



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 46056

(13) C2

(51) 6 G01N33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ВІНБОРОНУ У СИРОВАТЦІ КРОВІ

1

2

(21) 98041796

(22) 09 04 1998

(24) 15 05 2002

(46) 15 05 2002, Бюл. № 5, 2002 р.

(72) Мусін Рафаель Альбертович, Пентюк Олександр Олександрович, Степанюк Георгій Іванович, Столярчук Олександр Олександрович, Степанюк Наталя Георгіївна, Мудрицький Володимир Броніславович, Юшкова Вікторія Віталівна, Почекутова Аліна Олександрівна, Шевчук Сергій Вікторович, Король Тетяна Михайлівна

(73) Вінницький державний медичний університет ім. М.І. Пирогова

(56) Машковський М.Д. Лекарственные средства М. "Медицина", 1993 - Ч. 1 - с. 517

SU, A1, 1575105, 1990

Вісник фармації - 1998, № 3-4, с. 35 - 36

(57) Спосіб визначення етилового ефіру 5-гідрокси-4-диметиламінометил-2-фенілбензофуран-3-карбонової кислоти гідрохлориду (вінборону) у пробі сироватки крові, що передбачає фотометрування проби після обробки реагентом, який відрізняється тим, що вінборон попередньо екстрагують з проби бензолом з іонною парою - бромфеноловим синім, одержаний екстракт випаровують, очищають методом тонкошарової хроматографії у системі розчинників бензол-метанол-придин у співвідношенні 7:10,5 за об'ємом та використовують як реагент 0,2-0,5 % розчин п-диметиламінобензальдегіду в концентрованій сірчаній кислоті

Винахід відноситься до галузі медицини, тобто до біоаналітичних методів дослідження і може бути використаний для кількісного визначення вінборону у сироватці крові

Вінбирон - етиловий ефір 5-гідрокси-4-диметиламінометил-2-фенілбензофуран-3-карбонової кислоти гідрохлорид (ФС 42-2557-88) - оригінальний препарат, у закордонних фармакопеях не описан. Застосовується при захворюваннях шлункового тракту, супроводжуваних спазмами гладком'язних органів, хронічних холециститах, хронічної коронарній недостатності в приступах стенокардії [1]

У теперішній час відомі наступні методи кількісного визначення вінборону титриметричний, заснований на титруванні препарату у 3% розчині мурашиної кислоти у оцтовому ангідриді, 0,1N розчином хлорної кислоти в присутності індикатора кристалічного фіолетового до появи жовтого забарвлення [2], фотометричний, заснований на кольоровій реакції вінборону з реагентом 0,5% розчином н-прозо-Р-солі у концентрованій азотній кислоті [3], екстракційно-фотометричний, заснований на утворенні гідрофобного комплексу вінборону з кислотнo-лужним барвником - метилоранжем,

екстракції його хлороформом та обробці органічного екстракту 1% спиртовим розчином сірчаної кислоти [4], радіовуглецевий, заснований на змішуванні C^{14} -радіоізотопно позначеного препарату з лікарською речовиною з наступним виміром виділеного препарату на сцинтиляційному пічильнику [5]. Вище згадані методи мають специфічне застосування та використовуються у одному випадку для визначення вінборону у товарному продукті, а в іншому випадку для посередньої індикації кількості вінборону у біопробі. Ці методи аналізу вінборону не можуть бути застосовані для кількісного визначення препарату у сироватці крові, що необхідно для вивчення фармакокінетики лікарської речовини при використанні різних лікарських форм і розробки оптимальних форм дозування. Неможливість застосування раніше опублікованих методів визначення вінборону пов'язана з тим, що одні методи мають низьку чутливість аналітичної реакції (близько 10 мкг/мл), у інших методах заважає визначенню ендогенні компоненти сироватки крові. У випадку радіовуглецевого методу визначення, неможливість врахувати метаболізм вінборону та ізотопні ефекти, які відмічалися для ізотопно-позначених речовин, наприклад кофеїну [6]

(13) C2

(11) 46056

(19) UA

Задана винаходу являється підвищення чутливості та специфічності методу визначення вінборону, тобто забезпечити можливість визначення препарату у сироватці крові

