

Рекомендована д.ф.н., професором В.С.Бондарем

УДК 615.235:54.062:542.61

ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА МЕТОДІВ ВИДІЛЕННЯ БРОМГЕКСИНУ ТА АМБРОКСОЛУ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

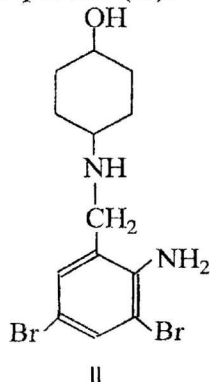
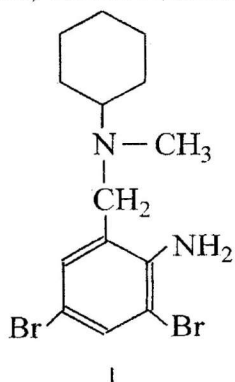
В.В.Болотов, С.М.Полуян

Національний фармацевтичний університет

Вивчена екстракція бромгексину та його метаболіту амброксолу органічними розчинниками з водних розчинів у залежності від рН середовища, ізолювання бромгексину та амброксолу з печінки тупа за допомогою методів О.О.Васильєвої, Стаса-Отто і В.П.Крамаренка. Запропоновані окремі експресні методики ізолювання бромгексину хлороформом та амброксолом за допомогою 96% спирту етилового.

Для лікування захворювань органів дихання широко застосовуються муколітичні та протикашльові засоби, до яких належить бромгексин та його метаболіт амброксол [5, 10].

За хімічною структурою бромгексин (бісальвон) є N-(2-аміно-3,5-дибромбензил)-N-метилциклогексиламіну гідрохлоридом (I), а амброксол (лазолван) — транс-4-(2-аміно-3,5-дибромбензил-аміно) циклогексанолу гідрохлоридом (II).



У медичній практиці препарати використовуються при лікуванні гострих та хронічних бронхітів різної етіології, туберкульозу легенів, гострої та хронічної пневмонії [7].

Бромгексин становить інтерес хіміко-токсикологічному відношенні [3]. У зв'язку з цим хіміко-токсикологічного значення набуває і його метаболіт амброксол.

Одним з найважливіших етапів хіміко-токсикологічного аналізу є ізолювання отруйних і сильнотоксичних речовин із біологічного матеріалу.

У доступній нам літературі відсутні дані щодо систематичного вивчення методів ізолювання з біологічного матеріалу бромгексину та його метаболіту амброксолу, тому в даній роботі ми поставили за мету вирішити зазначену задачу.

Важливим фактором, який впливає на процес ізолювання речовин, є ступінь екстракції сполук з водних розчинів органічними розчинниками. Тому попередньо ми провели дослідження ступеня екстракції бромгексину та амброксолу з водних розчинів у залежності від рН середовища органічними розчинниками, які найбільш широко застосовуються в хіміко-токсикологічному аналізі. Як свідчать дані (рис. 1) екстракція бромгексину здійснюється вже у кислих розчинах. У випадку з хлороформом екстракція бромгексину практично не залежить від рН середовища і складає ~80%, а з діетиловим ефіром та гексаном ступінь екстракції є максимальним у лужному середовищі. Таким чином, найбільш придатним розчинником для виділення бромгексину з водних розчинів є хлороформ. А гексан зручно застосовувати для очищення витяжок з біологічного матеріалу від коекстрактивних речовин.

Помітна екстракція амброксолу (рис. 2) хлороформом і ефіром починається при рН 2, а максимум екстракції досягається при рН 10. Одержані дані свідчать про те, що оптимальними розчинниками для виділення амброксолу з водних розчинів є хлороформ та ефір. Гексан зручно застосовувати для очищення витяжок з біологічного матеріалу від коекстрактивних речовин у кислому середовищі. Встановлена різниця стосовно ступеня екстракції цих препаратів хлороформом у залежності від рН середовища може бути використана для екстракційного розділення препаратів при сумісній присутності.

