

tal evaluation of caries preventive efficiency of "onium" hexafluorosilicates. *Visnyk stomatologiy* 2015; 2: 5-8.

3. Gelmboldt V.O., Ganin E.V., Botoshansky M.M. et al. Preparation, structure and properties of pyridinium/bipyridinium hexafluorosilicates. *J. Fluorine Chem.* 2014; 160 (4): 57-63.

4. Gelmboldt V.O., Anisimov V.Yu., Prodan O.V. Hexafluorosilicates with antibacterial active guanidine containing cations. *News of Pharmacy.* 2014; 3 (79): 42-45.

5. Gelmboldt V.O., Prodan O.V., Anisimov V.Yu. Synthesis and characterization of cetylpyridinium hexafluorosilicate as new potential caries protecting agent. *Am. J. PharmTech. Res.* 2014; 4 (6): 513-521.

6. Levitsky A. P. *Lechebno-profilaktycheskie zubnye eliksiry* [The therapeutic and preventive dental waters: the manual]. Odessa, KP OGT, 2010, 246 p.

7. Levitsky A.P., Makarenko O.A., Denga O.V. et al. *Ekspyrymentalnye metody issledovaniya stimulyatorov osteogeneza: metodicheskie rekomendatsii* [The experimental methods of the study of osteogenesis stimulators]. Kiev, GFK, 2005, 50 p.

8. Goryachkovskiy A.M. *Klinicheskaya biokhimiya v laboratornoy diagnostike* [The clinical biochemistry in laboratorial diagnostics]. 3rd ed. Odessa, Ekologiya, 2005, 616 p.

9. Bazarnova M.A., Sakun T.L. *Klinicheskoe issledovanie krovi* [The clinical study of blood. In the book "The

Manual on Clinical Laboratorial Diagnostics. P. 2 (Bazarnova M.A. ed.)]. Kyiv, Vyshcha shkola, 1982, p. 35-52.

10. Levitsky A.P. *Lizotsym vmesto antibiotikov* [Lysozyme instead of antibiotics]. Odessa, KP OGT, 2005; 74 p.

11. Levitsky A.P., Makarenko O.A., Khodakov I.V. et al. The enzymatic method of the estimation of the state of osseous tissue. *Odeskyy medychnyy zhurnal* 2006; 3: 17-21.

12. Levitsky A.P., Gorokhivskiy V.N., Selivanskaya I.A. Hepatotoxic effect of fluorides and the role of calcium-containing preparations in its prevention. *Aktual'nye problemy transportnoy meditsyny* 2014; 3 (37): 136-139.

Поступила 9.11.2015

Рецензент д-р мед. наук,
проф. Ю. Г. Романова

УДК 615.256.4:547.816.3]:340.627

Л. І. Осипчук, І. Й. Галькевич

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВАРДЕНАФІЛУ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ В ПЛАЗМІ ТА КРОВІ

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

УДК 615.256.4:547.816.3]:340.627

Л. І. Осипчук, І. Й. Галькевич

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАРДЕНАФИЛА МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ В ПЛАЗМЕ И КРОВИ

Львовский национальный медицинский университет им. Даниила Галицкого, Львов, Украина

Изучена зависимость интенсивности флуоресценции варденафила от природы растворителя. Разработаны оптимальные условия количественного определения варденафила методом флуоресцентной спектроскопии в плазме и крови. Для очистки биологических проб использован метод твердофазной экстракции.

Ключевые слова: варденафил, кровь, плазма, флуоресцентная спектроскопия, твердофазная экстракция.

UDC 615.256.4:547.816.3]:340.627

L. I. Osypchuk, I. Y. Halkevych

VARDENAFIL QUANTITY DETERMINATION BY FLUORESCENCE SPECTROSCOPY IN PLASMA AND BLOOD

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Introduction. Vardenafil belongs to inhibitors of the 5th type phosphodiesterase and used in therapy of erectile dysfunction.

Objective. Study of the influence of the solvent nature on intensity of vardenafil fluorescence in solutions. Development of optimal conditions for the quantitative determination of preparation by fluorescence spectroscopy method in plasma and blood.

Materials and Methods. Fluorescence characteristics of vardenafil in water, ethanol, and acetonitrile solutions with a concentration of 10 mg/ml was studied.

The calibration curves were built for vardenafil concentrations in range 5–100 ng/ml and 0.1–5.0 mg/ml. The drug solutions were prepared in acetonitrile.

