

## Ідентифікація та кількісне визначення теофіліну методом похідної спектрофотометрії у витяжках з біологічного матеріалу

О.О.Маміна, Н.Ю.Бевз, Г.О.Бур'ян, К.О.Бур'ян

Національний фармацевтичний університет  
Харків, Україна

Застосування методу похідної спектрофотометрії усуває вплив фону домішок при аналізі теофіліну у витяжках з біологічного матеріалу та дозволяє визначити 36,7-40,3% речовини. Визначення теофіліну методом другої похідної дає більш надійні та об'єктивні результати в порівнянні з використанням методу УФ-спектрофотометрії.

**Ключові слова:** теофілін, похідна спектрофотометрія, біологічний матеріал.

### ВСТУП

Однією з важливих проблем сучасного хіміко-токсикологічного аналізу є дослідження впливу співекстрактивних речовин з біологічних об'єктів на кінцевий результат. Наявність домішок знижує об'єктивність отриманих результатів. Так, при проведенні кількісного визначення отрут в екстрактах з біологічного матеріалу в умовах відсутності контрольних дослідів отримуються завищені результати без врахування впливу фону.

Застосування методів очищення (хроматографії в тонкому шарі сорбенту, екстракції різними органічними розчинниками та інш.) не дозволяє повністю виділити співекстрактивні речовини з витяжок.

Вибір методу похідної спектрофотометрії для ідентифікації та кількісного визначення токсичних речовин у витяжках з біологічного матеріалу обумовлений усуненням впливу фону домішок.

Метою дослідження було розробити умови ідентифікації та кількісного визначення теофіліну у витяжках з біологічного матеріалу методом похідної спектрофотометрії.

Теофілін (1,3-диметилксантинмоногідрат) — алкалоїд пуринового ряду, широко застосовується в медичній практиці для регуляції серцево-судинної системи, як діуретик, протиастматичний засіб, використовується для лікування ішемічної хвороби серця. Але при передозуванні теофілін характеризується значною токсичністю, порушуючи діяльність центральної нервової та серцево-судинної систем [5-8].

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для використання похідної спектрофотометрії необхідно, щоб спектральні характеристики речовин та домішок апроксимувалися поліномами різних ступеней, причому ступінь поліному для спектральної кривої отрути був вище ступеня поліному для спектральної кривої співекстрактивних речовин.

Встановлено, що оптимальним було використання ортогональних функцій для визначення отрут на фоні лінійного поглинання домішок або розчинника. Так, в області максимумів поглинання токсичних речовин спостерігалась лінійна залежність світлопоглинання фону домішок від довжини хвилі при застосуванні апроксимації спектральних характеристик співекстрактивних сполук — поліномом першого ступеня ( $A_{\text{фон}} = v_0 + v_1 x$ ), а речовин — поліномом другого ступеня ( $A_{\text{речовина}} = a_0 + a_1 x + a_2 x^2$ ), де  $a_0, a_1, a_2$  — коефіцієнти поліному, який описує УФ-спектр речовини;  $v_0, v_1$  — коефіцієнти поліному, який описує УФ-спектр фону;  $x$  — порядковий номер довжини хвилі [1, 3].

Для розрахунку похідної вимірювали різницю значень поглинання при двох довжинах хвиль, розділених інтервалом  $\Delta\lambda = \lambda_2 - \lambda_1$ . Різниця в значеннях оптичної густини при двох близьких довжинах хвиль, віднесена до значення інтервала між ними  $\Delta A / \Delta\lambda = f(\lambda)$ , як функція довжини хвилі,

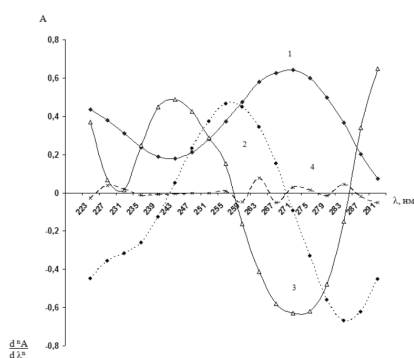


Рис. 1. УФ-спектр 0,001% розчину теофіліну у спирті (1); перша похідна спектра (2); друга похідна спектра (3); четверта похідна спектра (4).

