

Винахід відноситься до біофармації і може бути використаний в роботі контрольно-аналітичних лабораторій фармацевтичних виробництв, центральних заводських лабораторій, біохімічних лабораторій клінік, лабораторій промислової токсикології, токсикологічних лабораторій санітарно-епідеміологічних станцій для поточного санітарного нагляду екологічної безпеки довкілля.

Відомий перманганатометричний спосіб визначення ДМСО, оснований на окисдації його розчином  $\text{KMnO}_4$  в кислому середовищі [1]. Недоліком цього способу є низька чутливість і складність виконання, бо він вимагає точного підтримання температури реакційної суміші  $65^\circ\text{C}$  протягом 1 год., що створює незручності, а необхідність застосування емпірично встановлених коефіцієнтів не забезпечує достовірності аналізу.

Відомий спосіб визначення ДМСО, який полягає в окисдації останнього відомою кількістю 0,1н. розчину  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  в кислому середовищі, нагріванні реакційної суміші протягом 1 год., охолодженням і додаванням до неї надлишку 5% розчину  $\text{KJ}$ , збовтуванням не менше 5хв. та наступним титруванням виділеного йоду 0,1н. розчином  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  до переходу коричневого забарвлення в синьо-зелене з проведенням розрахунків [2].

До недоліків цього способу відносяться також трудомісткість та низька чутливість, а тривалість виконання становить не менше 1 год. 20хв. при наявності готових реактивів.

Відомий спосіб йодометричного визначення ДМСО полягає у переведенні останнього з допомогою  $\text{CH}_3\text{COCl}$  у реакційно здатну форму, яка у звичайних умовах взаємодіє з  $\text{KJ}$ , і титруванні еквімолярної кількості виділеного йоду 0,1н. розчином  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . Тривалість способу при наявності готових реактивів - до 20хв. [3]. Однак суттєвим недоліком цього способу також є трудомісткість та обмежена чутливість -  $4 \cdot 10^{-5}\text{г/мл}$ .

Відомий спосіб визначення ДМСО, який вибраний прототипом, полягає в тому, що спочатку проводять реакцію вільнорадикальної окисдації ліпідів у присутності визначуваної кількості ДМСО з виділенням малонового діальдегіду, додаванні тіобарбітурової кислоти з утворенням забарвленого комплексу, кількісному колориметричному визначенні комплексу при довжині хвилі 533нм [4]. Цей спосіб є досить складним у виконанні навіть в оснащених апаратурою лабораторіях і використовується, в основному, для визначення препарату в біологічному матеріалі.

Суттєвим і основним недоліком способу є його низька репродуктивність, оскільки в ньому запропоновано екстрагувати ДМСО з біологічних рідин і тканин ацетоном чи хлороформом, які досить добре змішуються з ними і розчиняються в них, а при випарюванні цих розчинників випаровується і досліджуваний препарат (ДМСО), утворюючи при цьому каламутні розчини.

В основу винаходу поставлено завдання розробити вільний від вказаних недоліків чутливий і специфічний спосіб для визначення ДМСО в біологічних рідинах і тканинах організму, в лікарських формах, в повітрі робочої зони виробничих приміщень та в стічних водах підприємств.

Поставлене завдання досягається тим, що у способі екстракційно-колориметричного визначення диметилсульфоксиду (ДМСО), який полягає в проведенні реакції вільнорадикальної окисдації ліпідів у присутності визначуваної кількості ДМСО з виділенням малонового діальдегіду, додаванні до одержаного продукту тіобарбітурової кислоти з утворенням забарвленого триметинового комплексу, кількісному колориметричному визначенні цього комплексу при довжині хвилі 532-533нм, згідно з винаходом, реакцію окисдації ведуть в сильнокислому середовищі прямо в пробі і колориметричне визначення забарвленого триметинового комплексу проводять після екстракції його н-бутанолом, причому при визначенні кількісного вмісту ДМСО використовують різницю оптичної густини, отриманої в досліді, відносно контрольної (без ДМСО) проби.

