

## 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  $\alpha$ -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 контрольно-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 см<sup>3</sup> 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. Цветом. 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.