

ХРОМАТОГРАФІЧНИЙ МЕТОД ІДЕНТИФІКАЦІЇ АМІНОКИСЛОТ В ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТАХ

*А. Свидло, Ю.Свидло, М. Ларіонова, керівники- Н.І.Горбунова, Л.П.Павлова
Коледж Національного фармацевтичного університету*

В минулому році об'єктом дослідження студентів-гуртківців був Нітроген (II) оксид (NO) та його неймовірні властивості.

Нітроген (II) оксид бере участь в регуляції всіх найважливіших процесів в організмі людини: від мозкової діяльності до активності статевої системи. Дана сполука розслаблює кров'яні судини, перешкоджає утворенню тромбів, знижує артеріальний тиск, підвищує рівень кисню в організмі людини. Імунні клітини синтезують Нітроген (II) оксид, щоб знищити бактерії та віруси, які здатні викликати інфекційні захворювання. Відомо також здатність NO попереджувати появу доброякісних та злоякісних пухлин в клітинах організму [1].

В 1992 році Нітроген (II) оксид став молекулою року. «Молекула життя» – так назвали цю сполуку. Звідки ж з'являється NO в організмі людини? В 1987 році було виявлено, що нітроген (II) оксид, синтезується із амінокислоти L-аргініну за участю сімейства ферментів NO-синтаз. Тому для повноцінного постачання в організм NO, дуже важливо забезпечити безперервне надходження амінокислоти L-аргініну.

L-аргінін – одна із двадцяти амінокислот, що приймають участь в утворенні білків. Аргінін (2-аміно-5-гуанідинпентанова кислота) – аліфатична α -амінокислота. Оптично активна, існує у вигляді L- і D-ізомерів. L-Аргінін входить до складу пептидів і білків, особливо високий вміст аргініну в основних білках – гістонів і протамінах (до 85%) [2].

З літературних джерел відомо, що для визначення амінокислот у лікарських формах використовують метод фотоелектроколориметрії з використанням аллоксана, високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ), визначення нітрогену по К'ельдалю, гравіметрію та метод формольного титрування [3].

Амінокислоти вивчаються студентами коледжу на заняттях з хімії на першому курсі та з органічної хімії на другому курсі. На лабораторних роботах студенти досліджують хімічні властивості амінокислот та проводять якісні реакції на амінокислоти та білки, такі як біуретову, ксантопротеїнову та реакцію з нінгідрином.

На позааудиторних заняттях в рамках гурткової роботи студенти знайомляться з фізико-хімічним аналізом амінокислот.

Метою даної роботи студентів-гуртківців було вивчення хроматографічних методів ідентифікації та розділення амінокислот, що входять до складу лікарських препаратів.

Хроматографічний метод був відкритий у 1903 р. М.С. Цветом, який вперше застосував його для розділення рослинних пігментів.

На сьогодні хроматографію широко використовують у наукових дослідженнях і в практиці контрольної-аналітичних, клінічних та хіміко-токсикологічних лабораторій.

У медицині й фармації застосовують паперову, тонкошарову, газову хроматографії та ВЕРХ, які відрізняються від інших методів простотою та зручністю виконання експерименту. У поєднанні з мікрокількістю досліджуваних речовин, необхідних для аналізу, це забезпечило її значне поширення в хімічному, біохімічному та фармацевтичному аналізі.

Для розділення суміші амінокислот часто використовують метод паперової хроматографії.

Паперову хроматографію (ПХ) класифікують за механізмом на розподільну та адсорбційну. У ПХ як нерухому фазу використовують хроматографічний папір, або речовини, заздалегідь нанесені на його волокна.

Для одержання хроматограми розчини чистих стандартних речовин («свідків») і суміш, яку необхідно розділити, наносять на хроматографічний папір, нижній кінець якого занурюють у відповідну систему розчинників. Через деякий час суміш розділяється на зони окремих компонентів. Для виявлення зон хроматограму розглядають у світлі УФ-випромінювання і позначають

олівцем контури плям. Якщо компоненти дають кольорові реакції, то хроматограму проявляють, занурюючи її в розчин реагенту або обприскуючи з пульверизатора.

Характеристикою компонентів є величина R_f — відношення відстані від стартової лінії хроматограми до центра плями цієї речовини (l) до відстані, яку пройшов фронт розчинника (L): $R_f = l/L$.

Величину R_f використовують для ідентифікації речовин. Ідентичність визначають одночасним хроматографуванням на одному аркуші паперу досліджуваного та автентичного зразка тієї самої речовини. Якщо зразки ідентичні, відповідні їм плями на хроматограмах мають однакові значення R_f .

Методи і матеріали

В експерименті використали як стандарти *L*-аргінін (ч.д.а., «Sigma»), гліцин (ч.д.а., «Sigma»), метіонін (ч.д.а. «Merk»), цистеїн (ч.д.а., «Sigma»). Аналізували лікарські препарати «Глутаргін», «Гліцин», «Метіонін», «Ацетал С». Розділення амінокислот проводили методом тонкошарової хроматографії на пластинках «Silufol».

Результати експерименту та їх обговорення

Розчини амінокислот готували в концентрації 50-80 мг/10 см³ води. Для приготування розчинів амінокислот, що входять до складу твердих лікарських форм, їх ретельно подрібнювали і екстрагували водою з подальшим фільтруванням. Стандартні та досліджувані розчини амінокислот наносили на стартову лінію, що проведена на відстані близько 1 см від нижнього краю пластинки.

Нанесення розчинів амінокислот проводили тонким капіляром таким чином, щоб діаметр плями не перевищував 3-5 мм. Пластинку зі зразками підсушували і вносили в хроматографічну камеру так, щоб нижній її край був занурений у елюент на 0,5-0,8 см. Елюентом слугував 4% водний розчин фенолу. Як проявник використовували 0,1% етанольний розчин нінгідрину.

