

## ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ХІНІНУ

**Ключові слова:** хінін, високоефективна рідинна хроматографія, екстракційна фотометрія, біологічний матеріал

Хінін — 6'-метоксихіноліл-(4')-[5-вінілхінуклідил-(2)]-карбінол — основний представник групи алкалоїдів хіноїної кори — похідних хіноліну. Хінін діє на збудника малярії і є одним з ефективних протималярійних засобів; він стимулює м'язи матки, тому в акушерській практиці використовується для збудження та посилення пологової діяльності.

Залежно від уживаної дози хінін може викликати побічні ефекти (головний біль, пригнічення центральної нервової системи, порушення зору). Передозування, самолікування хворих, сполучення з іншими ліками можуть спричинювати важкі та летальні отруєння, що зумовлює актуальність розробки ефективних та чутливих методик хіміко-токсикологічного дослідження хініну [4–6].

Розроблені раніше методи виділення хініну з біологічного матеріалу при використанні водних та спиртових розчинів багатостадійні, довготривалі та недостатньо ефективні, тому метою даної роботи є розробка схеми хіміко-токсикологічного аналізу тканини печінки трупів на наявність хініну при застосуванні високочутливих спектральних і хроматографічних методів та проведення порівняльної оцінки з іншими схемами аналізу цієї сполуки.

### Експериментальна частина

Для дослідження використовували модельні суміші 10 г тканини печінки без ознак гниття з 1,0 мг хініну гідрохлориду та холести проби. Через добу хінін ізолювали згідно з розробленою методикою [1, 3]: до проб додавали по 0,5 мл 25 % розчину амонію гідроксиду з подальшим розтиранням з 20–30 г безводного натрію сульфату та безперервним елююванням отриманої суміші 100 мл хлороформу зі швидкістю 60–80 крапель/хв при застосуванні скляної колонки. Хлороформові витяжки фільтрували крізь фільтр з 0,5–1 г безводного натрію сульфату.

Екстракційне очищення витяжок від домішок проводили гексаном, для чого отримані хлороформові витяжки упарювали на водяній бані досуха. Сухий залишок розчиняли в 20 мл 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої. Домішки екстрагували гексаном тричі по 15 мл (гексанову фазу не досліджували). Далі проводили екстракційне очищення витяжок при застосуванні хлороформу за методикою [2]: водну фазу підлюговували 25 % розчином амонію гідроксиду до рН 9–10 та екстрагували хлороформом порціями по 15 та 10 мл; емульсії руйнували центрифугуванням протягом 7–10 хв зі швидкістю 3000 об/хв (водну фазу не досліджували).

Очищення витяжок методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) виконували в умовах: хроматографічні пластинки «Сорбфіл»; система органічних розчинників — хлороформ—метанол (9:1); проявник — реактив Драгендорфа в модифікації за Мунье (чутливість проявника — 3–5 мкг хініну в плямі оранжевого кольору;  $R_f$  хініну = 0,71±0,75). Для кількісного визначення проводили порівняль-

не оцінювання чутливих методів високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та екстракційної фотометрії з метиловим оранжевим.

Після ТШХ-очищення частину хроматографічної пластинки, де розташований «свідок» (попередньо на лінію старту нанесено 20 мкг речовини з використанням 0,01 % хлороформного розчину хініну), проявляли відповідним реактивом. На рівні розташування плями досліджуваної речовини з частини пластинки, яка не була оброблена проявником, знімали шар сорбенту площею 4–5 см<sup>2</sup>, переносили на фільтр та тричі елюювали речовину хлороформом по 5 мл. Отриманий розчин упарювали на водяній бані та залишок розчиняли у 5 мл хлороформу.

1–2 мл хлороформного елюату упарювали та залишок розчиняли в 1 мл ацетонітрилу. Хроматографування досліджуваної речовини проводили в таких умовах[1]: на мікроколонковому рідинному хроматографі «Міліхром А-02» у зворотно-фазному варіанті при застосуванні металевої колонки з неполярним сорбентом «Nucleosil» – 100 – 5, С18 (з одержанням не менше ніж 5 хроматограм для кожного дослідження). Градієнтне елюювання отрути виконували сумішами розчинників: лінійний градієнт від елюенту А (10 % ацетонітрилу та 90 % буферного розчину рН 2,8) до елюенту Б (100 % ацетонітрилу) протягом 25 хв; при наданні розчиннику швидкості – 100 мкл/хв; при температурі колонки – 35–37 °С; при тиску насоса – 2,6–2,8 МПа; при об'єму проби для введення – 1–5 мкл. Багатоканальне детектування речовин проводили за 7 довжинами хвиль – 210, 230, 240, 260, 280, 300 та 330 нм.