Екстракція триметинового комплексу н-бутанолом забезпечує повну прозорість розчину, придатну для оптичних вимірювань.

Новизна винаходу полягає і в тому, що для визначення концентрації ДМСО в пробі використовують різницю оптичної густини (ДЦ) між контролем (без ДМСО) і дослідом, що забезпечує стабільні результати. Використання різниці оптичної густини (ДД), отриманої в досліді (Ддос), відносно контрольної (Дконтр.), дозволяє досягти високої точності дослідження і значної економії часу.

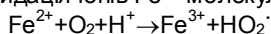
Проведення дослідження ДМСО прямо в пробі і без випарювання розчинників -екстрагентів є безсумнівною перевагою способу.

Суттєва відмінність і запропонована простота способу досягається прямим аналізом проби, обминаючи такі небажані операції, як екстракція ДМСО розчинниками, їх випарювання, що неминуче призводить до втрати визначуваної речовини (ДМСО).

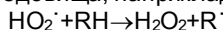
Запропонований спосіб розроблений на кафедрі токсикологічної і аналітичної хімії і перевірений на кафедрі органічної, біоорганічної і фармацевтичної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

Чутливість способу -  $1 \cdot 10^{-6}\text{г/мл}$ .

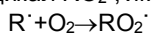
Для здійснення способу в якості генератора малонового діальдегіду використовують гомогенізатор мозку білого щура - препарат, багатий субстратами пероксидної окисдації ліпідів, що утворюється внаслідок вільнорадикального, ланцюгового механізму, який характерний для реакції окисдації органічних сполук безпосередньо молекулярним киснем, причому цей процес може початись лише в тому випадку, якщо в системі з'являться вільні радикали. Прикладом реакції, що приводить до появи радикалів, може бути окисдація іонів  $\text{Fe}^{2+}$  молекулярним киснем, при якому утворюється радикал  $\text{HO}_2^{\cdot}$  (пероксид):



Такий радикал має достатньо високу реакційну здатність і може прореагувати з молекулою оточуючого середовища, наприклад, з молекулою жирної кислоти. При цьому утворюється радикал ліпиду  $\text{R}^{\cdot}$ :

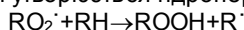


З цих реакцій починається ланцюговий процес окисдації, де ініціатором виступають іони  $\text{Fe}^{2+}$ . В присутності кисню радикали  $\text{R}^{\cdot}$  сполучаються з молекулами  $\text{O}_2$  і при цьому утворюється новий вільний радикал  $\text{RO}_2^{\cdot}$ , який називається пероксидним радикалом:

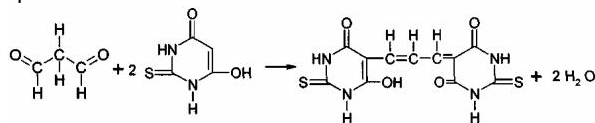


Пероксидний радикал може вступити у взаємодію з новою молекулою ненасиченої жирної кислоти, при

якій утворюється гідропероксид  $\text{ROOH}$  і знову появляється радикал  $\text{R}^{\cdot}$ :



Чергування останніх двох реакцій приводить до того, що в процес втягуються все нові і нові молекули ліпиду  $\text{RH}$  і кисню; при цьому утворюються молекули гідропероксиду і нові вільні радикали, які ініціюють нові ланцюги окисації. Цей процес в цілому називається пероксидною окисацією, кінцевим продуктом якої є малоновий діальдегід  $\text{O}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{O}$ , що далі вступає в реакцію з тіобарбітуровою кислотою, утворюючи триметинний комплекс:



Швидкість цих реакцій значно зростає при проведенні їх в сильноокислому середовищі. Використання цього фактора дозволило скоротити час утворення комплексу до 30хв. замість 60хв.

Запропонований спосіб здійснюють таким чином.

