

## ОСОБЕННОСТИ ИЗОЛИРОВАНИЯ НИФЕДИПИНА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Л. Л. Квачахия, В. К. Шорманов, Н. Е. Дорожкина, Е. А. Ананьева

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России

Поступила в редакцию 24.02.2018 г.

**Аннотация.** Нифедипин – желтый кристаллический порошок с температурой плавления 172-174°C, очень хорошо растворимый в ДМСО, хлороформе, практически нерастворимый в воде и трудно растворимый в этаноле. Является селективным блокатором «медленных» кальциевых каналов, производным 1,4-дигидропиридина. Оказывает вазодилатирующее, антиангинальное и антигипертензивное действие.

В качестве изолирующего агента для извлечения нифедипина из биологического материала предложен ацетон. Установлено, что оптимальные условия извлечения нифедипина из биологического материала достигаются уже при двукратном настаивании биологического объекта с изолирующим агентом, если массовое соотношение изолирующей жидкости и биоматериала на каждом этапе настаивания составляет не менее 2:1, а продолжительность настаивания – как минимум 30 минут. Оптимальные условия очистки нифедипина достигались в макроколонке сорбента «Силасорб С-18» 30 мкм высотой 150 мм и диаметром 10 мм при элюировании вещества полярным элюентом ацетонитрил-вода (7:3).

Для идентификации и количественного определения исследуемого соединения использовали методы тонкослойной хроматографии (ТСХ), газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ-МС) и УФ-спектрофотометрии.

Для определения нифедипина методом ГХ-МС в предложенных условиях значение времени удерживания стандарта нифедипина составляет  $9.18 \pm 0.08$  минуты. В масс-спектре стандарта нифедипина отмечается присутствие сигналов характерных осколков (заряженных частиц), Основным (масса которого принимается за 100 %) является осколок с массой 329.

Количественное содержания нифедипина проводили методом электронной спектрофотометрии, исходя из интенсивности поглощения этанольного элюата в области 240 нм, используя уравнение градуировочного графика. Как свидетельствуют данные таблицы, рост содержания нифедипина в модельных смесях от 2.50 до 50.00 мг в 25 г биоматериала сопровождается изменением степени извлечения, не превышающим 2.1 %.

**Ключевые слова:** нифедипин, изолирование, биологический материал, очистка, идентификация и количественное определение.

Нифедипин (2,6-диметил-4-(2-нитрофенил)-1,4-дигидропиридин-3,5-дикарбоксилат) является селективным блокатором «медленных» кальциевых каналов, производным 1,4-дигидропиридина. Оказывает вазодилатирующее, антиангинальное и антигипертензивное действие [1-4]. Уменьшает ток ионов кальция в кардиомиоциты и гладкомышечные клетки коронарных и периферических артерий; в высоких дозах подавляет высвобождение ионов кальция из внутриклеточных депо [1, 5, 6].

По физическим свойствам нифедипин – желтый кристаллический порошок с температурой

плавления 172-174°C, очень хорошо растворимый в ДМСО, хлороформе, практически нерастворимый в воде и трудно растворимый в этаноле [5, 7-10].

Данное вещество токсично для теплокровных животных и человека. Его  $LD_{50}$  при внутрижелудочном введении лабораторным животным составляет 1022 мг/кг. Известны случаи летального отравления людей нифедипином при ошибочном приеме, завышении доз в процессе лечения или с целью самоубийства. Отмечены многочисленные летальные отравления нифедипином людей на территории Российской Федерации и за рубежом [7, 12-16].

Токсические свойства, широкое применение нифедипина, наличие случаев летального отрав-

© Квачахия Л. Л., Шорманов В. К., Дорожкина Н. Е., Ананьева Е. А., 2019

ления делают его потенциальным объектом судебно-химического исследования.

Вопросы определения нифедипина в биологических матрицах разработаны недостаточно [6, 16-20].

Целью работы явилось изучение особенностей изолирования нифедипина из биологического материала.

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объект исследования - субстанция нифедипина с содержанием основного вещества не менее 99.9%, соответствующая НД [5].

