На правах рукописи

Клищенко Роман Александрович

ТСХ-СКРИНИНГ И ВЭЖХ-ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ФЕНОТИАЗИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

02.00.02 – аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Краснодар 2005

Работа выполнена на кафедре аналитической химии
Кубанского государственного университета

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Темердашев Зауаль Ахлоович

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Стрижов Николай Константинович
кандидат технических наук, доцент
Якуба Юрий Федорович

Ведущая организация: Пятигорская государственная фармацевтическая академия

Защита состоится 8 декабря 2005 г. в 12^{00} в ауд. 231 на заседании диссертационного совета Д 212.101.10 в Кубанском государственном университете по адресу: г. Краснодар, ул. Ставропольская 149, КубГУ.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Кубанского государственного университета: 350040, Краснодар, ул. Ставропольская 149.

Автореферат разослан «3» ноября 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат химических наук,
доцент Киселева Н.В.

2007-4
6576

2393494

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Производные фенотиазина – лекарственные препараты, обладающие широким спектром действия, находят применение в терапии заболеваний сердечно-сосудистой и центральной нервной системы, а также при неврологических заболеваниях.

Для рутинного скрининга этих лекарственных веществ и их метаболитов в биологических средах широко используются различные виды хроматографии. Особую популярность в настоящее время приобретает систематический токсикологический анализ, так как такой подход позволяет с высокой степенью надежности определять широкий спектр токсикантов в биообразцах. Однако существующие методики направлены главным образом на групповую идентификацию и контроль отдельных наиболее часто используемых веществ и ограничены в применении из-за различных недостатков в селективности и чувствительности. Повысить эффективность методики анализа может использование специального вида пробоподготовки, обеспечивающего извлечение и очистку целевых компонентов. Широкое применение лекарственных средств на основе фенотиазинового ряда в терапевтической практике, а также при диагностике отравлений требует разработки унифицированной методики их определения в биологических объектах.

Диссертационная работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ-юг грант №03-03-96542).

Цель работы. Разработка аналитической схемы хроматографического определения лекарственных препаратов в биологических объектах.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие **задачи**:

- теоретическое и практическое обоснование оригинальной схемы анализа биологических объектов методами хроматографии;
- поиск новых методов разделения и концентрирования для извлечения производных фенотиазина из биологических объектов;
- разработка методики скрининга биологических объектов на наличие производных фенотиазина методом тонкослойной хроматографии;

РОС... ...НАЯ
Г... ...ТКА
2007 ...

- разработка методики количественного определения производных фенотиазина в биологических объектах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Научная новизна. Разработана аналитическая схема хроматографического определения производных фенотиазина для целей химико-токсикологического контроля.

Предложен методический подход по оценке зависимости хроматографического удерживания производных фенотиазина от состава элюента на основе его физико-химических параметров.

Практическая значимость. Разработана универсальная методика хроматографического количественного определения производных фенотиазина, пригодная для целей химико-токсикологического контроля и контроля качества лекарственных препаратов.

Реализован метод твердофазной экстракции производных фенотиазина из биологических объектов, обеспечивающий эффективное концентрирование и отделение от матрицы пробы.

На защиту выносятся:

- разработанная схема хроматографического анализа биологических объектов на содержание производных фенотиазина;
- методика определения производных фенотиазина в биологических объектах;
- сорбционные характеристики сверхсшитого полистирола по отношению к производным фенотиазина в различных системах растворителей;
- установленные зависимости между хроматографическим удерживанием производных фенотиазина и физико-химическими параметрами используемой системы элюирования;

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на Международной конференции «Новые технологии и приложения современных физико-химических методов для изучения окружающей среды» (Ростов-на-Дону, 2001), Всероссийском симпозиуме «Современные проблемы хроматографии» (Москва, 2002), Международном симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии» (Краснодар, 2002), Всероссийском симпозиуме «Хроматография и хроматографические приборы» (Москва, 2004), Всероссийской конференции «Аналитика России» (Москва, 2004), II Международном симпозиуме «Разделение и

концентрирование в аналитической и радиохимии» (Краснодар, 2005). По материалам диссертации опубликовано 11 работ в виде статей и тезисов докладов.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, одной главы экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы, приложения Материал диссертации изложен на 137 страницах текста, содержит 38 рисунков и 27 таблиц, в списке цитируемой литературы 129 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В литературном обзоре обсуждены методы пробоподготовки, скрининга и определения, производных фенотиазина и их метаболитов в биологических объектах, их основные достоинства и недостатки.

Разработку методик определения проводили с использованием аминазина, перициазина, этаперазина, нонахлазина, сонапакса, трифтазина и тизерцина.