Виготовлення субстрату. Для проведення реакції пероксидної окисації ліпідів і генерації малнового діальдегіду виготовляють субстрат головного мозку білого щура: щура декапітують, виділяють мозок і розтирають в фарфоровій ступці з порошком тертого нейтрального скла у співвідношенні 1:1, додають порціями холодний фізіологічний розчин з розрахунку - на 1,0г тканини мозку - 10мл фізіологічного розчину, весь час розтираючи і зливаючи отриманий гомогенізатор в окрему пробірку, який після відстоювання у вигляді напівпрозорої рідини використовують для проведення досліджень.

Побудова калібрувального графіка. Субстрат по 0,2мл вносять в ряд пробірок, додають по 1мл розведених розчини ДМСО в концентраціях від 0,5мкг до 24мг/мл і необхідні реактиви для проведення реакції пероксидної окисації ліпідів з дотриманням певних температур та інтервалів у часі:

в кожну пробірку додають по 0,5мл 1мМ розчину  $\text{KMnO}_4$  (15,8мг в 100мл води), перемішують; через 10хв. додають 1мл 10мМ розчину  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (278мг в 100мл води) і перемішують; через 10хв. додають 0,5мл 1н.  $\text{HCl}$ ; остаточно перемішують і додають 1,5мл 0,8% розчину тіобарбітурової кислоти. Пробірки позначають по порядку і ставлять на киплячу водяну лазню на 30хв., опісля їх охолоджують, додають в кожну по 4мл н-бутанолу і збовтують вміст пробірок протягом 5хв. Для повного і швидкого розшарування рідин вміст пробірок відцентрують протягом 5хв. з швидкістю 3000об./хв., екстракт відбирають піпеткою і вимірюють оптичну густину при довжині хвилі 532-533нм з допомогою спектрофотометра або ФЕКа напроти чистого розчинника (н-бутанол). Паралельно проводять контрольний дослід зі субстратом (без ДМСО). По отриманій різниці оптичних густин ДД будують калібрувальний графік залежності ДЦ від концентрації "С" ДМСО в десяткових логарифмах. По величині ДД в досліді за калібрувальним графіком знаходять  $\lg "C"$  ДМСО, а з допомогою антилогарифмів визначають дійсну величину "С" в мкг або мг в пробі. Експериментально доведено, що калібрувальна пряма підпорядковується закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 1мкг до 20мг ( $\lg "C"=0-4,3$ ).

Проведення аналізу. Аналіз здійснюють як при побудові калібрувального графіка, лише замість розведених розчинів ДМСО вносять у пробірки відповідні проби для визначення ДМСО (не менше трьох паралельних визначень).

Можливість здійснення запропонованого способу підтверджується нижченаведеними прикладами визначення ДМСО.

#### Приклад 1

Кількісне визначення ДМСО в лікарській формі. До 0,2мл лікарської форми (водний розчин препарату) додають 0,2мл субстрату і проводять реакцію пероксидної окисації ліпідів з усіма реактивами, як описано вище. Вимірюють оптичну густину і визначають ДЦ, а по калібрувальному графіку і за антилогарифмами знаходять концентрацію ДМСО в пробі.

У випадку мазеподібних лікарських форм та лініментів ДМСО екстрагують водою і далі проводять реакцію аналогічно, враховуючи вихідну кількість лікформи для аналізу і її розведення.

#### Приклад 2

Визначення кількісного вмісту ДМСО в "Розчині димексиду 30% для ін'єкцій". 1мл лікформи розводять в мірній колбі до 100мл водою, відбирають мірною піпеткою 1мл цього розчину (в ньому повинно бути 3мг ДМСО) на дослідження за описаним вище способом. В досліді отримано  $\text{ДД}=0,226$ , а звідси по калібрувальному графіку знаходимо " $\text{С}^{\text{кал.}}=3,48$ "; за антилогарифмами це становить 3,02мг. Проводимо розрахунок:

" $\text{С}^{\text{кал.}}=3,02 \cdot 100=302\text{мг/мл}$ , де: 100 - розведення. Або: " $\text{С}^{\text{кал.}}=0,302\text{г/мл}$ , а в 100мл є 30,2г, тобто виготовлений розчин є 30,2%.

