

УДК: 615.07:54.058:543.544.943.3:615.2

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДІВ ОЧИСТКИ ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН

Полуян С.М., Погосян О.Г., Бондар В.С.

Національний фармацевтичний університет, м.Харків, Україна

Вступ. При проведенні хіміко-токсикологічних досліджень план аналізу включає такі етапи: ізолювання, очистку, виявлення та кількісне визначення токсикантів с подальшою інтерпретацією отриманих результатів. Одним з важливих та відповідальних етапів хіміко-токсикологічного дослідження є очистка. Від ефективності цього етапу залежать результати ідентифікації та кількісного визначення токсикантів. Правильний вибір методів ізолювання та очистки забезпечує в подальшому об'єктивність оцінки вищезазначених визначень. Недостатня очистка витяжок з біологічного матеріалу може привести до хибно-позитивного результату, а занадто ретельна – до втрати токсиканта. У зв'язку з вказаним – вибір методу очистки дуже важливий етап при складанні плану хіміко-токсикологічних досліджень. Він залежить від природи отрути, морфологічних особливостей та стану об'єктів. Можливості вибору методів очистки визначається також матеріальною забезпеченістю хімічної лабораторії та кваліфікацією спеціаліста.

Мета дослідження. Метою нашого дослідження було дати порівняльну оцінку різних методів очистки витяжок з об'єктів біологічного походження, які містять лікарські речовини. Результати дозволять хіміку-токсикологу легше орієнтуватися у виборі метода очистки токсикантів та правильно інтерпретувати отримані результати аналізу.

Методи дослідження. Для очистки лікарських речовин при проведенні хіміко-токсикологічних досліджень використовують різні методи та їх сполучення: екстракційний (рідинна екстракція), хроматографічний (хроматографія у тонкому шарі сорбенту, гель-хроматографія), електрофорез на папері, метод дистиляції та сублімації, твердофазної екстракції та ін. [1, 2, 3]

Основні результати. На дослідження хіміку-токсикологу можуть поступати різні об'єкти біологічного походження (рослинного та тваринного). Це може бути: органи трупа людини, біологічні рідини, продукти харчування та ін. Всі вказані об'єкти містять ендogenous речовини, які заважають виявленню та кількісному визначенню токсичних речовин, серед яких важливе значення мають лікарські речовини. Кількість ендogenous речовин може збільшуватися з подовженням терміну зберігання об'єктів дослідження, тому що з'являються додаткові продукти розпаду білків, жирів, вуглеводнів та інших речовин. Домішки можуть давати ті ж реакції, поглинати світлову енергію в тій же області спектру, що і речовини, які аналізуються. При недостатньою очистки токсинів від супутніх речовин ендogenous характеру можна отримати при проведенні хіміко-токсикологічних досліджень хибно-позитивний результат. У той же час дуже ретельна очистка може привести до втрати токсичних речовин екзогенного характеру. Ефективність очистки токсинів від супутніх домішок залежить від багатьох факторів: токсину, який виявляємо; природи компонентів, від яких необхідно відокремити

отруту; схожість фізико-хімічних властивостей токсичної речовини від інших компонентів; від концентрації речовини, яку визначаємо; від чистоти реагентів, які використовуємо при виконанні досліджень. Всі вказані фактори визначають вибір типу та кількості стадій очистки від супутніх речовин.

Для цілей очистки хімік – токсиколог може використовувати різні методи та їх сполучення. В основі екстракційного методу лежить закон розподілу речовин між розчинниками, які не змішуються, а також властивості органічних лугів та кислот, які розчинні в органічних розчинниках, а солі - у воді. За допомогою екстракційного методу, або рідинно-рідинної екстракції, можна досягнути групове розділення наступних типів: відділення полярних розчинників від неполярних; розділення полярних речовин на сполуки кислого, нейтрального та основного характеру [1, 2]. Часто рідинну екстракцію проводять декілька разів при різних значеннях рН, чередування екстракції з кислої та лужної середовища, використовують доволі часто. Не дивлячись на важність екстракційного методу, досі не існує теоретичної основи вибору системи розчинників, яка придатна для виділення конкретної сполуки, тому найбільш плідним залишається чисто емпіричний підхід. Для цієї мети визначають коефіцієнт розподілу речовини у ряді систем, а потім вибирають систему з найвищим коефіцієнтом розподілення. Для полегшення підбору рекомендується ряд систем розчинників, розташованих у порядку підвищення полярності органічної фази: гексан (циклогексан) / етанол-вода; бензол / метанол-вода; хлороформ / метанол-вода; етилацетат-вода; бутанол-1 або бутанол-2 / вода; фенол / вода. При проведенні екстракційного методу очистки можуть зустрічатися деякі труднощі, які пов'язані з утворенням емульсій. Для руйнування останніх можливо використання фільтрування, додавання нейтральних солей, ацетону, етанолу, центрифугування. В таблиці № 1 приведено лікарські речовини, які відділяють від домішок за допомогою рідинної екстракції та системи розчинників, які не змішуються, що використовують при проведенні хіміко-токсикологічному дослідженні на конкретний токсин.