Поставлена задача вирішує виділенням препарату із сироватки крові, методом екстракції органічним розчинником з іонним асоціатом, очистка отри манного екстракту методом тонкошарової хроматографії та обробки реагентом з послідовним фотометруванням забарвленого розчину

Основа способу визначення вінборону у сироватці крові становить у слідуючому до проби (сироватка крові) додавали трихлороцетову кислоту та бромфеноловий синій, отриману субстанцію екстрагували бензолом, після чого органічний шар відділяли та випаровували розчинник до мікрооб'єму, який потім наносили на раніше підготовлену хроматографічну пластину, використовуючи сорбент сипкагель марки L 5 / 40 Хроматографування проводили у системі

розчинників бензол-метанол-пиридин, після чого хроматограму підсушували та проявляли у УФ-світлі у вигляді оранжевої плями Вінборон з хроматограми елюювали у розчині п-диметиламінобензальдегіду в концентрованій сірчаній кислоті і нагрівали до завершення аналітичної реакції По інтенсивності утвореного рожевого забарвлення визначали кількість вінборону у пробі

Для досягнення оптимальної специфічності та чутливості методу аналізу, був визначено максимум світлопоглинання продуктів реакції вінборону з розчином п-диметиламінобензальдегіду у сірчаній кислоті (Таблиця 1)

Із отриманих результатів таблиці і бачимо, що максимум світлопоглинання продуктів реакції вінборону з розчином п-диметиламінобензальдегіду у концентрованій сірчаній кислоті досягав при довжині хвилі 530 - 550нм

Таблиця 1
Визначення максимуму поглинання продуктів реакції вінборону з п-диметиламінобензальдегідом у сірчаній кислоті

Довжина хвилі нм	Оптична густина	Довжина хвилі нм	Оптична густина	Довжина хвилі нм	Оптична густина
380	0,215	496	0,580	612	0,432
384	0,212	600	0,602	616	0,400
388	0,204	504	0,620	620	0,368
392	0,192	508	0,630	624	0,343
396	0,179	512	0,640	628	0,309
400	0,164	516	0,655	632	0,281
404	0,155	620	0,660	636	0,254
408	0,147	524	0,670	640	0,232
412	0,146	528	0,675	644	0,207
416	0,150	532	0,680	648	0,186
420	0,180	536	0,681	652	0,168
424	0,169	540	0,685	656	0,149
428	0,182	544	0,690	660	0,134
432	0,196	548	0,690	664	0,123
436	0,215	552	0,690	668	0,112
440	0,240	556	0,690	672	0,100
444	0,260	560	0,685	676	0,095
448	0,285	564	0,678	680	0,089
452	0,310	568	0,670	684	0,087
456	0,334	572	0,660	688	0,082
460	0,361	576	0,545	692	0,080
464	0,385	580	0,630	696	0,077
468	0,416	584	0,610	700	0,074
472	0,441	588	0,592	704	0,071
476	0,468	592	0,570	708	0,070
480	0,495	596	0,548	712	0,067
484	0,518	600	0,522	716	0,085
488	0,538	604	0,502	720	0,063
492	0,560	608	0,464	724	0,060

Примтка

- проба вміщувала 24мкг він борону
- об'єм проби 2мл
- довжина оптичного шляху 1см
- оптична густина вимірювалась відносно контролю, де замість проби додавали дистильовану воду

Надалі було вивчено залежність оптичної густини продуктів реакції вінборону від концентрації *n*-диметиламінобензальдегду у

сірчаній кислоті, отриманий результати показані у таблиці 2

Таблиця 2

Залежність оптичної густини продуктів реакції вінборону від концентрації *n*-диметиламінобензальдегду у концентрованій сірчаній кислоті

С <i>n</i> -ДМАВА мг/мл	0,01	0,05	0,10	0,50	1,0	2,0	5,0	10,0
Дп-Дк	0,010	0,014	0,014	0,070	0,070	0,190	0,244	0,260

Примітка

- проба вмішувала 20мкг вінборону
- фотометруємий об'єм 2мл
- довжина хвилі 540нм
- довжина оптичного шляху 0,5см

Таким чином із таблиці 2 бачимо, що при визначенні вінборону кількість забавлених продуктів реакції збільшується при підвищенні концентрації *n*-диметиламінобензальдегду у сірчаній кислоті та стає приблизно постійною при досягненні концентрації *n*-диметидамінобензальдегду 2 - 10мг у одному мл сірчаної кислоти