The optimal conditions of the vardenafil definition in plasma and blood by the fluorescence method were developed based on model mixtures, which made different amounts of the preparation (from 0.05 to 10 mcg per 1 ml sample).



Purification of biological probes were carried out on the Oasis HLB cartridges (30 mg, Waters, USA). For deproteinization of blood, it was used the 10% solution of ZnSO₄.

Results. It was found that λ_{ex} of vardenafil in aqueous and ethanolic solutions is 270 nm, and λ_{em} is 460–470 nm. The λ_{ex} of vardenafil in acetonitrile solution is 285 nm and the fluorescence maximum is at 448–452 nm. Acetonitrile is the best solvent for fluorometric determination of vardenafil.

The detection limit of vardenafil by fluorescence spectroscopy in acetonitrile solution is 4 ng/ml, and the limit of quantification is 5 ng/ml. The limit of vardenafil detection in a blood by fluorescence spectroscopy is 9 ng/ml and in plasma — 7 ng/ml. The limit of quantification in given biological fluids is 10 ng/ml. In plasma it can be determined up to 79% of the preparation by above mentioned method, and in blood (after protein precipitation with 10% solution of ZnSO₄ and purification on Oasis HLB cartridges) — up to 55.0%. The relative error of vardenafil quantification in plasma is 1.72%, and in the blood — 1.68%.

Conclusions:

1. Dependence of vardenafil fluorescence intensity on the solvent nature was studied.
2. Conditions of vardenafil quantification in blood and plasma by fluorescence spectroscopy were developed.

Key words: vardenafil, blood, plasma, fluorescence spectroscopy, solid phase extraction.

Вступ

Варденафіл належить до селективних інгібіторів циклогуанозинмонофосфату специфічної фосфодіестерази 5-го типу. Даний лікарський засіб використовується для лікування порушень ерекції [1–3; 5; 7]. Беручи до уваги механізми, завдяки яким інгібітори фосфодіестерази 5-го типу (ІФД-5) викликають вазодилатацію, стає зрозуміло, що комбінація варденафілу з будь-яким препаратом-донатором оксиду азоту при недотриманні 24-годинного інтервалу між їх прийомом може призвести до тяжкої гіпотензії, інколи з летальними наслідками [6; 8]. Тому розробка простих і експресних методик виділення та кількісного визначення варденафілу в біологічних рідинах є актуальним завданням.

Одним із чутливих методів аналізу, який дозволяє виявляти та визначати незначні кількості досліджуваних речовин, є метод флуоресцентної спектроскопії. У джерелах літератури описана методика визначення варденафілу в плазмі та жовчі щурів методом високоефективної рідинної хроматографії з використанням флуоресцентного детектора [4]. На основі проаналізованих даних нами розроблені умови експрес-визначення варденафілу в крові та плазмі мето-

дом флуоресцентної спектроскопії.

Мета роботи: вивчення впливу природи розчинника на інтенсивність флуоресценції варденафілу у розчинах і розробка оптимальних умов кількісного визначення препарату методом флуоресцентної спектроскопії в плазмі та крові.

Матеріали та методи дослідження

Для виготовлення розчинів і модельних сумішей з біологічними рідинами використовували варденафілу гідрохлориду тригідрат (Sigma, США). Із стандартного зразка готували розчини варденафілу з вмістом 1 мг/мл.

Для виготовлення розчинів використовували бідистильовану воду, 96 % етанол і ацетонітрил, які відповідали кваліфікації «х. ч.». Інші розчинники та реактиви також відповідали кваліфікації «х. ч.» або «ч. д. а.».

Для вивчення залежності інтенсивності флуоресценції від природи розчинника готували водні, ацетонітрильні та етанольні розчини варденафілу з концентрацією 10 мкг/мл.

Градувальні графіки будували в межах концентрацій варденафілу 5–100 нг/мл і 0,1–5,0 мкг/мл. Для цього готували розчини препарату в ацетонітрилі. У першій серії розчинів вміст варденафілу становив 5; 10; 50; 80 та 100 нг/мл.

У другій серії — 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 мкг/мл.

Інтенсивність флуоресценції розчинів варденафілу вимірювали з допомогою флуоресцентного спектрофотометра Hitachi MPF-4. Ширина щілини монохроматора збудження 10 нм, емісії — 5 нм. При чутливості 10 виміряли інтенсивність першої серії стандартних розчинів, а при чутливості 1 — другої.

Визначали залежність результатів визначення варденафілу в плазмі та крові методом флуориметрії від вмісту препарату в біологічній пробі.