Извлечение производных фенотиазина из биологических объектов с использованием твердофазной экстракции

Метод твердофазной экстракции имеет ряд преимуществ по сравнению с жидко-жидкостной и более перспективен для применения в химическом анализе как способ пробоподготовки. Как показали наши исследования, сверхсшитый полистирол в качестве сорбента для извлечения производных фенотиазина из биологических объектов является высокоэффективным, так как он является органическим неполярным материалом, в структуру которого входят бензольные кольца, что позволяет сделать предположение о высоком сродстве и селективности к соединениям с ароматическим фрагментами. Мы провели исследование сорбционных свойств сверхсшитого полистирола по отношению к исследуемым веществам.

Динамическую емкость сверхсшитого полистирола изучали на водных растворах аминазина с концентрацией 1 мг/мл при скорости прокачивания его через патрон 1 мл/мин. Динамическая сорбционная емкость патрона достаточно высока и составляет 15 мг, а удельная динамическая сорбционная емкость – 65 мг/г, что

позволило применить сверхсшитый полистирол для целей извлечения производных фенотиазина из матрицы биологической пробы.

Другим важным параметром в процессе экстракции при работе с концентрирующим патроном является объем растворителя, необходимый для вымывания целевого компонента. В качестве таких растворителей использовали этанол, ацетонитрил, этилацетат, хлороформ, ацетон

Наиболее эффективными элюентами оказались хлороформ и ацетон с объемом элюирования 8 мл. При использовании гидрофильных растворителей (этанол, ацетонитрил, ацетон) необходимый объем растворителя можно уменьшить добавлением в него небольшого количества трифторуксусной кислоты (10 мкл 1М ТФУ на 10 мл растворителя) до 6 мл для этанола и ацетона и до 5 мл для ацетонитрила.

Для повышения степени очистки образца в пробу вводили этанол, и сорбция пигментных веществ, присутствующих в пробе, существенно снижалась. Однако добавка этанола также снижает эффективность извлечения целевых компонентов, при добавке которого в количестве 10% об. к водному раствору смеси фенотиазинов наблюдался проскок после прокачивания 15 мл, а при 20% об. – после 2 мл исследуемой смеси. Поэтому дальнейшие исследования проводили с объемом пробы в 10 мл.

ТСХ-скрининг и определение производных фенотиазина в биологических объектах

Метод тонкослойной хроматографии, наиболее пригодный для экспрессного обнаружения лекарственных препаратов в биологических объектах, использовали для реализации скрининговых исследований в ходе систематического анализа. Эффективность применения этого метода зависит от ряда факторов (состав элюента, проявителя, условия детектирования, относительная влажность в хроматографической камере), и наиболее оптимальными являются такие условия, в которых достигается максимальное разделение определяемых веществ.

В исследовании использовали растворители, применяемые в тонкослойной хроматографии на силикагеле, такие как: гексан, бензол, ацетонитрил, диэтиловый эфир, ацетон, этилацетат, хлороформ, метанол, этанол и изопропанол. В качестве

элюентов использовали чистые растворители, бинарные и тройные смеси. Было изучено 10 элюентов чистых растворителей, 21 элюент двойных смесей в соотношении 1:1 (без этанола и изопропанола) и 35 тройных смесей (1:1:1).

По результатам проведенных экспериментов можно сделать вывод, что для получения эффективной системы элюирования необходим особый модификатор, аналогичный по природе разделяемым веществам и обладающий основными свойствами Таким модификатором может быть аммиак, который использовался авторами. В этом случае основная сложность связана с тем, что аммиак используется в виде водного раствора, а вода не смешивается со многими органическими растворителями, что требует использования гидрофильных растворителей, как в чистом виде, так и в качестве добавки для повышения взаимной растворимости компонентов элюентов.

Другим способом оптимизации разделения может быть модификация сорбента, которая достигается насыщением аммиаком объема камеры Недостатком такого способа модификации является то, что ее устройство должно позволять одновременно использовать две жидкости без их смешивания, то есть необходимо как минимум два разделенных отдела для растворителей, что реализуется в специальных типовых камерах. Кроме того, для получения воспроизводимых результатов необходимо насыщение камеры перед каждым экспериментом.

Кроме аммиака можно применить и другие вещества-модификаторы элюента. Наиболее типичным примером таких веществ являются алифатические производные аммиака, например триметиламин, триэтиламин и т.д Такие соединения более липофильны по сравнению с аммиаком и, следовательно, лучше смешиваются с органическими растворителями, что в значительной степени расширяет возможности их применения С другой стороны, эффективность третичных аминов с длинной цепью углеводородных радикалов низка, и наилучший результат можно получить с их самыми простыми представителями Нами изучено хроматографическое поведение производных фенотиазина при использовании триметиламина. Поскольку в свободном виде он газообразен, то работали с его гидрохлоридом.