Для кількісного визначення вінборону у фотометруємому зразку був побудован градуировальний графік залежності оптичної густини від концентрації вінборону у пробі Отриманні результати наведені у таблиці 3

Таблиця 3

Градуировальний графік залежності оптичної густини від концентрації вінборону у пробі

Концентрація вінборону у пробі, С мкг	Дп - Дк
2,0	0,027
4,0	0,050
6,0	0,079
8,0	0,102
10,0	0,142
12,0	0,170
14,0	0,197
16,0	0,224
18,0	0,268
20,0	0,275
24,0	0,342
28,0	0,381
32,0	0,430
36,0	0,500
40,0	0,560

Примітка

- для побудови градуировального графіку використали 0,5% розчин *n*-диметиламінобензальдегду у сірчаній кислоті
- проби фотометрували при довжині хвилі 540нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 0,5см

Як бачимо із результатів таблиці 3, мінімальне детектуємий рівень вінборону у пробі становить 2мкг, при цьому лінійна залежність оптичної густини від рівня препарату у пробі знаходиться у межах 2 - 40мкг Отриманий градуировальний графік описується рівнянням лінійної регресії $Y(C)$

$= (72,78 \pm 2,575)D$, мкг Коефіцієнт молярного поглинання продуктів реакції вінборону з *n*-диметиламінобензальдегдом дорівнював $E_{540} = 1,86 \times 10^4$

Відтворюваність пропонуємої аналітичної реакції визначення вінборону була вивчена при паралельному дослідженні восьми проб Отриманні результати відображені у таблиці 4

Таблиця 4

Відтворюваність метода визначення вінборону за реакцією з *n*-диметиламінобензальдегдом

Кількість вінборону у пробі, мкг	Дп - Дк	Статистичні параметри
20,6	0,250	-
20,0	0,250	$X = 0,249$
20,0	0,252	$m = \pm 0,00275$
20,0	0,250	$S_x = 0,004243$
20,0	0,249	$V = 1,10\%$
20,0	0,257	
20,0	0,248	
20,0	0,242	

Примітка

- X - середнє арифметичнє восьми визначень він борону
- m - абсолютна похибка середнього арифметичного
- S_x - середня квадратична похибка середнього арифметичного
- V - коефіцієнт варіації

Як бачимо із результатів наданих у таблиці 4, пропонуємий спосіб визначення вінборону відтворюється з середнім коефіцієнтом варіації 1,10% при паралельному аналізі восьми проб

Пряме визначення вінборону у сироватці крові було неможливим, тому що сироватка крові вмішує речовини, котрі обуглюються у концентрованій сірчаній кислоті, що значно знижує чутливість методу визначення У зв'язку з цим був застосований метод виділення вінборону із сироватки крові, методом екстракції бензолам з іонною парою У якості іонної пари використовували 0,1% розчин бромфенолового синього Умови та результати проведення екстракції відображені у таблиці 5

Таблиця 5

Характеристика способу екстракції вінборону із сироватки крові

Додано вінборону до сироватки, мкг	Визначено вінборону у сироватки, мкг	% екстракції	Об'єм сироватки аналіз, мл	Об'єм бензолу на аналіз, мл	Кількість	
					бромфенолового синього мг	20% ІХУ мл
20,0	16,00	80,0	1,0	10,0	1,0	0,2
20,0	16,84	84,2	1,0	10,0	1,0	0,2
20,0	16,42	82,1	1,0	10,0	1,0	0,2
20,0	14,00	70,0	1,0	13,0	1,0	0,2
20,0	15,16	75,8	1,0	10,0	1,0	0,2

Примітка - проби екстрагували на протязі 5 хвилин у колбі з герметичною пробкою

Із таблиці 5 Бачимо, що у наведених умовах вінборон екстрагується у середньому на $78,42 \pm 4,416$ відсотків

У зв'язку з тим, що препарат екстрагували із сироватки бензолом юнною параю з бромфеноловим синім, для виділення вінборону застосували очистку екстракту тонкошаровою хроматографією на скляних хроматографічних