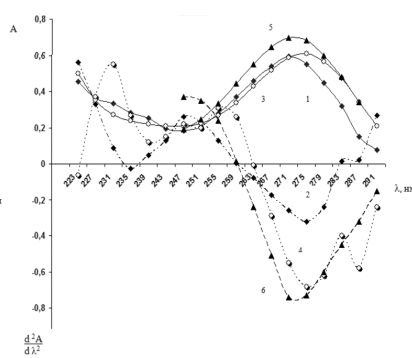


Рис. 2. УФ-спектри 0,001% розчинів теофіліну у 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої (1) та його друга похідна (2); 0,01 М розчині натрію гідроксиду (3) та його друга похідна (4); хлороформі (5) та його друга похідна (6).

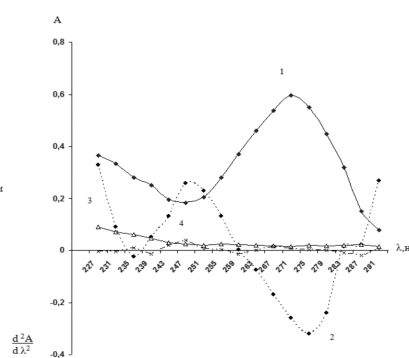


Рис. 3. УФ-спектри витяжок з проб тканини печінки після ТШХ-очищення: проба, яка містить теофілін (1); контрольна проба (3); друга похідна відповідних спектрів (2, 4).

складала похідну спектра поглинання —  $dA/d\lambda=f(\lambda)$ . Значення похідної прямо пропорційні крутизні нахилу кривої спектра поглинання. Точки перетину похідної з осями довжин хвиль відповідають екстремумам вихідної кривої, тобто максимумам або мінімумам.

Нами була проведена порівняльна оцінка першої, другої та четвертої похідних УФ-спектра поглинання теофіліну (рис.1).

Друга похідна спектра на відміну від першої похідної за загальною формою значно ближча до вихідного спектра: максимум поглинання на вихідному спектрі відповідає максимум на другій похідній, узятий з оберненим знаком. Четверта похідна не має застосування в аналізі токсичних речовин, що обумовлено зростанням випадкової похибки при підвищенні порядку похідної.

Другу похідну від спектрів поглинання ( $d^2A/d\lambda^2$ ) розраховували за допомогою поліноміальної апроксимації методом найменших квадратів. Розрахунок проводили за допомогою диференціюючих цифрових фільтрів.

Для розрахунку другої похідної для довжини хвилі  $\lambda_3$  вимірювали значення оптичної густини розчину (A) при довжинах хвиль  $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3, \lambda_4, \lambda_5$  з інтервалом 4 нм. Отримані значення помножували на коефіцієнти поліному для відповідної кількості точок. Алгебраїчна сума похідної надавала значення для середньої точки, тобто розра-

хунок другої похідної проводили за формулою:  $P''=2A_1-A_2-2A_3-A_4+2A_5$  [1, 3]

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ідентифікацію теофіліну проводили за наявністю максимумів, мінімумів та точок перетину похідної з осями довжин хвиль, які більш чітко виявлялись на другій похідній від спектра порівняно з вихідним УФ-спектром (рис.1, 2).

Проведення ідентифікації теофіліну в розчинниках, які широко застосовуються в хіміко-токсикологічному аналізі отрут — 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої, 0,01 М розчині натрію гідроксиду, етанолі, хлороформі, надавало можливості отримати надійні результати (табл. 1).

Кількісне визначення теофіліну проводили на пробах по 10,0 г тканини печінки без ознак гниття з 1,0 мг теофіліну та контрольних пробах, які залишали на добу при кімнатній температурі. Речовину ізолювали з проб за методикою безперервної екстракції хлороформом без зміни рН середовища [1, 3, 4].