Изучали особенности изолирования нифедипина из биологического материала растворителями различной химической природы: водой и водными растворами кислой и щелочной реакции, а также гидрофильными и гидрофобными органическими жидкостями, применявшимися ранее при химико-токсикологических исследованиях других органических соединений [16, 21].

Для этого готовили модельные смеси нифедипина (размер частиц 5-50 мкм) и мелкоизмельченной (размер частиц 0.2-0.4 мм) ткани печени с содержанием 25 мг вещества в 25 г биологического материала и выдерживали 1.5 часа при 18-22°C. Каждую из модельных смесей заливали двойным по массе количеством того или иного изолирующего агента и выдерживали в течение 45 минут в условиях периодического перемешивания. По истечении указанного времени жидкую часть смеси (извлечение) отделяли от твёрдого остатка, а процесс настаивания повторяли в описанном выше режиме. Первое и второе извлечения сливали в одну выпарительную чашку, растворитель и остатки воды испаряли в токе воздуха (температурный интервал 18-22°C) до получения сухого остатка [6, 16].

Сухой остаток растворяли в 10-15 мл ацетона, перенося полученный раствор в мерную колбу вместимостью 20 мл, и доводили содержимое колбы до метки ацетоном. 0,2-0,6 мл ацетонового раствора наносили на линию старта пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-А-УФ. Рядом на линию старта наносили 5-10 мкл 0.08% раствора (в этаноле) вещества-свидетеля. Хроматографировали, используя элюент хлороформ-диоксан (2:8). Получаемые тонкослойные хроматограммы проявляли, облучая их УФ-светом с длиной волны 254 нм. Нифедипин проявлялся на хроматограммах в виде пятна с  $R_f$ , соответствующим  $R_f$  вещества-свидетеля. Часть хроматограммы с находящимся на ней пятном исследуемого вещества вырезали, вносили в градуированную пробирку вместимостью 10 мл и элюировали вещество из сорбента в течение

15 минут 5 (10) мл этанола в режиме периодического перемешивания. Полученный этанольный элюат отделяли в кварцевую кювету с длиной оптического пути 10 мм и проводили исследование его светопоглощения в диапазоне длин волн от 200 до 500 нм на спектрофотометре модели СФ-2000. Если оптическая плотность элюата превышала 1.2, его разбавляли этанолом.

Нифедипин идентифицировали по форме спектральной кривой и положению максимумов полос поглощения в области 240 нм и 325 нм.

Количественное определение нифедипина проводили по интенсивности поглощения его этанольного раствора в области 240 нм, используя уравнение градуировочного графика и пересчитывали на навеску, внесённую в модельную смесь.

Оптимальный изолирующий агент определяли по наибольшему значению степени извлечения вещества из модельных смесей.

Используя приведённую выше схему изолирования, очистки и определения нифедипина, исследовали зависимость степени извлечения данного вещества из биологического материала оптимальным изолирующим агентом от продолжительности контакта изолирующей жидкости с биоматериалом, кратности настаивания и количественного соотношения изолирующего агента и биологического объекта.

Изучены особенности очистки нифедипина, выделенного из биоматериала, методом обращённо-фазовой колоночной хроматографии (колонок сорбента «Силасорб С-18» 30 мкм размерами 120×11 мм). Аналит элюировали из колонки двухкомпонентным полярным элюентом ацетонитрил-вода (7:3). Фракции элюата, истекающего из макроколонки (по 2 мл каждая), собирали в градуированные пробирки. Нифедипин обнаруживали во фракциях методом ТСХ (пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-А-УФ; элюент хлороформ-диоксан (2:8); наносимый на пластину объём каждой фракции - 5 мкл).

В данных условиях проводили контрольное хроматографирование на колонке извлечения из 25 г ткани печени, заведомо не содержащей нифедипин. Фракции элюата, в которых теоретически возможно присутствие анализируемого вещества, объединяли, испаряли и растворяли остаток в 5-7 мл этанола, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили этанолом до метки и измеряли оптическую плотность раствора при 240 нм (условия количественного определения нифедипина).