Для перевірки можливості застосування методу флуориметрії для кількісного визначення варденафілу в крові та плазмі готували по три паралельні серії модельних сумішей. Для цього готували модельні проби, які містили варденафіл у кількості 0,05; 0,1; 1,0; 5,0 та 10,0 мкг в 1 мл крові або плазми.

Цільну кров і плазму отримували у Львівській обласній станції переливання крові. Біологічні рідини зберігали при температурі -20 °С.

Очищення біологічних проб проводили методом твердофазної екстракції (ТФЕ). Для очищення використовували катриджі Oasis HLB (30 mg, Waters, USA).

Ізолювання варденафілу з крові. До 1 мл досліджуваних зразків крові додавали по 1 мл універсального буферного роз-



чину (рН=7,4). Проби гомогенізували, до гомогенізату вносили по 0,4 мл 96 % етанолу та по 0,2 мл 10 % розчину цинку сульфату. Отриманий осад відокремлювали центрифугуванням (15 хв при 10 000 об/хв). Надосадову рідину кількісно пропускали через картриджі для твердофазної екстракції.

Проби плазми, що містили препарат, безпосередньо вносили в колонки для ТФЕ. Об'єм внесеної проби — 1,0 мл.

Очищення на колонках проводили за схемою:

1. Кондиціонування сорбенту 1 мл 96 % етанолу та 1 мл води дистильованої.

2. Завантаження зразка.

3. Промивання сорбенту 2 мл універсального буферного розчину (рН 7,4) та 1 мл води дистильованої; після чого сорбент висушували в потоці азоту.

4. Елюювання варденафілу 2 мл 96 % етанолу.

Швидкість пропускання всіх рідин через сорбент 1 мл/хв.

Отримані етанольні елюати випаровували досуха, розчиняли в 4 мл ацетонітрилу та вимірювали інтенсивність флуоресценції при $\lambda_{\text{ем}}=450$ нм ($\lambda_{\text{зб}}=285$ нм) щодо контрольних проб, які готували паралельно із модельними зразками.

Результати дослідження та їх обговорення

Встановлено, що для варденафілу $\lambda_{\text{зб}}=270$ нм, якщо розчинником є вода або 96 % етанол. В ацетонітрильних розчинах препарату $\lambda_{\text{зб}}$ спостерігається при 285 нм. Максимум флуоресценції варденафілу у водному та етанольному розчинах спостерігається в інтервалі довжин хвиль 460–470 нм, а в ацетонітрилі — при 448–452 нм (рис. 1).

Як показують отримані результати, інтенсивність флуоресценції варденафілу значною мірою залежить від природи розчинника (див. рис. 1).

В ацетонітрилі інтенсивність флуоресценції варденафілу удвічі вища, ніж у 96 % етанолі, і в 6 разів вища, ніж у водних розчинах. Спектри флуоресценції ацетонітрильних розчинів сухих залишків, які отримували після випаровування елюатів, були ідентичні чистому варденафілу. Для кількісного визначення варденафілу доцільно застосовувати ацетонітрильні розчини препарату.

Градувальні графіки залежності абсолютного значення інтенсивності флуоресценції від кількісного вмісту варденафілу подані на рис. 2.

У межах концентрацій варденафілу в пробах від 5 до 100 нг/мл градувальний графік описується залежністю $Y = 230,79X - 0,308$ ($r=0,9998$), а в межах концентрацій від 0,1–5,0 мкг/мл — $Y = 19,94X + 0,190$ ($r=0,9999$), де Y — інтенсивність випромінюваної флуоресценції, що відповідає певній кількості варденафілу в пробі (X).

Відносна похибка кількісного визначення варденафілу в ацетонітрильних розчинах становить $\pm 1,55$ % в діапазоні концентрацій від 5 до 100 нг/мл, та $\pm 1,54$ % в діапазоні концентрацій від 0,1–5,0 мкг/мл.

Дані рівняння використовували для кількісного визна-

чення варденафілу у пробах, отриманих із біологічного матеріалу. Результати визначення вмісту варденафілу методом флуоресцентної спектроскопії у пробах крові та плазми подані в табл. 1.