Ми вивчили також можливість ізолювання препаратів з біологічного матеріалу за допомогою загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів: О.О.Васильєвої (ізолювання водою, підкисленою кислотою шавлевою), Стаса-Отто (ізолювання спиртом етиловим, підкисленим шав-

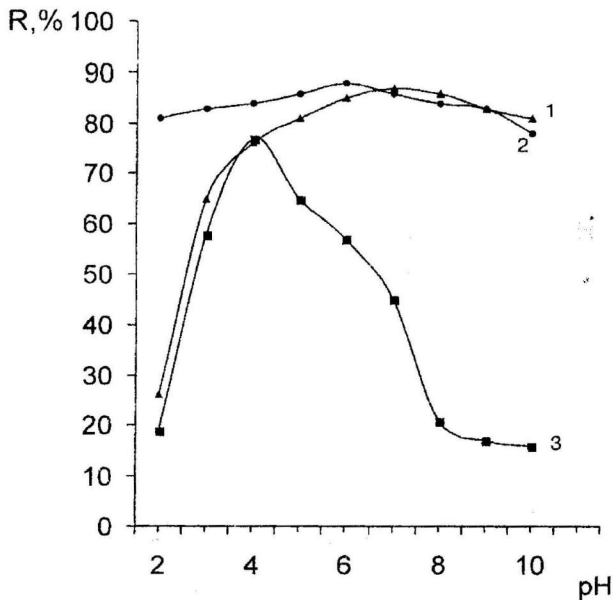


Рис. 1. Залежність ступеня екстракції (R, %) бромгексину за допомогою різних органічних розчинників з водних розчинів в залежності від pH середовища: 1 — хлороформ, 2 — діетиловий ефір, 3 — гексан.

левою кислотою), В.П.Крамаренка (ізолювання водою, підкисленою кислотою сірчаною). Результати проведених досліджень наведені в таблиці. Дані таблиці свідчать, що найбільш ефективним серед цих методів для бромгексину є метод В.П.Крамаренка, який дозволяє ізолювати 20,83% препарату, а для амброксолу — метод О.О.Васильєвої, який дозволяє ізолювати 40,51% препарату. Отримані дані свідчать про задовільну, але недостатню ефективність цих методів. Крім того, використання будь-якого з цих методів не дозволяє ефективно ізолювати одночасно обидва препарати. Тому була зроблена спроба розробити експресні та ефективні часткові методики ізолювання цих препаратів. У цьому відношенні привертає увагу метод ізолювання хлороформом [1]. Використання цього методу у відношенні до бромгексину дозволило ізолювати 60,36% препарату. Таким чином, цей метод є більш ефективним, ніж метод В.П.Крамаренка і, крім того, є більш експресним. У той же час цей метод виявився непридатним для ізолювання амброксолу. У зв'язку з цим він може бути використаним для попереднього очищення біологічного матеріалу від коекстрактивних речовин у випадку ізолювання амброксолу.

Для ізолювання з біологічного матеріалу амброксолу ми запропонували частковий метод виділення за допомогою 96% спирту етилового. Запропонована методика (див. табл.) дозволяє ізолювати 43,4% амброксолу, що за ефективністю співпадає з методом О.О.Васильєвої, але сполучення часткових методик ізолювання бромгексину хлороформом і амброксолу 96% спиртом етиловим (після елюювання біологічного матеріалу хлороформом, в який переходить бромгексин) дозволяє одночасно ізолювати обидва препарати при їх сумісній присутності.