Изучены особенности идентификации рассматриваемого вещества сочетанием методов газовой хроматографии и масс-спектрометрии (ГХ-МС). В работе использовали хроматограф фирмы Agilent Technologies (США) модели 6890N с масс-селективным квадрупольным детектором модели 5973N (Agilent Technologies). Процесс хроматографирования осуществляли в колонке DB-1MS (J&WScientific, США) с неподвижной жидкой фазой диметилполисилоксан (длина колонки 30 м, внутренний диаметр 0.25 мм, толщина пленки фазы 0.25 мкм). В качестве газа-носителя использовался гелий. Подача газа-носителя производилась со скоростью 39 см/с. Проба вводилась в режиме без деления потока, задержка 3 мин. Фрагментация молекул аналита в ионизационной камере осуществлялась с использованием электронного удара (70 эВ). Обнаружение вещества проводилось в режиме регистрации по полному ионному току (диапазон сканирования 40-550 m/z).

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты изолирования нифедипина из трупной печени различными растворителями представлены на рис. 1.

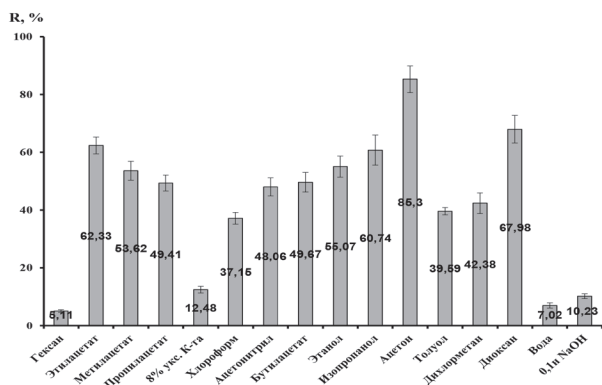


Рис. 1. Зависимость степени извлечения (R, %) нифедипина из ткани печени (n=5) от природы изолирующего агента (двукратное изолирование, соотношение «изолирующий агент – биоматериал» 2:1 (по массе))

Сравнение результатов изолирования показало, что наибольшая степень извлечения (85±4.65 %) достигается при использовании в качестве изолирующего агента ацетона.

Результаты исследования зависимости величины степени извлечения рассматриваемого соединения из биологического материала ацетоном от продолжительности контакта изолирующей жидкости с биологическим материалом представлены на рис. 2.

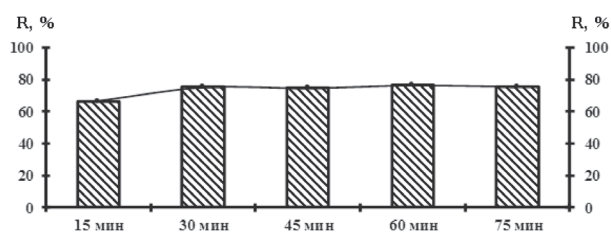


Рис. 2. Результаты изучения зависимости степени извлечения нифедипина из биоматериала ацетоном (n=5) от продолжительности контакта изолирующего агента с биологическим объектом

Как видно из рис. 2, оптимальные условия изолирования достигаются при продолжительности настаивания не менее 30 минут.

Проведённое изучение зависимости степени извлечения анализируемого вещества из биологического материала ацетоном от кратности настаивания и количественного соотношения изолирующего агента и биологической ткани показало, что оптимальные условия могут быть достигнуты уже при двукратном настаивании и массовом соотношении изолирующей жидкости и биологического объекта 2:1.

При идентификации в тонком слое сорбента нифедипин проявлялся на хроматограммах в УФ-свете в виде темных розово-фиолетовых пятен на более светлом общем фоне пластины. В видимом свете пятно нифедипина имело жёлтую окраску. Анализируемое вещество идентифицировали на основе совпадения значения его абсолютной хроматографической подвижности (Rf) в тонком слое силикагеля со значением Rf вещества-стандарта (0.85±0.03).

По результатам идентификации нифедипина методом электронной спектрофотометрии отмечается совпадение формы спектральных кривых аналита, извлечённого из биоматрицы, а также положения в них максимумов (при 240 и 325 нм) с этими же характеристиками вещества-стандарта.