пластинах на поверхні селікагелю марки L 5 / 40 фірми "Lachema" м Брно, використовувуй у якості рухомої фази суміш розчинників бензол-метанол-пиридин При цьому бромфеноловий синій зупинявся на лінії старту, а препарат підіймався сумісно з рухомою фазою Отриманні результати надані у таблиці 6

Таблиця 6

Виділення вінборону із екстракту сироватки методом тонко-шарової хроматографії

Рухома фаза			Коефіцієнт утримання R_f	Площа плями на хроматограмі мм	Концентрація вінборону у пробі, мкл
бензол мл	метанол мл	пиридин мл			
7,0	1,0	1,0	0,83	-	5,0
7,0	1,0	0,6	0,63	-	5,0
7,0	1,0	0,5	0,60	168	5,0
7,0	1,0	0,5	0,65	300	10,0
7,0	1,0	0,5	0,53	256	15,0
7,0	1,0	0,5	0,52	361	20,0

Примітка - хроматограму проявляли у УФ-світлі, вінборон знаходили у вигляді оранжевої флуоресцюючої плями

Таким чином із отриманню результатів таблиці 6 бачимо, що у системі розчинників бензол-метанол-пиридин (співвідношення 7 1 0,5 за об'ємом) вінборон виділявся з коефіцієнтом утримання R_f 0,58 Для отримання кількісних результатів препарат елюювали з хроматографічної пластини та проводили аналітичне визначення як було описано раніше по реакції з п-диметиламінобензальдегідом у концентрованими сірчаній кислоті Слід відмітити, що після проведення хроматографування, пластину потрібно щільно просушити при 120°C на протязі 30 хвилин, тому що залишкові кількості на сорбенті рухомої фази заважають визначенню вінборону

Приклад виконання аналізу

Реактиви

- 1) п-диметиламінобензальдегід
- 2) сірчана кислота
- 3) бромфеноловий синій
- 4) бензол
- 5) силікагель марки L 5 / 40 "Lachema"
- 6) трихлороцтова кислота
- 7) метанол
- 8) пиридин

Виконання аналізу

До одної частини (1мл) сироватки крові додають 0,2 частини (0,2мл) 20% розчину трихлороцтової кислоти, десять частин бензолу (10мл) та одну частину (1мл) 0,1% розчину бромфенолового синього Пробу екстрагують у колбі з герметичною пробкою протягом хвилин, після чого екстракт центрифугували 10 хвилин при 3000 1/кв

Сухою піпеткою відділяли органічну фазу у широкі пробірки і випаровували на пісочній бані до об'єму приблизно 0,5мл

Сконцентрований екстракт наносили на попередньо підготовлену хроматографічну пластину Пробірку промивали 0,2мл бензолу, який також наносили на хроматографічну пластину

Після нанесення проби на лінію старту, проводили хроматографування у системі розчинників бензол-метанол-пиридин (співвідношення 7 1 0,5 за об'ємом) у вертикальному апараті для хроматографування

Після під'їму фронту рухомої фази на 15см, хроматографічну пластину виймали та щільно висушували при 120°C у термостаті Потім хроматограму проявляли у ультрафіолетовому світлі Вінборон проявлявся у вигляді оранжевої

флуоресцюючої плями з коефіцієнтом утримання R_f 0,58. Ідентифікацію препарату проводили по свідку, який наносили на хроматографічну пластину навколо проби.

Потім відмічену тонким шпателем пляму счищали з хроматографічної пластини сумісно з сорбентом у суху і чисту пробірку.

До проби вінборону з сорбентом у пробірці додавали дві частки (2мл) свіжезробленого 0,5% розчину *n*-диметиламінобензальдегду у концентрованій сірчаній кислоті та нагрівали 10

хвилин на водяній бані при температурі 85°C.

Після охолодження, пробірки центрифугували при 3000 1/хв на протязі 30 хвилин для відділення осаду сорбенту та проводили фотометрування забарвлених у червоне-фіолетовий колір розчин при довжині хвилі 540нм, у кюветі з довжиною оптичного шляху 0,5см.

Кількість вінборону у пробі визначали по градуировальному графіку побудованому на стандартних розчинах вінборону.

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)

вул. Сім'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна

(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комтет»

вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна

(044) 216 – 32 – 71