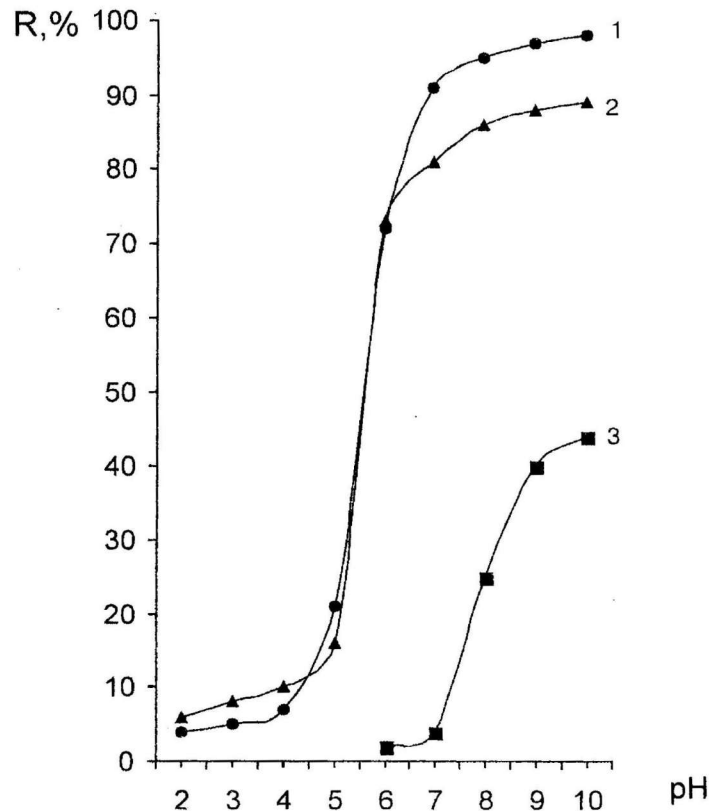


Рис. 2. Залежність ступеня екстракції (R, %) амброксолу за допомогою різних органічних розчинників з водних розчинів у залежності від pH середовища: 1 — хлороформ, 2 — діетиловий ефір, 3 — гексан.

Нами також встановлено, що запропонована методика ізолювання 96% спиртом етиловим може бути використана і для ізолювання бромгексину, якщо суміш біологічного матеріалу з безводним натрію сульфатом попередньо не елюювати хлороформом. При цьому метод дозволяє ізолювати 40,51% бромгексину, що вдвічі перевищує результати за методом В.П.Крамаренка.

Експериментальна частина

Методика дослідження ступеня екстракції бромгексину та амброксолу з водних розчинів. У ділільну лійку вносять 9 мл універсального буферного розчину Бріттона-Робінсона [6] з визначеним pH (від 2 до 10), додають 1 мл розчину бромгексину або амброксолу у воді (1000 мкг препарату) і 10 мл відповідного органічного розчинника (хлороформу, діетилового ефіру, гексану). Ділільну лійку струшують на механічному струшувачі протягом 10 хв для розділення шарів. Шар органічного розчинника відокремлюють і випаровують у чашці на водяній бані (температура — 40°C). До сухого залишку додають 10 мл 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої і розчин ретельно перемішують скляною паличкою.

Концентрацію бромгексину та амброксолу в отриманому розчині визначали за допомогою розробленої нами методики спектрофотометричного визначення.

Попередньо нами були розроблені методики спектрофотометричного визначення бромгексину

Таблиця

Результати ізолювання бромгексину та амброксолу з біологічного матеріалу (модельні суміші з печінкою) (середнє з 5 визначень, $\alpha = 0,95$)

Метод ізолювання	Виділено, %		Метрологічні характеристики	
	бромгексину	амброксолу	бромгексину	амброксолу
О.О.Васильєвої	14,16	40,51	$\bar{X}=14,16$; $S=1,44$; $S\bar{x}=0,64$; $\Delta\bar{X}=1,65$; $\epsilon=11,66$	$\bar{X}=40,51$; $S=1,84$; $S\bar{x}=0,82$; $\Delta\bar{X}=2,11$; $\epsilon=5,23$
Стаса-Отто	5,76	11,63	$\bar{X}=5,76$; $S=0,87$; $S\bar{x}=0,39$; $\Delta\bar{X}=1,00$; $\epsilon=17,45$	$\bar{X}=11,63$; $S=2,0$; $S\bar{x}=0,89$; $\Delta\bar{X}=2,29$; $\epsilon=19,73$
В.П.Крамаренка	20,83	21,52	$\bar{X}=20,83$; $S=1,41$; $S\bar{x}=0,63$; $\Delta\bar{X}=1,62$; $\epsilon=3,02$	$\bar{X}=21,52$; $S=1,32$; $S\bar{x}=0,59$; $\Delta\bar{X}=1,52$; $\epsilon=7,05$
Ізолювання хлороформом	60,36	Не ізолюється	$\bar{X}=60,36$; $S=1,43$; $S\bar{x}=0,64$; $\Delta\bar{X}=1,66$; $\epsilon=2,75$	Не ізолюється
Ізолювання 96% спиртом етиловим	40,51	43,4	$\bar{X}=40,51$; $S=1,42$; $S\bar{x}=0,63$; $\Delta\bar{X}=1,63$; $\epsilon=4,02$	$\bar{X}=43,4$; $S=1,3$; $S\bar{x}=0,58$; $\Delta\bar{X}=1,49$; $\epsilon=3,43$

та амброксолу. За даними [2] УФ-спектри цих препаратів у 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої мають по два максимума поглинання і практично співпадають. Для спектрофотометричного визначення бромгексину ми використовували λ_{max} 310 нм, а для амброксолу — 308 нм (товщина шару рідини складали 10 мм, розчином порівняння, був обраний 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої).

