічної проби, оскільки після однократного приймання силденафілу (25-100 мг) його концентрація в крові коливається в межах 7-440 нг/мл. Розробка методів виділення силденафілу з біологічних рідин організму, зокрема крові, при таких отруєннях є актуальним завданням.

Виявленню та кількісному визначенню силденафілу в крові присвячено ряд робіт. В опрацьованій нами літературі для концентрування силденафілу, в основному, застосовано рідинну та твердофазну екстракцію. При цьому результати кількісного визначення значно відрізняються за межею визначення та виявлення[9,10].

Оскільки природа реагента-осаджувача впливає на кількість виділеного ЛЗ, нами вивчено залежність результатів кількісного визначення силденафілу в крові після очистки методом твердофазної екстракції в залежності від природи депротеїнізатора.

Мета дослідження – вивчення залежності результатів визначення кількісного вмісту силденафілу в крові після очистки методом твердофазної екстракції від природи депротеїнізатора.

Матеріали та методи дослідження. Органічні розчинники, які використовували для виготовлення розчинів та екстракції твердою фазою відповідали кваліфікації «х.ч.» чи «ч.д.а.». Для виготовлення серії стандартних розчинів препарату (1 мг/мл) використовували силденафілу цитрат (*Sigma*, США). Для побудови градуювального графіку готували серію метанольних розчинів із вмістом 0,007, 0,015, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 мкг/мл.

Кількісне визначення силденафілу в пробах проводили методом газової хроматографії. В аналізі використовували газовий хроматограф *Agilent 6890 N* з мас-селективним детектором (серія 5978 B). Використовували режим позитивної іонізації при вольтажі 70 В, а сканування проводилося в діапазоні від 30-550 атомних одиниць маси (m/z). Розділення проводили на капілярній колонці HP-1 (*Methyl Siloxane*) довжиною 30 м, внутрішнім діаметром 0,25 мм і товщиною плівки нерухомої

фази 0,25 мкм. Початкова температура колонки 70°С, витримка 0,75 хв., з подальшим підвищенням температури до 320°С зі швидкістю 70°С/хв. і витримкою кінцевої температури протягом 10,0 хв.

Застосовували режим постійного потоку газу-носія (гелій 1,1 мл/хв.). Об'єм введеної проби 1 мкл.

Для вивчення впливу природи депротеїнізатора на ступінь ізолювання силденафілу застосовували модельні суміші, що містили по 1 мл крові з різним вмістом силденафілу (від 0,1 до 0,5 мкг). Цільну кров отримували у Львівській обласній станції переливання крові.

Для депротеїнізації використовували ацетонітрил, 96% етанол, водні розчини 10% цинку сульфату та 20% сульфосаліцилової кислоти, насичені розчини оксалатної та фосфорновольфрамової кислот, амонію сульфат кристалічний[1].

Очистку проб крові після осадження білкових компонентів проводили методом твердофазної екстракції на картриджах *Oasis HLB* (30 mg *Waters*, USA).

Підготовка проб крові для проведення твердофазної екстракції:

В 1 мл крові вносили по 0,5 мкг силденафілу (водний розчин) і по 1 мл універсального буферного розчину (pH=7,4). Проби гомогенізували, після чого поступали наступним чином:

- проба 1: до гомогенізату вносили 0,2 мл 96% етанолу та 1 мл ацетонітрилу;
- проба 2: до гомогенізату вносили 0,2 мл 96% етанолу та 0,3 мл 20% розчину сульфосаліцилової кислоти;
- проба 3: до гомогенізату вносили 0,4 мл 96% етанолу та 0,2 мл 10% розчину цинку сульфату;
- проба 4: до гомогенізату вносили 1,0 мл 96% етанолу;
- проба 5: до гомогенізату вносили 0,2 мл 96% етанолу та 0,3 мл насиченого розчину фосфорно-вольфрамової кислоти;
- проба 6: до гомогенізату вносили 0,2 мл 96% етанолу, 0,2 мл насиченого розчину оксалатної кислоти та 10 мг кристалічного амонію сульфату.

У всіх пробах отриманий осад відокремлювали центрифугуванням (15 хв. при 10000 об/хв).

Отримані надосадові рідини кількісно пропускали через катридж для твердофазної екстракції.

Схема проведення твердофазної екстракції:

1. кондиціонування сорбенту 1 мл 96% етанолу та 1 мл води дистильованої;
2. завантаження зразка;
3. промивання сорбенту 2 мл універсального буферного розчину (pH=7,4) та 1 мл води дистильованої; після чого сорбент висушували в потоці азоту;
4. елюювання силденафілу 2 мл 96% етанолу.