Межа виявлення варденафілу методом флуоресцентної спектроскопії в ацетонітрильних розчинах становить 4 нг/мл, а межа кількісного визначення — 5 нг/мл. Межа виявлення варденафілу методом флуоресцентної спектроскопії в плазмі становить 7 нг/мл, а в крові — 9 нг/мл. Межа кількісного визначення в даних біологічних рідинах — 10 нг/мл. Із застосуванням катриджів Oasis HLB (30 мг), із плазми ізолюється до 80 % препарату, а з крові, після осадження білкової фракції 10 % розчином $ZnSO_4$ та подальшим очищенням методом ТФЕ, — до 55,0 %. Відносна похибка кількісного визначення варденафілу в плазмі — 1,72 %, а в крові — 1,68 %.

Висновки

1. Вивчено залежність інтенсивності флуоресценції варденафілу від природи розчинника. Встановлено, що в ацетонітрильних розчинах інтенсивність флуоресценції варденафілу удвічі вища, ніж в етанольних розчинах, і в 6 ра-

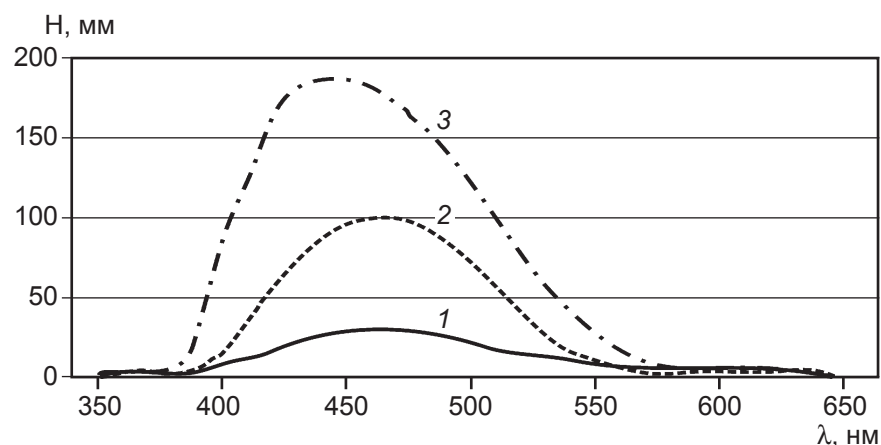


Рис. 1. Спектри флуоресценції варденафілу (10 мкг/мл, чутливість 1): 1 — у воді; 2 — у 96 % етанолі; 3 — в ацетонітрилі



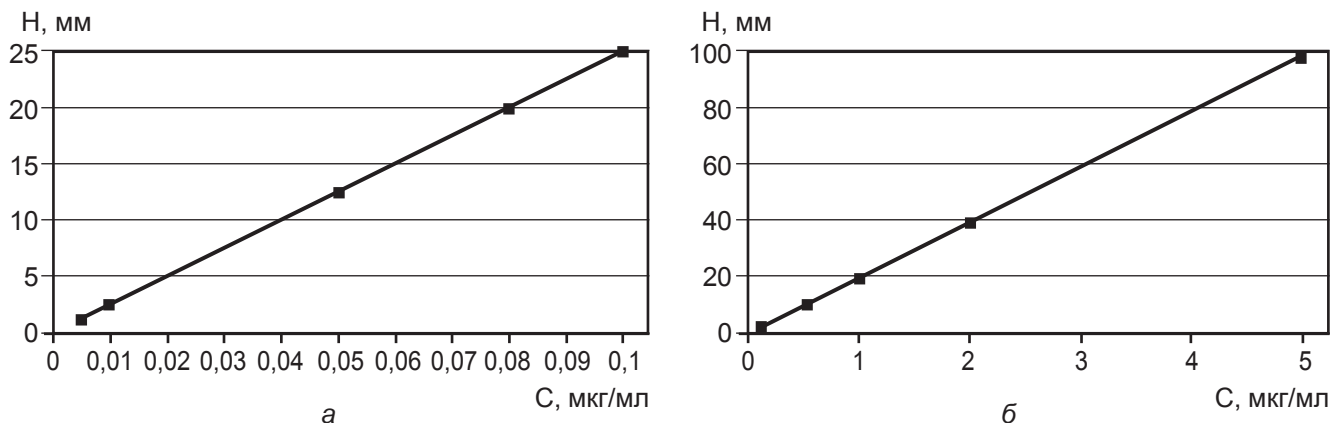


Рис. 2. Градувальні графіки кількісного визначення варденафілу методом флуоресцентної спектроскопії: а — для розчинів у діапазоні концентрацій 5–100 нг/мл; б — у діапазоні концентрацій 0,1–5,0 мкг/мл

