

РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ПРОБОПІДГОТОВКИ БІОЛОГІЧНИХ РІДИН ДЛЯ ЇХ АНАЛІЗУ НА СЕКНІДАЗОЛ

Шовкова З.В., Ткаченко О.В., Полуян С.М., Погосян О.Г.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

zoiaashovkova@gmail.com

Вступ. Секнідазол – лікарський препарат з групи 5-нітроїмідазолів, що має багато побічних ефектів, які проявляються загальними симптомами гострої інтоксикації, особливо при взаємодії з іншими лікарськими засобами, а у разі застосування на фоні алкоголю можливі летальні випадки – навіть при прийомі терапевтичних доз. Він характеризується високою біодоступністю (в межах 80 – 100%) і швидким всмоктуванням при пероральному прийомі, зв'язується з білками плазми (на 10 – 20%), має великий об'єм розподілу, добре проникає у рідини і тканини організму, забезпечуючи високі тканинні концентрації. Виводиться із організму головним чином нирками – до 60 – 85% від прийнятої дози, при цьому 25 – 70% становить незмінений препарат. А це означає, що біологічні рідини є дуже важливими об'єктами хіміко-токсикологічного аналізу (ХТА) на секнідазол. Секнідазол є практично недослідженою речовиною з точки зору ХТА, в якому пробопідготовка біологічних рідин до подальшого аналізу посідає вагомe місце у структурі методик виявлення та кількісного визначення.

Мета дослідження. Розробити методику ізолювання секнідазолу з біологічних рідин (розрив зв'язків аналіта з компонентами біологічної матриці, настоювання, екстракція тощо), запропонувати способи очистки отриманих екстрактів від біологічної матриці та їх концентрування. Оцінити можливості застосування процедури пробопідготовки для використання в аналізі шляхом проведення попередньої фази валідації, у ході якої вивчають специфічність/селективність методики, стабільність аналіта в аналізованому розчині та ступінь його ізолювання з матриці.

Матеріали та методи. З урахуванням результатів дослідження рідинної екстракції секнідазолу з водних розчинів нами було виділено оптимальні напрямки проведення пробопідготовки біологічних рідин (крові та сечі) для подальшого виявлення та визначення в них секнідазолу. Одним з таких напрямків є пробопідготовка із застосуванням рідинно-рідинної екстракції органічними розчинниками, що не змішуються з водою. В цьому напрямку нами опрацьовувалось дві методики. Blank-зразки для методик: відбирали 5 зразків (25,00 мл) відповідної матриці, отриманої з 5 різних джерел; вносили піпеткою по 1,00 мл води дистильованої до кожного зразка; ретельно перемішували. Готували стандартні та робочі розчини секнідазолу, з різним кількісним вмістом речовини в 1,00 мл, які додавали до зразків біологічних рідин (25,00 мл крові або сечі) –

модельні зразки. Значення рН зразків в експерименті встановлювали за універсальним індикаторним папером, перемішували і залишали на 1 годину при постійному перемішуванні. Схема ізолювання за методикою 1: підкислення 6 моль/л розчином хлоридної до рН=2; екстракційна очистка хлороформом при рН = 2; висолювання за допомогою амоній сульфату; нейтралізація до рН = 7 за допомогою 25% розчину амоніаку; екстракція сумішшю хлороформ – ізопропанол (8:2) при рН = 7. Схема ізолювання за методикою 2: підкислення 6 моль/л розчином хлоридної кислоти до рН = 2; екстракційна очистка хлороформом при рН = 2; висолювання за допомогою амоній сульфату; підлужування до рН = 9 за допомогою 25% розчину амоніаку; екстракція хлороформом при рН = 9. Після процедури ізолювання проводили додаткову очистку отриманих органічних екстрактів методом тонкошарової хроматографії (ТШХ). Пластину двічі елюювали у хлороформі. Після висушування пластину елюювали з використанням рухомої фази хлороформ – метанол (90:10). На стадії підбору умов ТШХ-очистки було перевірено використання 0,1 моль/л та 0,01 моль/л розчинів хлоридної кислоти, 0,1 моль/л розчину натрій гідроксиду та етанолу як елюентів. Кількісне визначення секнідазолу у отриманих екстрактах проводили методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ-області спектра за методом стандарту та проводили розрахунки величин ступеня його ізолювання.

Результати та обговорення. Значення \bar{A}_{blank} для крові становить 0,086/0,042, для сечі – 0,091/0,051. Ступінь ізолювання секнідазолу за методикою 1 із крові становить 86%, із сечі – 94%. Значення \bar{A}_{blank} для крові становить 0,057/0,034, для сечі – 0,062/0,035. Ступінь ізолювання секнідазолу за методикою 2 із крові становить 73%, із сечі – 82%. Використання 96% етанолу як елюента є неефективним. Ступінь елюювання секнідазолу з хроматографічних пластини 96% етанолом, при проведенні ТШХ-очистки, складає близько 60%. В той же час і розчини кислоти, і розчин луку дозволяють елюювати до 99% секнідазолу з пластини. Тому в експерименті з біологічними рідинами застосовували саме ці три елюенти в залежності від методики кількісного визначення секнідазолу, використовуюваної у подальшому.

Висновки. Розроблена нами методика 1 для ізолювання секнідазолу з біологічних рідин з використанням екстракції сумішшю хлороформ – ізопропанол (8:2) при рН = 7 дозволяє ізолювати великий відсоток досліджуваного аналіту як з крові, так із сечі. А запропонована ТШХ-очистка отриманих органічних екстрактів дає можливість отримати досить чисті елюати з малими втратами досліджуваної речовини. Тому ця методика може використовуватись у загальному ХТА на секнідазол, особливо при гострих отруєннях.