#### Приклад 3

Визначення кількісного вмісту ДМСО в мазі складу: анестезину - 4,0, діаміфену - 1,0, димексиду - 40,0, емульгатора - 15,0, води 40,0.

Відважують точно 0,1г мазі ( в ній повинно бути 0,04г ДМСО ) в мірну пробірку, додають 5мл води і нагрівають майже до кипіння. Після охолодження відбирають 1мл цього екстракту (в ньому повинно бути біля 8мг ДМСО) і проводять реакцію пероксидної окисації ліпідів, як описано вище при побудові калібрувального графіка. За визначеною величиною  $\text{ДД}=0,25$  по калібрувальному графіку знаходять  $\lg "C"$ , а за антилогарифмами - дійсну величину "С" в мг/г, враховуючи при розрахунку розведення (50): " $\text{С}^{\text{кал.}}=3,9$ ;  $\text{ant.lg}=7,943$ ; звідси: " $\text{С}^{\text{кал.}}=7,943 \cdot 50=397,15\text{мг/г}$  або 39,715г ДМСО в 100г мазі.

#### Приклад 4

Визначення кількісного вмісту ДМСО в тканині мозку піддослідних тварин: в дослідного щура після введення димексиду з метою визначення його концентрації відділяють головний мозок, готують субстрат на фізіологічному розчині у співвідношенні 1:10 і далі проводять визначення, як описано вище. Визначають ДД,

по якій за калібрувальним графіком знаходять концентрацію ДМСО в пробі, тобто в 0,2мл субстрату. Концентрацію ДМСО в 1г тканини мозку розраховують за формулою:

"C"="C"кал.:50 в мкг/г,

де: "C"кал. - концентрація ДМСО, знайдена за калібрувальним графіком;

50 - розведення.

Приклад 5

Визначення кількісного вмісту ДМСО в сечі. З дослідної проби сечі відбирають 1мл і екстрагують з неї ДМСО в ділительній лійці на 10мл бензолом 3 рази по 3мл, екстракти об'єднують, додають 0,2мл субстрату і проводять реакцію пероксидної оксидзації ліпідів, як описано вище. За величиною ДД по калібрувальному графіку та антилогарифмами знаходять концентрацію ДМСО (в мкг чи мг) в 1мл сечі.

Приклад 6

Визначення кількісного вмісту ДМСО в сироватці крові: з 0,2мл сироватки крові (дослід) і паралельно з 0,2мл - в окремій пробірці (контроль, без ДМСО), проводять реакцію пероксидної оксидзації ліпідів без субстрату, оскільки ліпідні компоненти є присутні в сироватці крові. Концентрацію ДМСО в 1мл сироватки розраховують за формулою:

"C"="C"кал.:5 в мкг/мл,

де: "C"кал. - концентрація ДМСО, знайдена за калібрувальним графіком;

5 - розведення.

Приклад 7

Визначення кількісного вмісту ДМСО в тканині органів піддослідних тварин: з допомогою пункції досліджуваних органів набирають до 0,5мл субстрату і вносять по 0,2мл в 2 пробірки (для паралельних визначень) і в окрему пробірку 0,2мл субстрату таких органів без ДМСО (контроль): проводять реакцію пероксидної оксидзації ліпідів (без субстрату мозку). По отриманій ДД за калібрувальним графіком знаходять концентрацію ДМСО в 1мл субстрату органу аналогічно, як і в попередніх випадках за формулою:

"C"="C"кал.:5 в мкг/мл або мкг/г.