Таблиця № 1

№ з/п	Речовина / група речовин	Система розчинників
1.	Барбітурати, морфін, кодеїн	діетиловий етер / вода
2.	Амітриптилин, тразодон, фентаніл, похідні фенотіазину	діетиловий етер / ацетонітрил-вода
3.	Фенітаніл	діетиловий етер / ацетон-вода
4.	Суміш лікарських речовин	хлороформ / вода
5.	Карденоліди	тетрахлорметан / етанол-вода

У хіміко-токсикологічному аналізі часто використовують метод хроматографії у тонких шарах сорбенту. Розділення здійснюється на пластинках, які покриті тонким шаром сорбенту. На пластинку наносять досліджувану речовину та поміщають її у камеру, на дно якої налито систему розчинників. Під дією капілярних сил система розчинників піднімається на пластинки, при цьому речовини, які нанесено на пластину переміщуються через тонкий шар сорбенту з різною швидкістю, в результаті чого відбувається розділення їх на компоненти. Механізм розділення речовин за допомогою тонкошарової хроматографії може бути

різним в залежності від природи розділення речовин, складу тонкого шару, властивостей розчинників. Тонкошарову хроматографію можливо поєднувати практично з любими іншими методами розділення та ідентифікації. Для ефективності кожного хроматографування слід використовувати свіжу порцію системи розчинників [5]. Системи розчинників та сорбенти, які використовують при проведенні хіміко-токсикологічного дослідження на лікарські речовини представлено в таблиці № 2.

Таблиця № 2

№ з/п	Лікарські речовини	Пластинки	Система розчинників
1.	Барбітурати, фентаніл	Sorbfil	Хлороформ-етанол (9:1)
2.	Похідні 1,4-бензодіазепіну	Sorbfil	Метанол; Бензол
3.	Похідні фенотіазину	ВЕТШХ	Етилацетат-метанол-25% амоніак (170:20:10); Бензол-діоксан-25% амоніак (60:30:5)
4.	Похідні піразолону-5	Sorbfil	Хлороформ-етанол (49:2); Хлороформ-25% амоніак (25:15)
5.	Ерготамін, Ергометрин	Sorbfil	Хлороформ-етанол-25% амоніак (20:5:1); Хлороформ-етанол (8:2)
6.	Фенітаніл	ВЕТШХ	Хлороформ-метанол (9:1), Хлороформ-етилацетат-етанол (42:2:4); н-бутанол-кислота ацетатна-вода (4:1:5)
7.	Токсиканти лужного характеру	Sorbfil	Толуол-ацетон-96% етанол-25% амоніак; Гексан-ацетон-диетиламін (6:3:1); Хлороформ-ацетон (9:1), Етилацетат-метанол-вода-25% амоніак (85:10:3:1)

Гель-хроматографія різновидність хроматографічних методів, де як нерухома фаза використовують гель, який містить багато пор більш менш відповідного розміру. Сполуки, молекули яких більше діаметру пор, не можуть проникнути всередину гелю із рухомої фази, в той час, як молекули меншого розміру легко потрапляють в пори. Тому при проходженні рухомої фази в першу чергу елюються сполуки з молекулами більшого розміру. Цей вид хроматографії корисний при аналізі зразків, які містять великі кількості ліпідів (жири, молоко) після їх попереднього відділення екстракцією. Необхідно відмітити перспективність розподілу хроматографії на сефадексе Y-25 для відділення полярних екзо-

генних органічних сполук від ліпідів біологічних об'єктів, що важливо при проведенні хіміко-токсикологічного аналізу. Вказане розділення можна виконати на колонці, яка наповнена сефадексом Y-25 у суміші хлороформ-метанол-вода (60:3:45). При пропусканні через таку колонку жиру, який містить полярні сполуки, останні залишаються на ній, в той же час ліпіди безперешкодно проходять через гель. Водорозчинні компоненти можна далі елюювати водним метанолом (1:1). Метод дистиляції з водяною парою та метод сублімації базуються на леткості окремих представників лікарських речовин. Дистиляція з водяною парою основана на залежності температури кипіння суміші речовин від суми пружності парів кожного інгредієнту. Температура кипіння кожного леткого компоненту суміші нижче температури кипіння любого з складових частин. За допомогою вказаного методу досягається ефективно розділення речовин, які аналізуємо, від білків, жирів, пігментів та ін. Сполуки, які відігнали, витягають з великого об'єму дистиляту екстракцією органічними розчинниками. Відзначено незначний вихід з досліджуваних проб алкалоїдів похідних піридину та піперидину при використанні даного методу. Метод сублімації використовується в основному для очистки вже виділених слідових компонентів. Маються рекомендації по очистці барбітуратів, ізолювання яких проводили з органів трупів, методом сублімації [4]

