

Рекомендована д.ф.н., професором П.О.Безуглим

УДК 615.073:615.21

ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ ДЛЯ АНАЛІЗУ ІОННИХ АСОЦІАТИВ ТОКСИЧНИХ ПРЕПАРАТИВ ОСНОВНОГО ХАРАКТЕРУ

О.О.Маміна

Національна фармацевтична академія України

Розроблена схема скринінгу для токсичних препаратів основного характеру в біологічних об'єктах, яка застосовувалась при дослідженні сечі на "лікарські" отрути. Розроблені оптимальні умови аналізу іонних асоціатів токсичних препаратів основного характеру з універсальним індикатором метилоранжем методом вискоєфективної рідинної хроматографії.

У сучасній медицині широко використовуються лікарські препарати основного характеру рослинного та синтетичного походження, які характеризуються не лише терапевтичним ефектом, але й мають токсичну дію в результаті передозування, обумовленого самолікуванням або спробою суїциду [5, 12, 18].

У практиці судових хіміків та хіміків-токсикологів актуальною є проблема неспрямованого аналізу об'єктів біологічного походження на наявність токсичних препаратів, для вирішення якої необхідна розробка високочутливих, ефективних та експресних методів скринінгу.

Як основні скринінгові методи для ідентифікації "лікарських" отрут застосовуються хімічні, спектральні, хроматографічні, імунохімічні методи та їх сполучення [2, 4, 7, 8, 10, 13, 16, 17, 24].

Одним з найбільш перспективних хроматографічних методів є метод вискоєфективної рідинної хроматографії, який застосовується для розділення, виявлення та кількісного визначення лікарських препаратів у фармацевтичному та хіміко-токсикологічному аналізі [3, 9, 19-23, 25].

Варіанти ВЕРХ-скринінгу лікарських препаратів, які були раніше рекомендовані до використання, відрізняються відсутністю уніфікованої, стандартної методики проведення досліджень, різноманітністю умов хроматографування (типи сорбентів, склад рухомої фази, детектування препаратів, швидкість подавання елюенту, температурний режим колонки).

Метою представленої роботи була розробка схеми скринінгу досліджуваних препаратів з використанням методу вискоєфективної рідинної хроматографії в стандартних умовах.

Матеріали та методи

Хроматографічний аналіз проводився на рідинному хроматографі "Міліхром А-02" (Новосибірськ, АТ "Еконова"). Для дослідження використовували колонку довжиною 75 мм та діаметром 2 мм, яка була наповнена сорбентом з неполярною фазою — Nucleosil-100-5, С18. Аналіз проводився у зворотньо-фазному варіанті, який найбільш широко застосовується для лікарських препаратів [1, 3, 7, 9, 18-23, 25].

Детектування препаратів виконувалось двопробним мультихвильовим УФ-спектрофотометром у діапазоні довжини хвиль 190-360 нм. Автоматичний відбір проб забезпечували запрограмованим автосамплером (46 ампул). Високий тиск створювався двоступеневим насосом (максимальний тиск — 7 МПа, об'єм одного ступеня — 2500 мкл). Для створення оптимального температурного режиму використовували колоночний нагрівач (35-90°C) [11, 15].

Результати та їх обговорення

Розроблена в результаті дослідження схема скринінгу токсичних препаратів основного характеру складається з двох етапів.

Перший етап полягає в створенні та екстрагуванні іонних асоціатів препаратів з кислотним індикатором з модельних розчинів або екстрактів з біологічних об'єктів. На першому етапі схеми проводиться розділення "лікарських" отрут на дві групи — препарати, які утворюють іонні асоціати з метиловим оранжевим у стандартних умовах, та препарати, які не утворюють іонні асоціати. До групи речовин, які не утворюють іонні асоціати з досліджуваних препаратів, відносяться кофеїн, теофілін, теобромін, морфін, анальгін, антипірін, атенолол.

Другий етап базується на використанні методу вискоєфективної рідинної хроматографії для ідентифікації індивідуальних препаратів за хроматографічними характеристиками, одержаними в результаті аналізу іонних асоціатів у стандартних умовах.