Таблиця 1

Результати визначення вмісту варденафілу методом флуоресцентної спектроскопії у пробах крові та плазми, n=5 для кожної серії

Внесено варденафілу, мкг	Ізольовано варденафілу з плазми, абс. (%)	Метрологічні характеристики	Ізольовано варденафілу з крові	Метрологічні характеристики
0,05	0,039 (78,00)	$\bar{X} = 79,29 \%$	0,027 (54,05)	$\bar{X} = 54,97 \%$
0,1	0,079 (78,50)	$S = 0,09$	0,055 (54,50)	$S = 0,74$
1,0	0,792 (79,20)	$S_{\bar{x}} = 0,49$	0,549 (54,90)	$S_{\bar{x}} = 0,33$
5,0	4,005 (80,10)	$\bar{X} \pm \Delta X = 79,29 \pm 1,36$	2,775 (55,50)	$\bar{X} \pm \Delta X = 54,97 \pm 0,93$
10,0	8,065 (80,65)	$\epsilon = \pm 1,72 \%$	5,590 (55,90)	$\epsilon = \pm 1,68 \%$

зів вища, ніж у водних розчинах.

2. Розроблено умови кількісного визначення варденафілу методом флуоресцентної спектроскопії в ацетонітрильних розчинах. При цьому для варденафілу $\lambda_{em}=450$ нм, а $\lambda_{36}=\lambda_{285}$ нм. Градувальні графіки побудовані в межах концентрацій 5–100 нг/мл (при чутливості 10) і 0,1–5,0 мкг/мл (при чутливості 1). У межах концентрацій від 5 до 100 нг/мл рівняння градувального графіка описується залежністю $Y = 230,79X - 0,308$ ($r=0,9998$), а в межах концентрацій від 0,1–5,0 мкг/мл — $Y = 19,94X + 0,190$ ($r=0,9999$). Межа виявлення варденафілу методом флуоресцентної спектроскопії в ацетонітрильних розчинах становить 4 нг/мл, а межа кількісного визначення — 5 нг/мл. Відносна похибка кількісного визначення варденафілу в ацетонітрильних розчинах становить $\pm 1,55 \%$ у діапазоні кон-

центрацій від 5 до 100 нг/мл та $\pm 1,54 \%$ у діапазоні концентрацій від 0,1–5,0 мкг/мл.

3. Запропоновано умови визначення кількісного вмісту варденафілу в крові та плазмі. Осадження білкової фракції крові проведене 10 % розчином $ZnSO_4$. Очищення проб плазми та крові проводили методом ТФЕ із застосуванням катриджів Oasis HLB (30 mg). Межа виявлення варденафілу в плазмі методом флуоресцентної спектроскопії становить 7 нг/мл, а в крові — 9 нг/мл. Межа кількісного визначення в даних біологічних рідинах — 10 нг/мл. Із застосуванням даної методики з плазми ізолюється до 80 % варденафілу, а з крові — до 55,0 %. Відносна похибка кількісного визначення варденафілу в плазмі становить 1,72 %, а в крові — 1,68 %.

ЛІТЕРАТУРА

1. Машковський М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковський. — М.: Новая волна, 2006. — 1206 с.

2. An update on pharmacological treatment of erectile dysfunction with phosphodiesterase type-5 inhibitors / R. Bruzziches, D. Francomano, P. Garkeri [et al.] // Expert Opinion on Pharmacotherapy. — 2013. — Vol. 14, N 10. — P. 1333–1344.

3. Andersson K. E. Mechanisms of penile erection and basis for pharmacological treatment of erectile dysfunction / K. E. Andersson // Pharmacol. Res. — 2011. — Vol. 63, N 4. — P. 811–859.

4. Cheng C. L. Development and validation of a high-performance liquid-chromatographic method using fluorescence detection for the determination of vardenafil in small volumes of rat plasma and bile / C. L. Cheng, G. J. Kang, C. H. Chou // Journal of Chromatography A. — 2007. — Vol. 1154. — P. 222–229.

5. McNamara E. R. Newer Phosphodiesterase Inhibitors: Comparison with Established Agents / E. R. McNamara, C. F. Donatucci // Urologic Clinics of North America. — 2011. — N 2. — P. 155–163.