Твердофазна екстракція – одно з важливих напрямків використання пористих полімерних матеріалів [2, 3]. В даний час пористі органічні полімери використовують всюди, де виникають задачі концентрування, очистки та розділення різних хімічних сполук. Сорбція пористими полімерами органічних речовин з водних систем основана на розподілі розчинних речовин між сорбентів та водою. У тому випадку, якщо система вибрана правильно, коефіцієнт розподілу зміщений в сторону сорбенту більше, ніж у випадку рідинно-рідинної екстракції. Основні фактори, які підкреслюють перевагу пористих полімерів при виділенні слідових кількостей органічних сполук з водних розчинів наступні: коефіцієнт розподілу у системі полімер-вода збільшується нескінченно, якщо сорбент вибрано правильно; поглинання води на полімері мінімальне; поверхня полімеру хімічно інертна. В загальні гідрофобні молекули притягуються з водних розчинів гідрофобною поверхнею сорбенту, а гідрофільні, полярні молекули гідрофільною або полярною поверхнею, дана концентрація може служити як направляюча. Вартість смол типу амберлітів відносно велика, тому краще використовувати сорбенти декілька разів. Амберліти ХАД-1 та ХАД-4 рекомендовані для виділення з крові похідних барбітурової кислоти, 1,4-бензодіазепинів, фенотіазинів, наркотичних алкалоїдів, мепробамата та ін. При аналізі тканин смоли використовують на етапі очистки та концентрування досліджуваних сполук з водних витягів та гідролізатів. У хіміко-токсикологічному аналізі особливо важливі пошук раціональної комбінації сорбентів при спрямованому аналізі, а також вивчення впливу характеру біологічного об'єкту, ступені його розкладення на ефективність процесу сорбції. Інші методи очистки використовують рідше, однак випадки їх використання відмічаються – це електрофорез на папері, діаліз, виморожування жиру, гідроліз та окиснення. В основі електрофорезу на папері лежить розділення речовин на папері, поміщений в електроліт, під дією електричного поля.

Іони досліджуваної суміші рухаються до електроду протилежного знаку. Цей метод за своїм механізмом та ефективності близький до методу ТШХ, однак потребує спеціального обладнання. Метод діалізу заснований на використанні напівпроникної мембрани, через пори якої здатні проходити іони, невеликі молекули органічних сполук в той час як крупні молекули (білки, пептиди та ін.) залишаються на іншій стороні мембрани. Осадження білків використовують доволі широко при дослідженні біологічного матеріалу на лікарські речовини.

Висновки. Оцінюючи різні методи очистки токсикантів від соекстрактивних домішок ендogenousного походження слід зазначити, що найбільш простим, швидким та ефективним методом є екстракційний метод. Він використовується доволі часто, но в багатьох випадках потребує дорогих та дефіцитних розчинників. Метод тонкошарової хроматографії – простий, достатньо доступний та швидкий, ефективний при дослідженні екстрактів, отриманих з об'єктів, які не знаходяться на стадії гнильних змін. В останньому випадку необхідна попередня очистка токсикантів за допомогою екстракційного методу або гель-хроматографію. Електрофорез на папері за ефективністю приближається до ТШХ методу, але потребує спеціального обладнання. Метод гель-хроматографії ефективний як екстракційний, але трудомісткий та потребує дорогих сорбентів. Метод дистиляції та сублімації – прості, ефективні методи очистки, але довготривалі та використовують тільки для аналізу екстрактів, які містять великі кількості токсикантів, що буває дуже рідко при проведенні хіміко-токсикологічних досліджень. Відмічаються втрати сполук, що аналізують при використанні вищезазначених методів. Метод твердофазової екстракції за різними параметрами (ефективність, швидкість, економічність) дорівнюється до методу рідинно-рідинної екстракції, але не годиться для дослідження об'єктів, які містять велику кількість ендogenousних речовин. Інші методи очистки екстрактів мають обмежене використання у зв'язку з тривалістю їх проведення та втратами сполук, які аналізують.

Список літератури

1. Аналітична токсикологія : навч. посіб. для студентів вищ. навч. закл. / С. В. Баюрка, В. С. Бондар, С. І. Мерзлікін та ін. – Харків : НФаУ : Золоті сторінки, 2017. – 384 с.
2. Вергейчик, Т. Х. Токсикологическая химия / Т. Х. Вергейчик. – М. : МЕДпресс-информ, 2009. – 400 с.
3. Токсикологическая химия : учебник для вузов / Т.В. Плетенева, Е. М. Саломатин, А. В. Сыроежкин и др. – М. : ТЭОТАР-Медиа, 2005. – 512 с.
4. Швайкова, М. Д. Токсикологическая химия / М. Д. Швайкова. – М. : Медицина, 1975. – 376 с.
5. Clark's analysis of Drugs and Poisons: Third edition [Електронний ресурс] / Laurent Y. Galichet. – 80 Min / 700 MB. – Pharmaceutical Press, 2005. – 1 електрон. опт. диск (CD-ROM); 12 см. – Систем. вимоги: Pentium; 128 Mb RAM; CD-ROM Windows XP / Vista. – Назва з титул. екрану.