Утворення іонних асоціатів з метиловим оранжевим виконувалось за наступною методикою: в ділительні лійки вносили 5 мл ацетатного буферно-

Таблиця 1

Параметри утримування препаратів

Препарати	Абсолютний час утримування препарату ($t_{абс.}$), хв.	Відносний час утримування за метилоранжем ($t_{відн.}$)	Абсолютний об'єм утримування препарату ($V_{абс.}$), мкл
Аміназин	17,32±0,01	1,62	1732
Анабазин	6,50±0,01	0,61	650
Атропін	10,84±0,02	1,01	1084
Димедрол	15,26±0,02	1,43	1526
Дипразин	15,87±0,03	1,49	1587
Клофелін	10,67±0,03	1,00	1067
Кодеїн	9,57±0,03	0,89	957
Кокаїн	13,31±0,02	1,25	1331
Лідокаїн	11,36±0,02	1,06	1136
Новокаїн	9,81±0,01	0,92	981
Папаверин	13,42±0,02	1,26	1342
Промедол	14,28±0,01	1,34	1428
Тизерцин	16,68±0,02	1,56	1668
Фентаніл	14,31±0,03	1,34	1431
Хінін	11,36±0,01	1,06	1136
Циклодол	14,34±0,01	1,34	1434

Примітка. Абсолютний час утримування індикатору (метилового оранжевого) складає 10,68±0,02 хв.

го розчину (рН 4,6); 1 мл досліджуваного розчину, який вміщує 100 мкг препарату; 5 мл 0,1% розчину метилового оранжевого та 10 мл хлороформу.

Ділильні лійки збовтували протягом 5 хв. та відстоювали впродовж наступних 5 хв. для розділен-

ня фаз, у результаті чого хлороформний шар набував жовтого забарвлення [6, 8]. Хлороформний шар випаровували і залишок розчиняли в 2 мл ацетонітрилу. Якщо хлороформний шар не мав жовтого забарвлення, то пошук значно звужувався і аналіз виконувався спрямовано на виявлення "лікарських" отрут, які не утворювали іонні асоціати в стандартних умовах, з подальшим підтвердженням їх наявності хімічними (реакції забарвлення, осадження, мікрокристалоскопічні реакції) та фізико-хімічними методами (виявлення за УФ- та ІЧ-спектрами, за результатами тонкошарової хроматографії). При наявності жовтого забарвлення хлороформного шару виконували дослідження методом ВЕРХ у розроблених стандартних умовах хроматографування: використання буферного розчину за складом — 4 М розчин перхлорату літію та 0,2 М розчин дигідрофосфату літію (рН 2,8); застосування органічного розчинника — ацетонітрилу, який фільтрували через владипоровську мембрану МФА-МА-N-2 (ТУ 6-05-1909-81) з розміром пор 0,15-0,25 мкм; дегазацію органічного розчинника проводили з використанням вакууму.

Швидкість елюювання досліджуваних речовин складала 100 мкл/хв.; подавання розчинника проводили в градієнтному режимі від 10% до 100% ацетонітрилу. Дослідження виконували при температурі колонки 35°C і тиску насосу 2,7 МПа; об'єм проби для введення в колонку — 1 мкл.

Враховуючи те, що для досліджуваних препаратів характерні максимуми поглинання, які