По величине оптической плотности этанольного элюата, измеренной в области 240 нм, рассчитывали количественное содержание нифедипина, используя уравнение градуировочного графика, которое в настоящем случае имело следующий вид:  $A=0.062517 \cdot C+0.025457$  (коэффициент корреляции 0.99955), в котором А - оптическая плотность фотометрируемого раствора, С – содержание нифедипина в фотометрируемом растворе (мкг/мл). Полученный результат пересчитывали на необходимое количество той или иной биоматрицы.

Моделирование очистки нифедипина методом обращённофазовой колонной хроматографии в заданных условиях показало, что вещество элюируется с 7 по 12 мл элюата (фракции 4-6).

Предложены условия определения нифедипина методом ГХ-МС: начальная температура термоста-та колонки составляла 80°C (задержка на 2 минуту), температура программировалась от 80°C до 250°C со скоростью 40°C в минуту с выдержкой при конечной температуре 6 минут, температура инжектора составляла 280°C, температура интерфейса – 300°C.

В предложенных условиях проведения идентификации методом ГХ-МС значение времени удерживания стандарта нифедипина составляет  $9.18 \pm 0.08$  минуты.

В масс-спектре стандарта нифедипина отмечается присутствие сигналов характерных осколков (заряженных частиц), наиболее интенсивными из которых являются частицы с массами ( $m/Z$ ): 224, 284 и 329. Основным (масса которого принимается за 100 %) является осколок с массой 329.

### МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИФЕДИПИНА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

**Изолирование.** В каждом случае 25.00 г мелкоизмельченной ткани печени, содержащей определенное количество нифедипина (от 2.50 до 50.00 мг), заливали 50 г ацетона и выдерживали в течение 45 минут при периодическом перемешивании. Извлечение сливали, а процесс настаивания повторяли по описанной выше схеме. Отдельные извлечения объединяли в фарфоровой чашке и упаривали в токе воздуха при 18-22°C до сухого остатка.

**Очистка извлеченного соединения.** Сухой остаток подвергали обработке 2.1 мл ацетонитрила, прибавляли 0.9 мл воды, получаемый раствор вносили в макроколонку (120x11 мм) сорбента «Силасорб С-18» 30 мкм. Аналит вымывали из колонки двухкомпонентным полярным элюентом ацетонитрил-вода (7:3). Фракции элюата, истекающего из макроколонки (по 2 мл каждая), собирали в градуированные пробирки. Серию фракций с 4 по 6 сливали в выпарительную чашку, а растворители удаляли из чашки, помещая её в поток воздуха комнатной температуры. После этого остаток обрабатывали 5-7 мл этанола, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили этанолом до метки (исходный раствор).

В две фарфоровые выпарительные чашки (№ 1 и № 2) вносили по 1.0-4.5 мл исходного раствора и удаляли из него растворитель в потоке воздуха комнатной температуры.

**Идентификация в тонком слое сорбента.** Остаток, находящийся в чашке № 1, обрабатывали небольшими порциями этанола по 0.2-0.3 мл, количественно перенося раствор в виде полосы

на линию старта хроматографической пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-А-УФ. Рядом на линию старта наносили 5-10 мкл 0.08% раствора (в этаноле) вещества-свидетеля. Хроматографировали, используя элюент хлороформ-диоксан (2:8). Получаемые тонкослойные хроматограммы проявляли, облучая их УФ-светом с длиной волны 254 нм. Нифедипин, идентифицировали по величине  $R_f$ .

**Идентификация с использованием электронной спектрофотометрии.** Часть хроматограммы с находящимся на ней пятном исследуемого вещества вырезали, вносили в градуированную пробирку вместимостью 10 мл и элюировали вещество из сорбента в течение 15 минут 5 (10) мл этанола в режиме периодического перемешивания. Полученный этанольный элюат отделяли в кварцевую кювету с длиной оптического пути 10 мм и проводили исследование его светопоглощения в диапазоне длин волн от 200 до 500 нм на спектрофотометре модели СФ-2000. Если оптическая плотность элюата превышала 1.2, его разбавляли этанолом.