Для ідентифікації застосовували абсолютні параметри утримування: час – 11,36±0,03 хв та об'єм – 1136,2 мкл, а також спектральні відношення, отримані при розділенні значень оптичної густини при довжинах хвиль від 230 нм до 330 нм – на значення оптичної густини при 210 нм:  $A_{230\text{ нм}}/A_{210\text{ нм}} = 0,621$ ;  $A_{240\text{ нм}}/A_{210\text{ нм}} = 0,936$ ;  $A_{260\text{ нм}}/A_{210\text{ нм}} = 0,356$ ;  $A_{280\text{ нм}}/A_{210\text{ нм}} = 0,038$ ;  $A_{300\text{ нм}}/A_{210\text{ нм}} = 0,091$ ;  $A_{330\text{ нм}}/A_{210\text{ нм}} = 0,001$ .

Кількісне визначення хініну методом ВЕРХ проводили за площами піків з використанням методу абсолютного калібрування. Для вивчення інтервалу лінійності градуувального графіка, побудованого на залежності площі піка аналізованої речовини ( $S$ , мм<sup>2</sup>) від її концентрації ( $C$ , мкг/мл), були приготовлені стандартні розчини з різним вмістом хініну гідрохлориду (5,0–100,0 мкг/мл).

Лінійність побудованої кривої у координатах ( $S$ ) – ( $C$ ) спостерігалась в інтервалі концентрацій 5,0 – 100,0 мкг/мл. Методом найменших квадратів розраховано коефіцієнти регресії градуувального графіка  $S = a + bC$ .

Для визначення вмісту хініну гідрохлориду в об'єктах дослідження застосовували рівняння вигляду –  $S = 0,0016 + 0,0051C$ , коефіцієнт кореляції дорівнював 0,9998. Використовуючи модельні розчини, перевіряли відтворюваність та надійність результатів, отриманих за розробленою методикою. Відносна невизначеність аналізу становила +2,21 %. Кількісне визначення хініну методом екстракційної фотометрії проводили після ТШХ-очищення за методикою[3]: зону сорбента відповідно до плями «свідка» знімали та тричі елюювали 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої по 5 мл. Елюати фільтрували у мірну колбу на 25 мл та доводили вищезазначеним розчинником до мітки. В ділильні лійки вносили по 5,0 мл ацетатного буферного розчину (рН 4,6); 1,0 мл отриманого розчину аналізованої речовини; 5,0 мл 0,1% розчину метилового оранжевого та 15,0 мл хлороформу. Ділильні лійки струшували на механічному струшувачі АВУ-6с з частотою 120 стр/хв протягом 3–5 хв та залишали на 3–5 хв для розділення фаз.

Перші порції органічної фази (близько 1 мл) відкидали, а до кінцевого об'єму – 14 мл забарвленого у жовтий колір органічного шару, зібраного в мірний циліндр, який фільтрували через 0,5 г безводного натрію сульфату. Потім додавали 2,0 мл 1 % розчину концентрованої кислоти сірчаної в абсолютному етиловому спирті та отримували розчини, забарвлені в червоно-фіолетовий колір.

Оптичну густину отриманих забарвлених розчинів вимірювали за допомогою фотоелектроколориметра КФК-2 при товщині кювети 20 мм та світлофільтрах з  $\lambda_{\text{max}} 540 \pm 10$  нм. Як розчин порівняння при проведенні аналізу витяжок з біологічного матеріалу брали розчини, отримані з контрольних дослідів.

Для визначення вмісту хініну застосовували градувальний графік, побудований на залежності оптичної густини досліджуваних розчинів (А) від концентрації речовини (С, мкг/мл), лінійність якого спостерігали в інтервалі концентрацій 10,0 – 120,0 мкг/мл. Коефіцієнти регресії градувального графіка  $A = 0,01 + 0,009C$ , коефіцієнт кореляції дорівнював 0,9997. Відносна невизначеність аналізу модельних розчинів становила +1,93 %.

Результати кількісного визначення хініну у тканині печінки при застосуванні методів ВЕРХ та екстракційної фотометрії, наведені в таблиці, свідчать, що за розробленими методиками з біологічного матеріалу виділено 72,1% хініну з відносною невизначеністю експерименту –  $\pm 2,9\%$  (ВЕРХ-метод) та 69,3% хініну з відносною невизначеністю експерименту –  $\pm 3,2\%$  (метод екстракційної фотометрії).