Швидкість пропускання всіх рідин через сорбент 1 мл/хв.

Отримані етанольні елюати випаровували досуха, розчиняли в 200 мкл метанолу та використовували для кількісного визначення силденафілу методом ГХ-МС.

Для перевірки достовірності результатів ізолювання в модельні проби (кров, 1 мл) вносилася різна кількість препарату. Досліджувані проби крові аналізували відразу після виготовлення та через 24 год. після приготування.

Результати дослідження та їх обговорення. Ідентифікацію силденафілу в пробах проводили за часом утримування (13,742± 0,04 хв.). Кількість силденафілу рахували за рівнянням градуювальної кривої, яка в межах концентрацій 7-500 нг/мл описується залежністю $Y=7{,}25\cdot10^4 X - 1{,}32\cdot10^4$, де Y – площа піку, X – концентрація силденафілу нг/мл.

Як показують результати експерименту, ступінь виділення силденафілу з крові при використанні методу екстракції твердою фазою залежить від природи речовини, яка використовується для депротеїнізації проби (рис. 1).

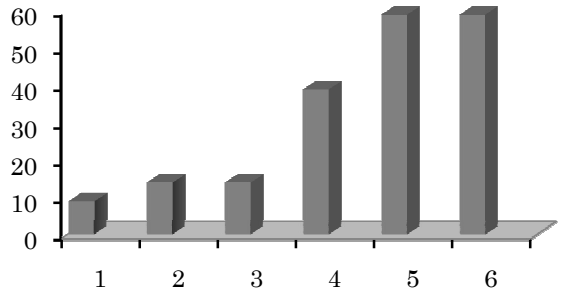

Рис. 1. **Вплив реагенту-осаджувача на результати кількісного визначення силденафілу в крові:**
1 – 20% розчин сульфосаліцилової кислоти;
2 – насичений розчин фосфорно-вольфрамової кислоти;
3 – ацетонітрил;
4 – насичений розчин оксалатної кислоти з кристалічним амонію сульфатом;
5 – 96% C_2H_5OH;
6 – 10% розчин $ZnSO_4$.

Як показують дані, представлені на рис. 1, вміст силденафілу в пробах залежить від природи реагенту, взятого для осадження білко-

вої фракції. До 10-20% силденафілу ізолюється з крові використовуючи для депротеїнізації 20% розчин сульфосаліцилової кислоти, ацетонітрил чи насичений розчин фосфорновольфрамової кислоти. При додаванні насиченого розчину оксалатної кислоти з кристалічним амонію сульфатом виділяється до 41% силденафілу. Найкращими реагентами для осадження білків при ізолюванні силденафіла з крові при проведенні екстракції твердою фазою є 10% розчин цинку сульфату та 96% етанол. В цих умовах ізолюється до 60% препарату.

В табл. 1 наведені результати кількісного визначення силденафілу в крові із використанням для осадження білкових фракцій 10% розчину цинку сульфату. Досліджувані проби крові аналізували відразу після виготовлення та через 24 год. після приготування. При цьому кров зберігали при -4°С.

Таблиця 1. **Результати визначення вмісту силденафілу в крові при використанні для депротеїнізації 10% розчину цинку сульфату (n=5 для кожної серії)**

Внесено силденафілу (нг) до 1,0 мл крові	Ізольовано силденафілу з крові в день виготовлення проб		Метрологічні характеристики методу	Ізольовано силденафілу з крові через 24 год. після виготовлення проб		Метрологічні характеристики методу
	нг	%		нг	%	
50	29,45	58,9	$\bar{X}$= 59,6%	29,40	58,8	$\bar{X}$= 59,54%
100	59,20	59,2	S= 0,53	59,10	59,1	S = 0,56
200	119,60	59,8	$S_{\bar{x}}$= 0,24	119,60	59,8	$S_{\bar{x}}$= 0,25
300	179,70	59,9	$\bar{X} \pm \Delta X$= 59,6±0,66	179,70	59,9	$\bar{X} \pm \Delta X$ =59,54± 0,7
400	240,80	60,2	ε = ± 1,11%	240,40	60,1	ε = ± 1,17%

Представлені в таблиці дані показують, що при дослідженні проб крові в день їх приготування і через 24 год. ізолюється практично однакова кількість силденафілу.