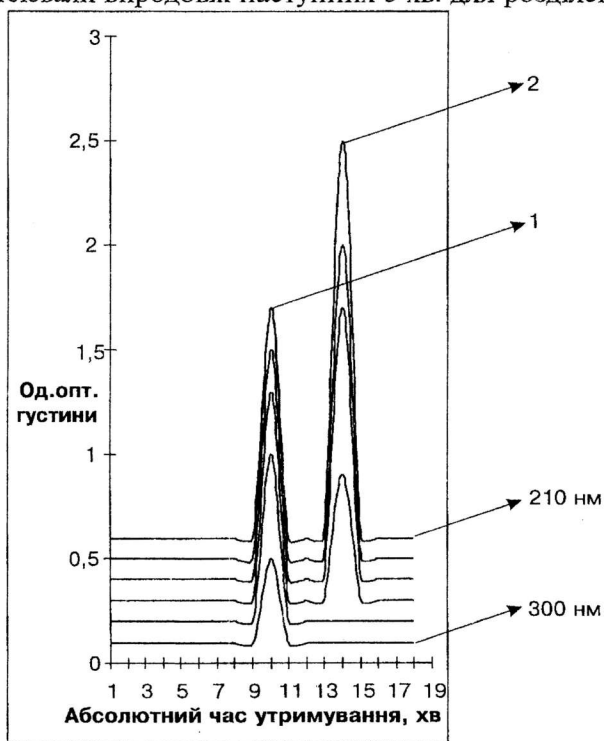


Рис. Хроматограма іонного асоціату кокаїну з метилоранжем: 1 — пік метилоранжу; 2 — пік кокаїну.

Основні хроматографічні параметри розділення піків "лікарських" отрут основного характеру та метилового оранжевого

Препарати	Коефіцієнт ємкості, k'	Селективність, α	Ступінь розділення піків, R_s
Аміназин	10,55	1,72	3,32
Анабазин	3,33	1,84	2,09
Атропін	6,23	1,02	0,08
Димедрол	9,17	1,50	2,29
Дипразин	9,58	1,57	2,60
Клофелін	6,11	1,00	0,005
Кодеїн	5,38	1,14	0,56
Кокаїн	7,87	1,29	1,32
Лідокаїн	6,57	1,07	0,34
Новокаїн	5,54	1,10	0,44
Папаверин	7,95	1,30	1,37
Промедол	8,52	1,39	1,80
Тизерцин	10,12	1,65	3,00
Фентаніл	8,54	1,40	1,82
Хінін	6,57	1,07	0,34
Циклодол	8,56	1,40	1,83
Метилоранж	6,12	-	-

практично охоплюють увесь УФ-спектр, а також з метою створення уніфікованих умов аналізу детектування препаратів проводили за 6 довжинами хвиль: 210, 230, 240, 260, 280 та 300 нм.

Встановлено, що розроблені стандартні умови забезпечували оптимальне розділення піків практично усіх досліджуваних препаратів та індикатора, а також забезпечували симетричну форму піків усіх сполук (рис.).

Ідентифікацію препаратів проводили за параметрами утримування — абсолютний та відносний час утримування (табл. 1). Як внутрішній стандарт використовували метиловий оранжевий. Внутрішній стандарт застосовували для розрахунку відносного часу утримування ($t_{\text{відн.}}$), який дорівнює відношенню абсолютного часу утримування препарату до абсолютного часу утримування індикатора ($t_{\text{абс. препарат}}/t_{\text{абс. метилоранж}}$).

Час утримування — це функція лінійної швидкості рухомої фази, тому більш загальний та надійний параметр — об'єм утримування ($V_{\text{абс.}}$), який дорівнює добутку абсолютного часу утримування на об'ємну швидкість рухомої фази (ω , мкл/хв.):

$$V_{\text{абс.}} = t_{\text{абс.}} \cdot \omega.$$

Основні критерії оцінки хроматографічного розділення включають ступінь розділення піків (R_s), селективність (α), коефіцієнт ємкості (k') представлений в табл. 2.

Ступінь розділення піків (R_s) розраховували за формулою:

$$R_s = (tR_2 - tR_1)/(M_{0,5(1)} + M_{0,5(2)}),$$

де: tR_1 , tR_2 — абсолютний час утримування препаратів та індикатора, хв.;

$M_{0,5(1)}$, $M_{0,5(2)}$ — ширина піків на половині висоти, мм.