Камеру герметично закривали. Після того, як розчинник піднімався на 10-12 см, пластинку виймали з камери та висушували на повітрі. Наступним

кроком була обробка пластинки розчином нінгідрину за допомогою пульверизатора. Для підсилення фарбування плям доцільно висушити пластинку у сушильній шафі при температурі не вище 100 С.

Визначення складу амінокислот проводили співставленням R_f забарвлених плям, що одержані на хроматограмі для стандартних розчинів та розчинів, приготовлених з лікарських препаратів.

З літературних джерел відомі R_f хроматографічного аналізу амінокислот у різних елюентах, проведеного методом паперової хроматографії (табл.1) [3].

Таблиця 1.

R_f досліджуваних амінокислот у різних елюентах методом паперової хроматографії

Амінокислота	Елюент фенол-вода (насичений)	Елюент н-бутанол-льодяна оцтова кислота-вода (4:1:1)
L-аргінін	0,9	0,18
Гліцин	0,41	0,34
Метіонін	0,83	0,58
Цистеїн	0,03	0,13

Механізм паперової хроматографії базується на властивості поглинати воду і утримувати її між целюлозними волокнами. Воду можна розглядати як один із розчинників, вона є нерухомою фазою. При переміщенні по паперові під дією капілярних сил неводного розчинника, наприклад фенолу (рухлива фаза), молекули досліджуваної речовини розподіляються між двома фазами у відповідності до їх коефіцієнтів розподілу. Чим вище розчинність речовини у рухливій фазі, тим на більшу відстань вона переміститься на папері вслід за розчинником.

Механізм тонкошарової хроматографії заснований на явищі адсорбції. Речовини сорбуються на даному адсорбенті згідно з законом адсорбційного

заміщення, встановленого М.С. Цвєтом. Тому R_f одержані названими методами в одному елюенті будуть відрізнятися.

Експериментальні дані хроматографічного визначення R_f амінокислот у лікарських препаратах наведені у таблиці 2.

Таблиця 2.

Ідентифікація амінокислот, що входять до складу лікарських препаратів за R_f стандартів методом ТШХ на пластинках «Silufol»

Амінокислота/лікарський препарат	Брутто-формула	Відстань від старту до центру плями, $l, (см)$	Відстань від старту до фронту розчинника, $L, (см)$	R_f
L-аргінін / «Глутаргін»	$C_6H_{14}N_4O_2$	2,0/2,0*	12,5	0,16/0,16*
Гліцин / «Гліцин»	$C_2H_5NO_2$	8,2/8,2*	9,0	0,91/0,91*
Метіонін / «Метіонін»	$C_5H_{11}NO_2S$	7,8/7,8*	8,8	0,88/0,88*
Цистеїн / «Ацетал С»	$C_3H_7NO_2S$	9,0/8,9*	9,7	0,93/0,92*

Примітка: * – у лікарських препаратах.

Ідентифікація проведена в порівнянні зі стандартами.

Висновки

Таким чином, одержані результати вказують на те, що метод ТШХ прийнятний для розділення та ідентифікації амінокислот у лікарських препаратах. Цей метод є простий, зручний, не потребує багато часу та коштів для його виконання. Використання даної методики доцільно при проведенні лабораторних робіт з дисципліни «Органічна хімія» та/або «Фізикоїдна хімія».

Крім того, залучення студентів до освоєння нових методів визначення хімічних речовин у лікарських препаратах сприяє розвитку їх професійної майстерності та формує реальне уявлення про використання набутих знань у фармацевтичній практиці.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Биохимия: учебник / Л. В. Авдеева, Т. Л. Алейникова, Л. Е. Андрианова [и др.]; под ред. Е. С. Северина. – 5-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 768 с. – ISBN 978-5-9704-2029-4.
2. Клінічна біохімія: підручник / Д. П. Бойків, Т. І. Бондарчук, О. Л. Іванків [та ін.]; за ред. О. Я. Склярєва. – К.: Медицина, 2006. – 432 с. – ISBN 966-8144-32-5.
3. Кучеренко М. Є. Сучасні методи біохімічних досліджень: навчальний посібник / М. Є. Кучеренко, Ю. Д. Бабенюк, В. М. Войціцький. – К. : Фітосоціоцентр, 2001. – 424 с. – ISBN: 966-7938-21-2.

ВИЗНАЧЕННЯ МІНЕРАЛЬНОГО СКЛАДУ ЗБОРІВ РОСЛИННИХ, ЩО ЗАСТОСОВУЮТЬСЯ ПРИ РЕСПІРАТОРНИХ ЗАХВОРЮВАННЯХ

*С. Свистун, О.Наумова, Т.Кузьменко, керівник – Т.П. Зарудко
Коледж Національного фармацевтичного університету*

Сучасна фармація і медицина мають достатній асортимент лікарських засобів, що застосовуються при респіраторних захворюваннях, серед яких переважну долю мають засоби рослинного походження. До їх основних переваг відносять доступність, безпечність і взаємозамінність. Побічні ефекти, головним чином, алергічні реакції, при використанні лікарських рослин спостерігаються зрідка і легко усуваються шляхом заміни на інший засіб з аналогічними видами дій. Фітотерапія дозволяє посилювати дієвість синтетичних лікарських засобів, корегувати їх дозування тощо [3].

Лікарські рослини, що застосовуються для лікування захворювань бронхів і легень, повинні володіти такими властивостями: протимікробними, протизапальними, відхаркувальними, муколітичними, секретолітичними, обволікаючими, бронхолітичними, антигіпоксантичними, імуномодулюючими, седативними.