Межа виявлення силденафілу в крові методом ГХ-МС становить 5 нг/мл, а межа кількісного визначення – 7 нг/мл (сигнал шум 5:1). Після осадження білкової фракції 10% розчином $ZnSO_4$ та очистці проб на картриджах Oasis HLB ізолюється до 60,2% препарату.

Висновки:

1. Розроблено умови кількісного визначення силденафілу в крові методом газової хроматографії – мас-спектрометрії.
2. Вивчено вплив природи депротеїнізаторів на ступінь ізолювання силденафілу з крові при використанні методу твердофазної екстракції.
3. Оптимальним реагентом для депротеїнізації при ізолюванні силденафілу з крові методом твердофазної екстракції є 10% розчин $ZnSO_4$., ізолюється до 60,2% препарату.

Література:

1. *Гонський Я.І.* Біохімія людини / *Я.І. Гонський, Т.П. Максимчук* – Т.: Укрмедкнига, 2001. – С. 15-62.
2. *Машковский М.Д.* Лекарственные средст-ва / *М.Д. Машковский*. – М.: Новая волна, 2006. – 1206 с.
3. *Andersson K.E.* Mechanisms of penile erection and basis for pharmacological treatment of erectile dysfunction / *K.E. Andersson* // Pharmacol. Res. – 2011. – V.63, №4. – P.811-859.
4. *Chamsi-Pasha H.* Sildenafil (Viagra) and the heart / *H. Chamsi-Pasha* // J. Family Community Med. – 2001. – V.8, №2. – P. 63-66.
5. *Cheitlin M.D.* Should the Patient With Coronary Artery Disease Use Sildenafil / *M.D. Cheitlin* // Prev Cardiol. – 2003. – V.6. – P. 161-165.
6. Effects of sildenafil citrate (Viagra) combined with nitrate on the heart / *F. Ishikura, S. Beppu, T Hamada* [et al.] // Circulation. – 2000. – V.102. – P. 2516-2521.
7. Fatal overdosage with sildenafil citrate (Viagra): first report and review of the literature / *A. Tracqui, A. Miras, A. Tabib* [et al.] // Hum Exp Toxicol. – 2002. – V.21, №11. – P. 623-629.
8. *Gooren L.* How to optimise treatment of erectile dysfunction above and beyond the beneficial effects of a phosphodiesterase type 5 inhibitor / *L. Gooren* // J. Men's Health. – 2008. – V.5, №2. – P.163-170.
9. Off-line HPLC method combined to LC–MS for the determination of sildenafil and its active metabolite in post-mortem human / *C. Pistos,*

I. Papoutsis, A. Dona [et al.] // Forensic Science International – 2008. – V.178. – P. 192-198.
10. Postmortem Distribution of Sildenafil in Histological Material / *S. Pagani, D. Mirtella, R. Mencarelli* [et al.] // Journal of Analytical Toxicology – 2005. – V.29. – P. 254-257.

УДК 615.256.4:547.816.3]:340.627

ВЫБОР РЕАГЕНТА-ОСАДИТЕЛЯ ПРИ ИЗОЛИРОВАНИИ СИЛДЕНАФИЛА С КРОВИ МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ

Л.И. Осипчук, И.И. Галькевич
Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого, г. Львов, Украина

Резюме: Изучено влияние различных депротеинизаторов на степень изолирования силденафила из крови при использовании метода твердофазной экстракции. Оптимальным реагентом для осаждения белков при изолировании силденафила из крови методом твердофазной экстракции является 10% раствор цинка сульфата, можно выделить до 60,2% препарата. Для количественного определения выделенного силденафила разработан метод газовой хроматографии – масс-спектрометрии.

Ключевые слова: силденафил, кровь, твердофазная экстракция, осаждение белков, газовая хроматография – масс-спектрометрия.

UDC 615.256.4:547.816.3]:340.627

CHOICE OF REAGENT-PRECIPITANT FOR ISOLATION OF SILDENAFIL FROM BLOOD BY ID-PHASE EXTRACTION

L.I. Osypchuk, I.J. Halkevych
Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Summary: The conditions for sildenafil isolation from blood by the GC-MS method are elaborated. Protein precipitation technique and solid-phase extraction method were used for purification of biological samples. The influence of deproteinizator nature on results of sildenafil quantitative determination in blood following purification by solid-phase extraction was studied. The optimal reagent for deproteinization in sildenafil isolation from the blood by solid-phase extraction method is 10% solution of $ZnSO_4$. It is isolated to 60,2% of preparation.

Keywords: sildenafil, blood, solid-phase extraction, protein precipitation,GC-MS.

Надійшла до редакції 13.07.2015 р.