Одержані хлороформні витяжки упарювали на водяній бані та сухий залишок двічі очищували гексаном по 10 мл з наступним застосуванням ТШХ-методу [2]. Для очищення використовували хроматографічні пластинки на скляній основі (тип сорбенту — силікагель КСКГ, зернення —

ТАБЛИЦЯ 1

### Результати виявлення теофіліну за допомогою другої похідної УФ-спектра

Розчинник	$\lambda_{\max}$ , нм	$\lambda_{\min}$ , нм	$\lambda$ (перетину осі абсцис), нм
0,1 М розчин кислоти хлористоводневої	249	237, 277	235, 239, 261, 284
0,01 М розчин натрію гідроксиду	234, 249, 257	277, 289	225, 265
Етанол	244	232, 273	259, 286
Хлороформ	248	273	261

ТАБЛИЦЯ 2

Результати ізолювання теофіліну з тканини печінки трупa при застосуванні розроблених методик аналізу (n=5, P=95%)

Метод аналізу	Внесено речовини, мг	Виділено речовини, %	Метрологічні характеристики					
			X	S <sup>2</sup>	S	S <sub>x</sub>	Δx	ε
УФ-спектрофотометрія	1,0	35,2-38,4	36,8	1,64	1,28	0,57	1,58	4,29
Похідна спектрофотометрії	1,0	36,7-40,3	38,5	2,13	1,46	0,65	1,81	4,71

5-20 мкм, товщина шару – 130±25 мкм, зв'язуючий агент – рідке скло, розмір пластинки – 20х20 см); система розчинників: хлороформ – етанол (9:1).

Для виявлення теофіліну на хроматограмах застосовували реактив Драгендорфа в модифікації за Муньє (чутливість – 3-5 мкг речовини в плямі оранжевого кольору; Rf теофіліну=0,34-0,38; домішки – на лініях старту та фінішу).

Речовину із сорбенту тричі елюювали 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої по 5 мл. Об'єднані елюати фільтрували в мірну колбу місткістю 50 мл та доводили до мітки розчинником. Оптичну густину отриманих розчинів вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 при 272±1 нм (кювета 10 мм, розчин порівняння – 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої).

Для кількісного визначення теофіліну другу похідну від спектра обчислювали при довжинах хвиль 261, 268, 276, 280 та 285±1 нм (рис. 3).

Одночасно була визначена друга похідна при таких же довжинах хвиль УФ-спектра стандартного 0,001% розчину теофіліну в 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої (рис. 2). Розрахунок кількості досліджуваної речовини після ізолювання з тканини печінки проводили за формулою  $C_x = P''_x \cdot C_{ct} / P''_{ct}$ , де  $C_x$  – концентрація теофіліну у витяжках з тканини печінки, мкг/мл;  $C_{ct}$  – концентрація стандартного розчину теофіліну, 10 мкг/мл;  $P''_x$  – друга похідна від спектра досліджуваної речовини у витяжках;  $P''_{ct}$  – друга похідна від спектра стандартного розчину теофіліну.

Результати кількісного визначення теофіліну в тканині печінки за допомогою похідної спектрофотометрії наведені в табл. 2.

Для порівняльної оцінки двох спектральних методів при їх застосуванні в хіміко-токсикологічному аналізі теофіліну проводили визначення вмісту речовин в одержаних хлороформних витяжках після очищення за методикою, наведеною вище, методом УФ-спектрофотометрії [1, 3].

Кількісне визначення теофіліну проводили за формулою  $C_{x,\%} = A_x \cdot C_0 \cdot 50 \cdot 100 / A_0 \cdot a$ , де  $C_{x,\%}$  – масова частка теофіліну в 10 г тканини печінки, у %;  $A_x$  – оптична густина досліджуваного розчину;  $C_0$  – концентрація стандартного розчину теофіліну;  $A_0$  – оптична густина стандартного розчину

теофіліну; 50 – місткість мірної колби з екстрактом теофіліну з тканини печінки, мл; а – маса навески теофіліну, яка внесена в 10 г печінки, мкг.

Результати кількісного визначення теофіліну в тканині печінки за допомогою УФ-спектрофотометрії наведені в табл. 2.

При порівнянні дисперсій за F-критерієм для похідної спектрофотометрії та УФ-спектрофотометрії (1,29) встановлено відсутність значних розходжень методик аналізу, що підтверджує їх однакову відтворюваність і придатність для дослідження біологічних об'єктів.