Исследуемое вещество идентифицировали по характеру поглощения этанольного раствора в выбранном интервале длин волн (максимумы поглощения при  $240 \pm 3$  нм,  $325 \pm 2$  нм).

**Идентификация методом ГХ-МС.** Сухой остаток, находящийся в выпарительной чашке № 2, обрабатывали 2 мл трихлорметана. 4 мкл, взятые из полученного раствора, вводили в хроматограф фирмы Agilent Technologies (США) модели 6890N с масс-селективным квадрупольным детектором модели 5973N (Agilent Technologies). Процесс хроматографирования осуществляли в колонке DB-1MS (J&WScientific, США) с неподвижной жидкой фазой диметилполисилоксан (длина колонки 30 м, внутренний диаметр 0.25 мм, толщина пленки фазы 0.25 мкм) в условиях, описанных выше. Анализируемое соединение идентифицировали как по значению времени удерживания, так и по совпадению его масс-спектра с масс-спектром стандарта на 86% и более.

В предложенных условиях проведения идентификации методом ГХ-МС значение времени удерживания нифедипина, извлеченного из биоматериала, совпадало с таковым вещества-стандарта и соответствовало интервалу  $9.18 \pm 0.12$  минуты (рис. 3).

При сравнении хроматограмм исследуемого соединения с хроматограммой вещества-стандарта (ГХ-МС) не наблюдалось присутствие дополнительных пиков и заметного смещения базовой линии в зоне, соответствующей промежутку значений времени удерживания 8.50-9.50 мин.



Масс-спектры нифедипина и нифедипина, извлечённого из биологического материала представлены на рис. 4.

Сравнение масс-спектров вещества-стандарта и нифедипина, выделенного из биоматриц, показывают, что в масс-спектре стандарта нифедипина, так же как и в масс-спектре исследуемого вещества, извлечённого из биологических объектов, отмечается присутствие сигналов характерных заряженных частиц, наиболее интенсивными из которых являются частицы с массами ( $m/Z$ ): 224, 284 и 329. Основной ион – 329.

Количественное определение. Оценку количественного содержания нифедипина проводили методом электронной спектрофотометрии, исходя из интенсивности поглощения этанольного элюата в области 240 нм (кварцевая кювета,  $l = 1$  см), используя уравнение градуировочного графика.

Результаты количественных определений нифедипина в модельных смесях с его различным содержанием представлены в таблице 1.

Таблица 1

*Зависимость степени извлечения (R, %) нифедипина из ткани печени от количества нифедипина в биологическом материале (по массе) (n = 5; P = 0.95)*

Внесено нифедипина (мг) на 25 г ткани печени	Найдено, % (n=5, p=0.95)				
	$\bar{X}$	S	$S_x$	$\Delta\bar{X}$	Sr, %
2.5	85.47	3.62	1.62	4.49	4.23
5.0	83.63	3.31	1.48	4.12	3.96
12.5	85.29	3.10	1.39	3.86	3.63
25.00	84.24	2.68	1.20	3.33	3.18
50.00	85.73	2.36	1.06	2.94	2.75

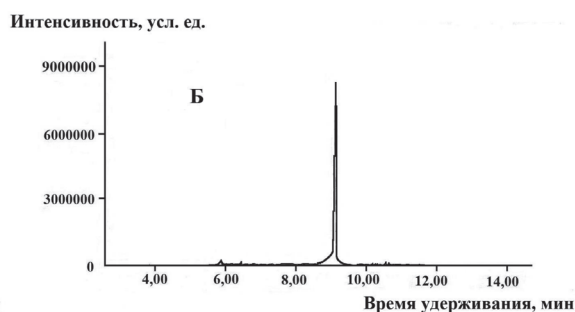
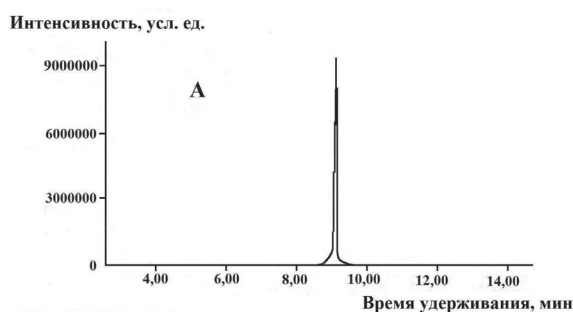