*Результати кількісного визначення хініну у витяжках з тканини печінки (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
ВЕРХ	1,0	70,0–74,2	72,1	2,82	1,68	0,75	2,09	2,9
Екстракційна фотометрія	1,0	67,1–71,5	69,3	3,13	1,77	0,79	2,21	3,2

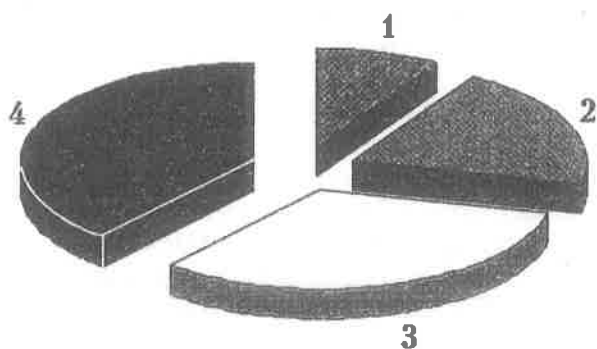


Рис. Порівняльна оцінка методів ізолювання хініну з тканини печінки:

- 1 – водою, підкисленою кислотою щавлевою (метод Васильєвої О.О.);
- 2 – спиртом, підкисленим кислотою щавлевою (метод Стаса-Отто);
- 3 – водою, підкисленою кислотою сірчаною (метод Крамаренка В.П.);
- 4 – хлороформом

Результати порівняльної оцінки за F-критерієм методів ВЕРХ та екстракційної фотометрії свідчать про їх незначні розбіжності, що вказує на однакову відтворюваність розроблених методик. При проведенні порівняльної оцінки отриманих результатів з результатами ізолювання хініну гідрофільними та амфільними розчинниками встановлено, що розроблена схема хіміко-токсикологічного дослідження хініну з використанням ліпофільного розчинника є найбільш ефективною (рисунок). Отримані

результати можуть бути рекомендовані для впровадження у практику судово-токсикологічної експертизи.

## Висновки

1. Розроблено схему хіміко-токсикологічного аналізу хініну, при застосуванні якої можна виділити 69,3– 2,1 % речовини з тканини печінки трупа.

2. При порівнянні методів аналізу (високоєфективної рідинної хроматографії та екстракційної фотометрії) за F-критерієм встановлено їх однакову відтворюваність і придатність для дослідження біологічних об'єктів.

3. Встановлено, що ізолювання хініну хлороформом з тканини печінки найбільш ефективно у порівнянні з водними та спиртовими розчинами.

1. Болотов В.В., Безуглый П.А., Мамина Е.А. // Запорожский мед. журн. — 2007. — № 6. — С. 155–159.
2. Мамина О.О., Болотов В.В. // Фармац. журн. — 2006. — № 5. — С. 81–85.
3. Мамина О.О., Болотов В.В. // Запорожский мед. журн. — 2006. — № 5. — С. 38–41.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства — М.: ООО «Изд-во «Новая волна», 2010. — 1216 с.
5. Ходжаева Н.М., Зияева Д.М., Токмалаев А.К. // Инфекц. болезни. — 2008. — Т. 6, № 2. — С. 97–99.
6. Adam I., Osman M.E., Elghzali G., Ahmed G.I., Gustafssons L.L., Elbashir M.I. // Ann. Trop. Med. and Parasitol. — 2004. — Vol. 98, № 7. — P. 661–666.

Надійшла до редакції 24.06.2010.

*Е.А.Мамина, Н.В.Гарная, А.Н.Лебедін*

#### ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ХИНИНА

**Ключевые слова:** хинин, высокоэффективная жидкостная хроматография, экстракционная фотометрия, биологический материал

Разработана схема химико-токсикологического анализа хинина, позволяющая выделить и определить 69,3–72,1 % вещества. Проведена сравнительная оценка методов определения хинина в ткани печени высокоэффективной жидкостной хроматографией и экстракционной фотометрией. При сравнении методов по F-критерию установлены их одинаковая воспроизводимость и пригодность для исследования биологических объектов.

*Ye.A.Mamina, T.V.Garnaya, A.N.Lebedin*

#### CHEMICAL-TOXICOLOGICAL INVESTIGATION OF QUININE

**Key words:** quinine, Highly-effective liquid chromatography method, Extraction-photometric method, biological material

#### SUMMARY

The scheme of chemical-toxicological analysis of quinine, which permit to evolve and determine 69,3–72,1 % substance is elaborated. The comparative estimation methods of determination of quinine in liver tissue — Highly-effective liquid chromatography and Extraction-photometry has been conducted. With comparison of methods by F-criterion their same reproduction and suitable for investigation of biological objects has been established.