Селективність (α) і коефіцієнт ємкості (k') розраховували за формулами:

$$\alpha = k'_2/k'_1,$$

де: k'_1 , k'_2 — коефіцієнти ємкості першого та другого препаратів або індикатора;

$$k' = (V_R - V_0)/V_0,$$

де: V_R — абсолютний об'єм утримування препарату, мкл;

V_0 — вільний об'єм колонки, який дорівнює 150 мкл.

Розрахунок селективності (α) та ступінь розділення піків (R_s) проводили, базуючись на положенні піків на хроматограмі, які відповідають метилоранжу і препаратам. Піки, які відповідають анабазину, клофеліну, кодеїну та новокаїну, передували піку метилоранжу, а піки, які відповідають іншим препаратам, з'являлись на хроматограмі після піку метилоранжу.

Основні хроматографічні параметри розділення піків препаратів та індикатора свідчили про досить добре розділення іонних асоціатів аміназину, анабазину, димедролу, дипразину, кокаїну, папаверину, промедолу, тизерцину, фентанілу та циклодолу ($R_s > 1$; $\alpha > 1,2$) [6, 26].



Схема скринінгу сечі на "лікарські отрути" основного характеру.

Розроблена схема скринінгу була застосована для дослідження сечі на наявність препаратів. Вибір біологічного об'єкту обумовлений метою використання схеми скринінгу не тільки для судово-хімічних досліджень, а й для проведення експрес-аналізу гострих інтоксикацій.

Методика екстракції препаратів із сечі. Лікарські препарати основного характеру екстрагували з сечі органічним розчинником — хлороформом в неіонізованій формі при рН 9-10 [7, 14].

Для дослідження використовували модельні суміші сечі 20 мл з 500 мкг препарату. Екстракцію препаратів проводили за наступною методикою: про-

бу сечі (20 мл) підлужували 25% розчином аміаку до рН 9-10 та виконували екстракцію основ препаратів хлороформом — двічі по 10 мл. Об'єднані витяжки фільтрували через безводний натрію сульфат.

Хлороформні витяжки очищували екстракційним методом, для чого препарат з хлороформної витяжки екстрагували 0,1 М розчином хлористоводневої кислоти — двічі по 10 мл. Хлороформний шар відкидали, а потім після підлужування 25% розчином аміаку до рН 9-10 знов екстрагували основи препаратів хлороформом — двічі по 10 мл.

Органічну фазу випаровували до сухого залишку, який розчиняли в 5 мл хлороформу. 1 мл хлоро-

формного екстракту застосовували для утворення іонних асоціатів у стандартних умовах, які досліджували методом рідинної хроматографії (схема).

Співпадання результатів, які були отримані при проведенні скринінгу сечі та модельних розчинів препаратів, свідчить про надійність та відтворюваність розроблених методик, які можна рекомендувати для практики судових хіміків та хіміків-токсикологів.

ВИСНОВКИ

1. Розроблені оптимальні умови аналізу іонних асоціатів токсичних препаратів основного характеру з універсальним індикатором метилоранжем методом високоефективної рідинної хроматографії.

2. Визначені та розраховані параметри утримання препаратів та хроматографічні характеристики розділення піків препаратів та індикатора, які можуть використовуватися для ідентифікації "лікарських" отрут.