Рис. 3. Хроматограммы стандарта нифедипина (А) и нифедипина, извлечённого из биологического материала (Б)

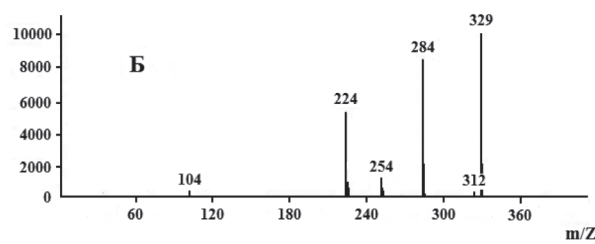
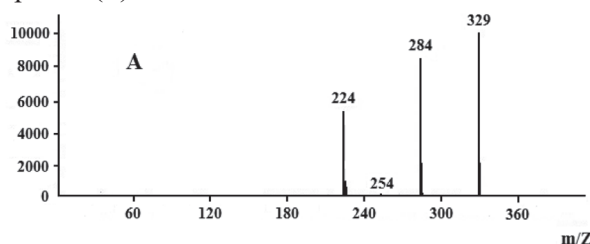


Рис. 4. Масс-спектры нифедипина (А) и нифедипина, извлечённого из биологического материала (Б)

Как свидетельствуют данные таблицы, рост содержания нифедипина в модельных смесях от 2.50 до 50.00 мг в 25 г биоматериала сопровождается изменением степени извлечения, не превышающим 2.1 %.

Использование в качестве изолирующего агента ацетона, предложенные условия изолирования и очистки позволяют достичь достаточно высокой степени извлечения анализируемого вещества из ткани печени трупов (83.63-85.73%). Открываемый минимум составляет  $1.6 \cdot 10^{-4}$  г нифедипина в 100 г биологического материала. Предложенная методика достаточно хорошо воспроизводима, отличается простотой выполнения, точностью, необходимой для целей судебно-химического анализа, не требует значительных затрат времени на воспроизведение. Она может быть использована в практике при проведении экспертизы в случае отравления нифедипином.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обоснована целесообразность использования ацетона в качестве изолирующего агента при химико-токсикологическом исследовании нифедипина.

Определены оптимальные условия изолирования рассматриваемого соединения ацетоном из биологического материала и очистки получаемых извлечений в колонке сорбента «Силасорб С-18» 30 мкм.