Методика побудови градуувального графіка для спектрофотометричного визначення бромгексину та амброксолу. У мірні колби ємністю 10 мл вносять 0,25; 0,5; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75; 2,00; 2,25; 2,50 мл стандартного розчину бромгексину (амброксолу) в 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої (концентрація 400 мкг в 1 мл) і доводять до мітки 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої.

Підпорядкування оптичної густини розчинів основному закону світлопоглинання спостерігалось у в межах концентрації бромгексину та амброксолу від 10 до 100 мкг в 1 мл досліджуваних розчинів. Середні відносні помилки визначення в зазначеному інтервалі концентрації складають $\pm 0,78\%$ та $\pm 0,98\%$ для бромгексину та амброксолу відповідно.

Для дослідження ступеня ізолювання бромгексину та амброксолу з біологічного матеріалу використовували модельні суміші печінки трупа людини, яка загинула від травми та не зазнала гнилісних змін, з препаратами. До 10 г подрібненої печінки додавали 1 мл водного розчину бромгексину або амброксолу, що містили 2000 мкг препарату, ретельно періодично перемішували і витримували протягом 24 годин. Паралельно ставили холості досліді з біологічним матеріалом.

Ізолювання препаратів з біологічного матеріалу проводили за допомогою модифікованих методів О.О.Васильєвої, В.П.Крамаренка, Стаса-Отто [4]. Модифікація методів полягала у зменшенні наважок біологічного матеріалу до 10 г. Відповідно були зменшені й об'єми органічних розчинників.

При використанні вказаних методів екстракцію бромгексину хлороформом (3 рази по 10 мл) проводили з підкисленої водної витяжки, а амброксолу — з підлуженої водної витяжки.

Об'єднані “кислі” (або “лужні”) хлороформні витяжки (біля 30 мл) переносили в мірні колби на 50 мл і доводили хлороформом до мітки. Отримані розчини використовували для виявлення та кількісного визначення бромгексину та амброксолу відповідно.

Методика кількісного визначення бромгексину та амброксолу. Кількісне визначення бромгексину та амброксолу проводили за допомогою описаного вище спектрофотометричного методу. Для цього 30 мл хлороформної витяжки з бромгексином або з амброксолом помішали в чашку для випаровування і випарювали на водяній бані при температурі 40°C. Сухі залишки розчиняли в 10 мл 0,1 М кислоти хлористоводневої та вимірювали оптичну густину отриманих розчинів на спектрофотометрі як вказано вище. Концентрацію бромгексину та амброксолу визначали за градуувальним графіком (див. вище). Як розчин порівняння використовували розчини, отримані в холостих дослідіах з біологічним матеріалом.

Методика ізолювання бромгексину з біологічного матеріалу за допомогою хлороформу. До 10 г подрібненої печінки трупа, зараженої бромгексином, як зазначено вище, додають 30 г безводного натрію сульфату і розтирають у ступці до утворення сипкої маси (якщо утворюється досить волога маса, її залишають на 2 год для висихання на повітрі). Сипку масу переносять у скляну колонку діаметром 17-20 мм, у нижню частину якої попередньо перед заповненням поміщають невеликий ватний тампон. Легким постукуванням по колонці сипку масу ущільнюють. Через відкритий кран у колонку за допомогою гумової груші подають хлороформ до утворення “дзеркала” над поверхнею з товщиною до 2-х см і кран закривають. Над колонкою встановлюють ділильну ліжку з

хлороформом (100 мл) і при відкритому крані через колонку пропускають хлороформ зі швидкістю 60–80 крапель за хв. Отриманий елюат далі досліджують так, як описано для інших методів ізолювання.

Для ізолювання з біологічного матеріалу амброксолу нами був запропонований частковий метод ізолювання за допомогою 96% спирту етилового.