3. Розроблена схема скринінгу для проведення неспрямованого аналізу токсичних препаратів основного характеру в біологічних об'єктах, апробована при дослідженні сечі на наявність "лікарських" отрут. Одержані результати відтворювані та надійні, що свідчить про можливість рекомендації розробленої схеми для практики судових хіміків та хіміків-токсикологів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бойко С.С., Жердев В.П., Чобанов Н.Г. // *Хим.-фарм. журн.* — 1995. — №4. — С. 48-49.
2. Болотов В.В., Баярка С.В., Мамина О.О. // *Вісник фармації.* — 1993. — № 2. — С. 71-74.
3. Гото М., Джинко К., Исин Д. *Введение в микромасштабную высокоэффективную жидкостную хроматографию.* — М.: Мир, 1991. — 239 с.
4. Дегтерев Е.В., Гаевский А.В., Зенкова Е.А. // *Хим.-фарм. журн.* — 1998. — № 8. — С. 48-54.
5. Дунаевский В.П., Стяжкин А.Б. *Наркомания и токсикомания.* — Л.: Медицина, 1990. — 236 с.
6. Жебентяев А.И., Арзамасцев А.П. // *Фармация.* — 1993. — № 5. — С. 63-71.
7. Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В. *Анализ наркотических средств.* — М.: Мысль, 1993. — 259 с.
8. Карташов В.А., Кнауб В.А., Кудрикова Л.Е. // *Фармация.* — 1984. — № 4. — С. 37-40.
9. Лазарян Д.С., Вергейчик Т.Х., Линникова В.А. // *Суд.-мед. экспертиза.* — 1992. — № 4. — С. 37-39.
10. Мамина Е.А. // *Вестник проблем биологии и медицины.* — 1997. — № 14. — С. 39-44.
11. Мамина Е.А., Бондарь В.С., Погосян Е.Г. *Лекарства — человеку: Междунар. сб. матер. по созданию и апробации новых лек.средств.* — Вильнюс, 1998. — Т. 8. — С. 129-132.
12. Машковский М.Д. *Лекарственные средства.* — Х., 1997. — Т. 1. — 543 с.
13. Мягкова М.А., Лужников М.В. // *Хим.-фарм. журн.* — 1990. — № 6. — С. 76-82.
14. Титова А.В. // *Фармация.* — 1989. — № 1. — С. 80-83.
15. Baram G.I. // *J. of Chromatography.* — 1996. — №728. — P. 387-399.281.
16. Bhongade S.L., Kasture A.V. // *Indian. J. Pharm. Sci.* — 1993. — №4. — P. 151-154.
17. Chen B.H., Taylor E.H., Pappas A.A. // *J. Anal. Toxicol.* — 1990. — №1. — P. 12-14.
18. Clarke E.J.C. *Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material.* — London: The Pharm. Press. — 1986. — 1226 p.
19. Clauwaert K.V., Van Bocxlaer J.F., Lambert W.E. // *Anal. Lett.* — 1996. — №17. — P. 3021-3028.
20. Dimaso M., Purdy C., Cotton M. // *Pittsburgh Conf. and Expo Anal. Chem. and Appl. Spectrosc.* — 1990. — №5. — P. 285-286.
21. Fernandez P., Lafuente N., Bermejo A.M. // *J. Anal. Toxicol.* — 1996. — №4. — P. 224-228.
22. Glass R.I., Johnson M.B. // *J. Liq. Chromat. and Relat. Technol.* — 1996. — №11. — P. 1777-1784.
23. Kintz P., Lamant J.-M., Maugin P. // *Analyst.* — 1990. — №9. — P. 1269-1270.
24. Kir S., Karasen N., Saym F. // *J. Pharm. Belg.* — 1995. — №4. — P. 349-352.
25. Pawula M., Shaw P.N., Barrett D.A. // *J. Chromat. Biomed. Appl.* — 1994. — №1. — P. 106-111.

УДК 615.073:615.21

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ АНАЛИЗА ИОННЫХ АССОЦИАТОВ ТОКСИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ОСНОВНОГО ХАРАКТЕРА

Е.А.Мамина

Разработана схема скрининга для токсических препаратов основного характера в биологических объектах, которая использовалась при исследовании мочи на "лекарственные" яды. Разработаны оптимальные условия анализа ионных ассоциатов токсических препаратов основного характера с универсальным индикатором метилоранжем методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

UDC 615.073:615.21

APPLICATION OF HIGHLY-EFFECTIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY IN PERFORMING ANALYSIS OF ION ASSOCIATES OF TOXIC PREPARATIONS OF BASIC CHARACTER

Ye.A.Mamina

A screening's scheme for toxic preparations of basic character has been worked out and used in testing urine on "medicinal" poisons. The optimal conditions for performing analysis of ion associates of toxic preparations of basic character with a universal indicator methylorange by means of highly-effective liquid chromatography method have been developed.