Показана возможность идентификации и количественной оценки содержания нифедипина в модельных смесях с тканью печени методами ТСХ, электронной спектрофотометрии и ГХ-МС после его изолирования ацетоном и очистки по предлагаемой схеме.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. 16-е изд., перераб., испр. и доп. Москва, Новая волна, 2012, 1216 с.
2. Rahman N., Azmi S.N.H. // Acta Biochimica Polonica-ENGLISH EDITION. 2005. Vol. 52, No. 4, pp. 915.
3. Kalleswarl E., Vasanthl R., Prasanth S., Raghuraman S. // Indian drugs. 2002. Vol. 39, No. 11, pp. 610-612.
4. Takahashi D., Oyunzul L., Onoue S. et al. // Biol Pharm Bull. 2008. Vol. 31, No. 3, pp. 473-479.
5. НД 42-11925-01. Нифедипин (субстанция) / На основе письма Департамента Государственного контроля лекарственных средств и медицинской техники. Москва, 2001, 18 с.
6. Шорманов В.К., Квачахия Л.Л. // Фармация. 2013. Т. 62. № 8. С. 16-19.
7. Clarke's analysis of drugs and poisons in Pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3rd ed. London, 2004, vol. 2, p. 550.
8. Nifedipine. DrugBank. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01115> (accessed January 25 2019).
9. Nifedipine. Product Information (Sigma Prod. No. N7634). Available at: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/2/n7634pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/n7634pis.pdf) (accessed January 25 2019).
10. Sardari F., Abolghasem J. // Industrial & Engineering Chemistry Research. 2013. Vol. 52, No. 40, pp. 14353-14358.
11. Cavagnaro F., Aglony M., Rios J. C., Paris E. // Veterinary and human toxicology. 2000. Vol. 42, No. 2, pp. 99-100.
12. Lee D.C., Greene T., Dougherty T., Pearigen P. // The Journal of emergency medicine. 2000. Vol. 19, No. 4, pp. 359-361.
13. Poole-Wilson P.A., Kirwan B.A., Voko Z. et al. // Cardiovasc Drugs Ther. 2006. Vol. 20, No. 1, pp. 45-54.
14. Espinoza T., Bryant S.M., Aks S.E. // Am J Ther. 2013. Vol. 20, pp. 29-31.
15. St-Onge M., Dubé P.A., Gosselin S. et al. // Clinical Toxicology. 2014. Vol. 52, No. 9? pp. 926-944.
16. Шорманов В.К., Квачахия Л.Л., Маркелов М.Ю., Конарева Е.Г. // Судебно-медицинская экспертиза. 2011. Т. 54. № 4. С. 31-34.
17. Guo Y., Dai J., Qian G. et al. // International journal of pharmaceutics. 2002. Vol. 341, No. 1, pp. 91-96.
18. Abou-Auda H.S., Najjar T.A., Al-Khamis K.I. et al. // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2000. Vol. 22, No. 2, pp. 241-249.
19. Tulasamma P., Venkateswarlu P. // Arabian Journal of Chemistry. 2016. Vol. 9, pp. 603-1609.
20. Revathi R., Ethiraj T., Saravanan V.S. et al. // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2010. Vol. 2, N 4, pp. 56-59.
21. Шорманов В.К., Квачахия Л.Л., Щербаков Д.П. и др. // Судебно-медицинская экспертиза. 2015. Т. 58. № 2. С. 39-45.

*Курский государственный медицинский университет*  
Квачахия Л. Л., канд. фарм. наук, доцент кафедры фармакологии  
E-mail: [Lekso82@yandex.ru](mailto:Lekso82@yandex.ru)

*Шорманов В. К., доктор фарм. наук, профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии,*  
E-mail: [r-wladimir@yandex.ru](mailto:r-wladimir@yandex.ru)

*Дорожжина Н. Е., студентка 4 курса*

*Ананьева Е. А., студентка 4 курса*

*FSEI HE «Kursk State Medical University»*  
Kvachakhiya L. L., PhD., associate professor of the department of pharmacology  
E-mail: [Lekso82@yandex.ru](mailto:Lekso82@yandex.ru)

*Shormanov V. K., PhD., DSci., Full Professor of the department of pharmaceutical, toxicological and analytical chemistry*  
E-mail: [r-wladimir@yandex.ru](mailto:r-wladimir@yandex.ru)

*Dorozhkina N. E., 4th year student*

*Ananjeva E. A., 4th year student*

## FEATURES OF NIFEDIPINE ISOLATION FROM BIOLOGICAL MATERIAL

L. L. Kvachakhiya, V. K. Shormanov, N. E. Dorozhkina, E. A. Ananjeva

*FGBOU VO «Kursk State Medical University»*

**Abstract.** Nifedipine is a yellow crystalline powder with a melting point of 172-174 °C, very soluble in DMSO, chloroform, practically insoluble in water and difficult to dissolve in ethanol. It is a selective blocker of "slow"

calcium channels, a derivative of 1,4-dihydropyridine. It has a vasodilating, antianginal and antihypertensive effect.

Acetone has been suggested as isolating agent for extraction of felodipine from biological material. Found that the optimum extraction conditions of nifedipine from biological material achieved already at twice infusion biological object with an insulating agent, if the weight ratio of the insulating liquid and biomaterial at each stage of the infusion is at least 2:1, and the duration of infusion - at least 30 minutes. Optimal purification conditions for nifedipine were achieved in the macrocolumn sorbent of the «Silasorb C-18» 30 µm in height 150 mm and 10 mm in diameter with elution of the substance with polar eluent acetonitrile-water (7: 3).