Методика ізолювання амброксолу з біологічного матеріалу за допомогою 96% спирту етилового. З біологічним матеріалом, куди внесений амброксол, поступають як описано в методиці по ізолюванню бромгексину хлороформом. Після пропускання хлороформу через колонку отриману витяжку відкидають. Суміш біологічного матеріалу з натрію сульфатом висипають з колонки в порцелянову чашку і після випаровування залишків хлороформу її переносять у центрифужну склянку і додають 50 мл 96% спирту етилового. Отриману суміш періодично перемішують протягом години скляною паличкою, а далі центрифугують протягом 15 хв (5000 об/хв). Спиртову витяжку зливають у колбу, а до залишку в склянці додають 25 мл 96% спирту етилового, перемішують скляною паличкою протягом 30 хв і знов у центрифугують як описано вище. Спиртову витяжку знов у зливають у колбу. Останню операцію з залишком у склянці повторюють ще раз. Об'єднані спиртові витяжки фільтрують через паперовий фільтр у чашку для випаровування, залишок на фільтрі промивають 10 мл 96% спирту етилового. Промивний розчин додають до тієї ж чашки. Спиртову витяжку випаровують на водяній бані (50°C) до сухого залишку. До нього додають 10 мл 10% розчину кислоти шавлевої і залишають на 20 хв при періодичному перемішуванні скляною паличкою. Отриманий розчин зливають у ділильну лійку, а до залишку в чашці знову додають 10 мл 10% розчину кислоти шавлевої і проводять настоювання як описано вище. Отриману кислоту витяжку зливають у ту ж ділильну лійку і тричі екстрагують хлороформом по 10 мл. Отримані кислі хлороформні витяжки відкидають. До кислій водної витяжки у ділильній лійці додають 25% розчин аміаку до рН 10 за універсальним індикаторним папером і тричі екстрагують хлороформом по 10 мл. Частину об'єднаних хлороформних витяжок (3/5) помішали у чашку для випаровування і далі робили так, як описано в методиці спектрофотометричного визначення амброксолу.

Цю методику ми використали також для ізолювання бромгексину та амброксолу при їх сумісній присутності. При цьому бромгексин переходив до хлороформного елюату, а амброксол — до спиртової витяжки. Якщо проводити ізолювання 96% спиртом етиловим без попереднього елюювання хлороформом, то обидва препарати переходять у

спиртову витяжку, яку випаровують, залишок розчиняють у 10% розчині кислоти шавлевої і далі роблять так, як зазначено вище. При цьому “кислу” хлороформну витяжку не відкидають, а досліджують на бромгексин.

Виявлення препаратів у отриманих витяжках проводили методом тонкошарової хроматографії (ТШХ).

Виявлення бромгексину та амброксолу у витяжках з біологічного матеріалу за допомогою методу ТШХ. На лінію старту хроматографічної пластинки складав “Sorbfil” (силікагель СТХ-ІІА, тип підкладки ПЕТФ, розмір пластинок 10x10 см) наносили упарену “кислу” хлороформну витяжку з бромгексином або “лужну” хлороформну витяжку з амброксолом (об'єм упареної витяжки еквівалентний 1 г біологічного матеріалу) із біологічного матеріалу на відстані 2 см від першої точки наносили еквівалентну кількість упареної хлороформної витяжки, отриманої в “холостому” досліді з біологічним матеріалом. У третю точку наносили 10 мкл (20 мкг) стандартного розчину бромгексину в хлороформі або амброксолу в етанолі.

Пластинки з бромгексином тричі елюювали гексаном до лінії фінішу. При цьому бромгексин залишався на лінії старту, а коекстрактивні речовини мігрували до лінії фінішу.

Після висушування пластинки елюювали в системі розчинників гексан — толуол — діетиламін (75:15:10). Проявлення плям на хроматограмах здійснювали парами йоду, реактивом Драгендорфа або за допомогою реакції утворення азобарвника, де як азоскладовий компонент використовується реактив Браттона-Маршалла [8] (Rf-0,67).

Пластинки з амброксолом без попереднього елюювання гексаном тричі елюювали у вищенаведеній системі. Плями амброксолу проявляли так, як описано вище (Rf-0,2).

У зазначених умовах спостерігалась задовільне розділення плям препаратів та коекстрактивних речовин (плями коекстрактивних речовин, як і плями препаратів, проявляються парами йоду або реактивом Драгендорфа). При проявленні плям бромгексину та амброксолу за реакцією утворення азобарвника спостерігали забарвлення плям у рожевий колір тільки для препаратів.