Приклад 8

Визначення кількісного вмісту ДМСО в стічних водах підприємств: з пробою досліджуваної води об'ємом 50мл проводять реакцію пероксидної оксидзації ліпідів, як описано вище. Після екстракції продукту реакції визначають ДД, яке в досліді дорівнює 0,058, що відповідає за калібрувальним графіком  $\lg "C" = 0,78$ . За антилогарифмами це становить 6мкг в пробі (тобто в 50мл), а в 1л=6мкг·20=120мкг/л.

Приклад 9

Визначення кількісного вмісту ДМСО в повітрі робочої зони виробничих приміщень. Повітря робочої зони протягують з допомогою електроаспіратора Мігунова через два послідовно з'єднані вбирачі Зайцева або Ріхтера, наповнені дистильованою водою, з швидкістю 1л/хв. протягом 50хв. Опісля вміст обох вбирачів об'єднують і проводять реакцію пероксидної оксидзації ліпідів з усіма реактивами, як при побудові калібрувального графіка. За різницею ДД по калібрувальному графіку знаходять  $\lg "C"$ , а за антилогарифмами - "C"дос. в мкг або мг в пробі повітря (50л) або в 1м<sup>3</sup> за формулою:

$$C_{\text{дос}} = \frac{C_{\text{кал}} \cdot 20 \cdot 50}{V_0}$$

де:  $C_{\text{дос}}$  - концентрація ДМСО в досліді;

$C_{\text{кал}}$  - вміст ДМСО в пробі досліджуваного об'єму повітря по калібрувальному графіку;

20 - коефіцієнт перерахунку на 1м<sup>3</sup> повітря;

50 - об'єм проби (50л);

$V_0$  - об'єм повітря (л), відібраний для дослідження і доведений до нормальних умов за формулою:

$$V_0 = \frac{V_T \cdot 273 \cdot P}{(273 + T) \cdot 760}$$

де:  $V_T$  - об'єм повітря, відібраний для дослідження при температурі в місці забору проби, л;

P - атмосферний тиск в місці забору проби повітря, мм рт.ст.;

T - температура повітря в місці забору проби, °C.

Через два послідовно з'єднані вбирачі, наповнені дистильованою водою, протягнуто з швидкістю 1л/хв. 50л повітря робочої зони приміщення, де проводять хімічну очистку ДМСО. Температура в місці забору проби повітря 18 °C, атмосферний тиск 740мм рт.ст. Після проведеної реакції пероксидної оксидзації отримано  $\Delta D = 0,048$ , що відповідає  $\lg 0,6 "C"$  за калібрувальним графіком. З допомогою антилогарифмів знаходимо концентрацію ДМСО (в пробі повітря 50л) - 4мкг. Розрахунок дійсної концентрації ДМСО " $C_{\text{дос}}$ " в 1м<sup>3</sup> повітря, приведенного до нормальних умов:

$$V_0 = \frac{50 \cdot 273 \cdot 740}{(273 + 18) \cdot 760} = 45,67 \text{ л}$$

$$C_{\text{дос}} = \frac{4 \cdot 20 \cdot 50}{45,67} = 87,6 \text{ мкг/м}^3$$

Отже, дійсна концентрація ДМСО в робочій зоні становить 87,6мкг/м<sup>3</sup>.

Використання запропонованого способу забезпечує високу чутливість і специфічність визначення ДМСО, що є нездійсниме звичайними хімічними способами.

Джерела інформації:

1. Гнідець І.Р., Терещук С.І. Технологія дослідження лікарських форм з димексидом. // Фарм. ж.-1972. - №1, - 53-55.

2. Туркевич М.М., Терещук С.І., Гнідець І.Р. Технологія і дослідження лікарських форм з димексидом // Фарм. ж.-1972. - №4, - 48-51.

3. Демчук О.Г., Ярошук С.Н., Волос О.П., Дасюк Е.В. Способ количественного определения димексида. -

Авт. свид. СССР №1776654, 22.07.1992.

4. Гуляева Н.В., Обидин А.В. Способ определения ДМСО. - Авт. свид. СССР №1324668, 1987.