6. Lowe G. 10-Year analysis of adverse event reports to the food and drug administration for phosphodiesterase type-5 inhibitors / G. Lowe,



R. A. Costabile // The journal of sexual medicine. – 2012. – N 1. – P. 265–270.

7. Gamidov S. I. Modernity in the treatment of erectile dysfunction: Levitra (vardenafil) in the form of oral dispersible tablet / S. I. Gamidov, V. V. Iremashvili, A. I. Popova // Urologiia. – 2013. – N 3. – P. 102–106.

8. Kloner A. R. Sexual Function in Patients With Chronic Angina Pectoris / A. R. Kloner, L. Henderson // American Journal of Cardiology. – 2013. – Vol. 111, N 11 – P. 1671–1676.

REFERENCES

1. Mashkovsky M.D. *Lekarstvennyie sredstva* [Medicinal preparations]. Moscow, Nova Khvyliia, 2006. 1206 p

2. Bruzziches R., Francomano D., Gari P., Lenzi A., Aversa A. An update

on pharmacological treatment of erectile dysfunction with phosphodiesterase type-5 inhibitors. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2013; 14 (10): 1333–1344.

3. Andersson K.E. Mechanisms of penile erection and basis for pharmacological treatment of erectile dysfunction. *Pharmacol. Res.* 2011; 63 (4): 811–859.

4. Cheng C.L., Kang G.J., Chou C.H. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method using fluorescence detection for the determination of vardenafil in small volumes of rat plasma and bile. *Journal of Chromatography A*. 2007; 1154: 222–229.

5. McNamara E.R., Donatucci C.F. Newer Phosphodiesterase Inhibitors: Comparison with Established Agents.

Urologic Clinics of North America. 2011; 2: 155–163.

6. Lowe G., Costabile R.A. 10-Year analysis of adverse event reports to the food and drug administration for phosphodiesterase type-5 inhibitors. *The Journal of sexual medicine*. 2012; 1: 265–270.

7. Gamidov S.I., Iremashvili V.V., Popova A.I. Modernity in the treatment of erectile dysfunction: Levitra (vardenafil) in the form of oral dispersible tablet. *Urologiia*. 2013; 3: 102–106.

8. Kloner A.R., Henderson L. Sexual Function in Patients With Chronic Angina Pectoris. *American Journal of Cardiology*. 2013; 111 (11): 1671–1676.

Надійшла 3.02.2016

Рецензент д-р мед. наук,
проф. Я. В. Рожковський

УДК 615.263.63+616.594.1

І. О. Ярема, М. І. Федоровська, Р. В. Куцик

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ АНТИМІКРОБНИХ КОНСЕРВАНТІВ ПРИ РОЗРОБЦІ ПРЕПАРАТІВ ДЛЯ МІСЦЕВОГО ЛІКУВАННЯ АНДРОГЕННОЇ АЛОПЕЦІЇ

ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»,
Івано-Франківськ, Україна

УДК 615.263.63+616.594.1

И. А. Ярема, М. И. Федоровская, Р. В. Куцик

ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА АНТИМИКРОБНОГО КОНСЕРВАНТА ПРИ РАЗРАБОТКЕ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ МЕСТНОГО ЛЕЧЕНИЯ АНДРОГЕННОЙ АЛОПЕЦИИ

ГВУЗ «Ивано-Франковский национальный медицинский университет», Ивано-Франковск, Украина

Представлены результаты микробиологических исследований по выбору консерванта для обеспечения микробиологической стабильности разработанных лекарственных косметических средств (фитоземulsion и крем-маски) с экстрактом пальмы сабаль и настойкой софоры японской для местного применения при андрогенной алопеции. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности введения в качестве консервантов смеси калия сорбата (0,1 %) и салициловой кислоты (0,1 %). Доказано, что по своей эффективности указанные консерванты соответствуют требованиям критерия А Государственной фармакопеи Украины и обеспечивают высокую микробиологическую чистоту и стабильность препаратов.

Ключевые слова: консерванты, антимикробная активность, эмульсия, крем-маска, андрогенная алопеция.

UDC 615.263.63+616.594.1

I. O. Yarema, M. I. Fedorovska, R. V. Kutsyk

SUBSTANTIATION OF ANTIBACTERIAL PRESERVATIVES CHOICE IN REMEDIES FOR ANDROGENIC ALOPECIA TOPICAL TREATMENT

Ivano-Frankivsk National Medial University, Ivano-Frankivsk Ukraine

Introduction. We have developed a soft dosage forms (emulsion, cream-mask) with Saw Palmetto extract and Sophora Japonica tincture for androgenic alopecia (AA) local application. To ensure microbiological stability during storage period preservatives were administered to the composition of