For identification and quantitative determination of the test compound were used thin layer chromatography (TLC), gas chromatography combined with mass spectrometry (GC-MS) and UV – spectrophotometry. For the determination of nifedipine by GC-MS under the proposed conditions, the value of the retention time of the standard nifedipine is  $9.18 \pm 0.08$  minutes. In the mass spectrum of the standard nifedipine, the presence of signals of characteristic fragments (charged particles) is noted, the main mass (which is taken as 100%) is a fragment with a mass of 329.

The quantitative content of nifedipine was performed by the method of electronic spectrophotometry, based on the intensity of the absorption of ethanol eluate in the region of 240 nm, using the equation of the calibration graph. According to the data in the table, an increase in the content of nifedipine in model mixtures from 2.50 to 50.00 mg per 25 g of biomaterial is accompanied by a change in the degree of extraction, not exceeding 2.1%.

**Keywords:** nifedipine, isolation, biological material, purification, identification and quantification.

## REFERENCES

1. Mashkovskij M.D. *Lekarstvennye sredstva*. 16-e izd., pererab., ispr. i dop. Moskow, Novaja volna, 2012, 1216 p.
2. Rahman N., Azmi S.N.H., *Acta Biochimica Polonica-ENGLISH EDITION*, 2005, Vol. 52, No. 4, pp. 915.
3. Kalleswarl E., Vasanthi R., Prasanth S., Raghuraman S., *Indian drugs*, 2002, Vol. 39, No. 11, pp. 610-612.
4. Takahashi D., Oyunzul L., Onoue S. et al., *Biol Pharm Bull*, 2008, Vol. 31, No. 3, pp. 473-479.
5. ND 42-11925-01. Nifedipin (substancija) / Na osnove pis'ma Departamenta Gosudarstvennogo kontrolja lekarstvennyh sredstv i medicinskoj tehniki. Moskow, 2001, 18 p.
6. Shormanov V.K., Kvachahiya L.L., *Farmatsiya*, 2013, Vol. 62, No. 8, pp. 16-19.
7. Clarke's analysis of drugs and poisons in Pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3rd ed. London, 2004, vol. 2, p. 550.
8. Nifedipine. DrugBank. Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01115> (accessed January 25 2019).
9. Nifedipine. Product Information (Sigma Prod. No. N7634). Available at: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/2/n7634pis.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/n7634pis.pdf) (accessed January 25 2019).
10. Sardari F., Abolghasem J., *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2013, Vol. 52, No. 40, pp. 14353-14358.
11. Cavagnaro F., Aglony M., Rios J. C., Paris E., *Veterinary and human toxicology*, 2000, Vol. 42, No. 2, pp. 99-100.
12. Lee D.C., Greene T., Dougherty T., Pearigen P., *The Journal of emergency medicine*, 2000, Vol. 19, No. 4, pp. 359-361.
13. Poole-Wilson P.A., Kirwan B.A., Voko Z. et al., *Cardiovasc Drugs Ther*, 2006, Vol. 20, No. 1, pp. 45-54.
14. Espinoza T., Bryant S.M., Aks S.E., *Am J Ther*, 2013, Vol. 20, pp. 29-31.
15. St-Onge M., Dubé P.A., Gosselin S. et al., *Clinical Toxicology*, 2014, Vol. 52, No. 9, pp. 926-944.
16. Shormanov V.K., Kvachahiya L.L., Markelov M.Ju., Konareva E.G., *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*, 2011, Vol. 54, No. 4, pp. 31-34.
17. Guo Y., Dai J., Qian G. et al., *International journal of pharmaceuticals*, 2002, Vol. 341, No. 1, pp. 91-96.
18. Abou-Auda H.S., Najjar T.A., Al-Khamis K.I. et al., *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2000, Vol. 22, No. 2, pp. 241-249.
19. Tulasamma P., Venkateswarlu P., *Arabian Journal of Chemistry*, 2016, Vol. 9, pp. 603-1609.
20. Revathi R., Ethiraj T., Saravanan V.S. et al., *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2010, Vol. 2, No. 4, pp. 56-59.
21. Shormanov V.K., Kvachahiya L.L., Shherbakov D.P. i dr., *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*, 2015, Vol. 58, No. 2, pp. 39-45.