ВИСНОВКИ

1. Вивчена екстракція бромгексину та амброксолу органічними розчинниками з водних розчинів у залежності від рН середовища. Встановлено, що оптимальним екстрагентом для бромгексину є хлороформ (рН максимальної екстракції — 2–10). Для амброксолу оптимальними екстрагентами є хлороформ та діетиловий ефір (рН максимальної екстракції — 5–10). Показана можливість екстракційного розділення суміші препаратів.

2. Запропонована методика спектрофотометричного визначення бромгексину та амброксолу.

3. Вивчено ізолювання бромгексину та амброксолу з печінки трупів за допомогою методів О.О.Васильєвої, Стаса-Отто і В.П.Крамаренка. Встановлено, що найбільш ефективним із досліджуваних методів для бромгексину є метод В.П.Крамаренка, який дозволяє ізолювати 20,83% препарату, а для амброксолу — метод О.О.Васильєвої, який дозволяє ізолювати 40,51% препарату.

4. Запропонована часткова експресна методика ізолювання бромгексину хлороформом, яка дозволяє ізолювати 60,36% бромгексину.

5. Розроблені часткові методи ізолювання амброксолу та бромгексину за допомогою 96% спирту етилового, що дозволяє ізолювати 43,4% та 40,51% препаратів відповідно. Запропонована методика дозволяє ефективно ізолювати бромгексин та амброксол при їх сумісній присутності.

ЛІТЕРАТУРА

1. Болотов В.В., Мороз В.П., Зареченський М.А. // *Вісник фармації*. — 1999. — №1 (19). — С. 45-48.
2. Болотов В.В., Полуян С.М., Костіна Т.А. // *Фізіологічно активні речовини*. — 2000. — №2 (30). — С. 48-51.
3. Индияминов С.М., Коробкова Г.А., Бирюкова С.Ф. // *Судебно-медицинская экспертиза*. — 1994. — №3. — С. 40-42.
4. Крамаренко В.Ф. *Токсикологическая химия*. — К.: Вища школа, 1989. — 456 с.
5. Лоуренс Д.Р., Бенит Н.Н. *Клиническая фармакология*. — М.: "Медицина", 1993. — Т.2. — 460 с.
6. Лурье Ю.Ю. *Справочник по аналитической химии*. — М.: Химия, 1989. — 447 с.
7. Машковский М.Д. *Лекарственные средства. В двух томах*. — Т. 1. Изд. 13-е, новое. — Х.: Торсинг, 1997. — 560 с.
8. Полуян С.М., Болотов В.В., Бондар В.С., Карпушина С.А. // *Вісник фармації*. — 2000. — №2 (22). — С. 11-13.
9. Полуян С.М., Болотов В.В., Маміна О.О. // *Вісник фармації*. — 1997. — №1. — С. 15-16.
10. *Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. Second Edition / Senior Editor A.C.Moffat*. — London: The Pharmaceutical Press, 1986. — 1200 p.

УДК 615.235:54.062:542.61

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ БРОМГЕКСИНА И АМБРОКСОЛА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

В.В.Болотов, С.М.Полуян

Изучены экстракция бромгексина и его метаболита амброксола органическими растворителями из водных растворов в зависимости от рН среды, условия изолирования бромгексина и амброксола из печени трупов с помощью методов А.А.Васильевой, Стаса-Отто и В.Ф.Крамаренко. Предложены частные экспресные методики изолирования бромгексина с помощью хлороформа и амброксола с помощью 96% спирта этилового.

UDC 615.235:54.062:542.61

COMPARATIVE ESTIMATION OF BROMHEXINE AND AMBROXOLE ISOLATION METHODS FROM A BIOLOGICAL MATERIAL

V.V.Bolotov, S.M.Poluyan

The bromhexine and its metabolite ambroxole extraction by organic solvents from aqua solutions in dependence on pH value of the medium, conditions of bromhexine and ambroxole isolation from a liver of corpse with the help of methods by A.A.Vasilyeva, Stas-Otto, and V.F.Kramarenko have been studied. The particular expressive methods of bromhexine isolation with the help of chloroform and ambroxole by means of 96% alcohol have been suggested.