Але в умовах відсутності контрольних проб та впливу фону домішок метод похідної спектрофотометрії надає можливості отримати надійні та об'єктивні результати. Застосування похідної спектрофотометрії в аналізі теофіліну в тканині печінки дозволяє визначити 36,7-40,3% речовини з відносною невизначеністю аналізу ±4,71%.

**ВИСНОВКИ**

1. Проведено порівняльну оцінку методів похідної спектрофотометрії (36,7-40,3% з відносною невизначеністю аналізу ±4,71%) та УФ-спектрофотометрії (35,2-38,4% з відносною невизначеністю аналізу ±4,29%) при аналізі теофіліну у хлороформних витяжках з біологічного матеріалу.

2. При порівнянні дисперсій за F-критерієм встановлено відсутність значних розходжень методик аналізу, що підтверджує їх однакову відтворюваність і придатність для дослідження біологічних об'єктів.

3. Встановлено, що в умовах відсутності контрольних проб та впливу фону домішок метод похідної спектрофотометрії надає можливості отримати надійні та об'єктивні результати.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Болотов В.В. Хроматографические и спектральные методы в химико-токсикологическом анализе ксантинола / В.В.Болотов, П.А.Безуглий, Е.А.Мамина // Запорожский мед. журн . – 2007 . – №6. – С. 155-159.
2. Мамина О.О. Порівняльна оцінка методів очищення хлороформних витяжок з біологічного матеріалу

- лу / О.О.Маміна, В.В.Болотов // Фармац. журн. — 2006. — №5. — С. 81-85.
3. Маміна О.О. Хіміко-токсикологічний аналіз пентоксифіліну із застосуванням похідної спектрофотометрії / О.О.Маміна, В.В.Болотов // Фармац. журн. — 2005. — №2. — С. 87-91.
  4. Маміна О.О. Пробопідготовка при ізолюванні отруту основного та кислотного характеру з тканини печінки трупна хлороформом / О.О.Маміна, В.В.Болотов // Запорозький мед. журн. — 2006. — №5. — С. 38-41.
  5. Машковский М.Д. Лекарственные средства — М.: Новая волна, 2010. — 1216 с.
  6. Balasubramanian D. The bitter truth // Everyman's Sci. — 2005. — Vol. 40, №4. — P. 284-286.
  7. Fatal blood and tissue concentrations of more than 200 drugs / F.Musshoff, S.Padosch, S.Steinborn [et al.] // Forensic. Sci. Internation. — 2004. — Vol. 142, №2-3. — P. 161-210.
  8. Hantson Ph. Convulsions in poisoning: Тез. [23 International Congress of the European Association of Poisons Centres and Clinical Toxicologists, Rome, May 20-23, 2003] // J. Toxicol. Clin. Toxicol. — 2003. — Vol. 41, №4. — P. 393-394.

**Е.А.Маміна, Н.Ю.Бевз, А.А.Бурьян, Е.А.Бурьян. Идентификация и количественное определение теофиллина методом производной спектрофотометрии в вытяжках из биологического материала. Харьков, Украина.**

**Ключевые слова:** теофиллин, производная спектрофотометрия, биологический материал.

*Применение метода производной спектрофотометрии устраняет влияние фона примесей при анализе теофиллина в вытяжках из биологического материала и позволяет опеределить 36,7-40,3% вещества. Определение теофиллина методом второй производной дает более надежные и объективные результаты по сравнению с использованием метода УФ-спектрофотометрии.*

**О.О.Маміна, N.U.Bevz, A.O.Buryan, K.O.Buryan. Identification and quatitative determination of theophylline by method derivative spectrophotometry in extractes from biological material. Kharkiv, Ukraine.**

**Key words:** theophylline, derivative spectrophotometry, biological material.

*The use of the method derivative spectrophotometry remove influence of background of admixtures for theophylline analysis in extractes from biological material and permit to determine 36,7-40,3% of substance is elaborated. The determination of theophylline by method of second derivative give more reliable and objective results by comparison with use of method UV-spectrophotometry.*

Надійшла до редакції 31.01.2010 р.