В результате проведенных экспериментов установлены составы элюентов, обеспечивающие приемлемое разделение компонентов: **1** – гексан-ацетон-25% аммиак (60:40.насыщ), **2** – гексан-ацетон-25% аммиак (50:50:насыщ), **3** – ацетонитрил-

25% аммиак (95:5), **4** – ацетонитрил-25% аммиак (90:10), **5** – хлороформ-ацетон-25% аммиак (80:20:насыщ), **6** – хлороформ-ацетон-25% аммиак (50:50:насыщ) **7** – ацетон-25% аммиак (100:1), **8** – этилацетат-ТМА (40мг/мл), **9** – хлороформ-ТМА (30 мг/мл), **10** – метанол. Значения R_f веществ в системах **1-10** приведены в таблице 1. Приведенные первые девять систем ранее для подобных разделений не использовались.

Таблица 1 – Значения R_f исследуемых соединений в различных системах элюирования

Соединение	Элюент									
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Аминазин	0,48	0,70	0,66	0,80	0,74	0,78	0,67	0,70	0,75	0,45
Перициазин	0,17	0,36	0,54	0,67	0,24	0,53	0,64	0,34	0,17	0,69
Этаперазин	0,16	0,33	0,42	0,58	0,29	0,46	0,36	0,21	0,28	0,59
Нонахлазин	0,21	0,40	0,43	0,63	0,62	0,69	0,39	0,35	0,49	0,52
Сонапакс	0,39	0,61	0,60	0,76	0,74	0,77	0,58	0,55	0,65	0,37
Трифтазин	0,28	0,51	0,50	0,68	0,65	0,69	0,39	0,44	0,61	0,44
Тизерцин	0,63	0,74	0,82	0,87	0,81	0,83	0,78	0,80	0,81	0,54

Приведенные системы могут использоваться в рутинном анализе для ТСХ-скрининга производных фенотиазина. Более высокой разрешающей способности предварительного анализа можно добиться при использовании метода двумерной тонкослойной хроматографии. Для подбора пар систем элюирования изучено наличие корреляции между значениями R_f компонентов в предложенных системах. Наименьшие коэффициенты корреляции были получены для следующих сочетаний элюентов: ацетон-25%-аммиак (100.1) – метанол ($r = 0,25$) и ацетонитрил-аммиак (95:5) – метанол ($r = 0,42$) Полученные хроматограммы двумерной ТСХ показаны на рисунках 1 и 2.

Определение аналитических характеристик производных фенотиазина для целей количественного определения осуществляли на растворах с концентрацией 1–5 мкг/мл в диапазоне 0,1–10,0 мкг Элюирование проводили в системе ацетон-аммиак (100:1) с предварительным насыщением камеры. В качестве программного

обеспечения использовали программу «ТСХ-менеджер». Пример хроматограммы для аминазина приведен на рисунке 3.

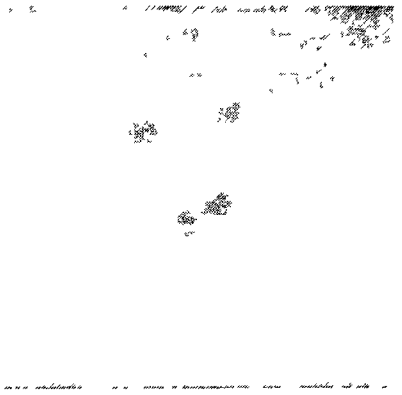


Рисунок 1 – Двумерная хроматограмма в системах ацетон-25%-аммиак (99:1) – метанол

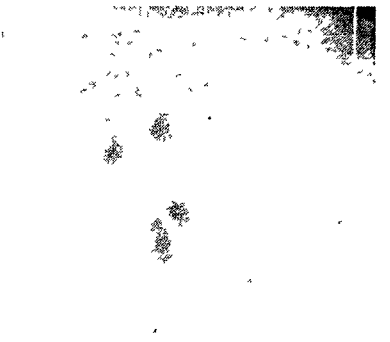


Рисунок 2 – Двумерная хроматограмма в системах ацетонитрил-25%-аммиак (95:5) – метанол

При количестве 10 мкг аминазина на пластинке получается заниженное значение объема пятна, которое не укладывается на градуировочную кривую.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования метода тонкослойной хроматографии для количественного определения производных фенотиазина.

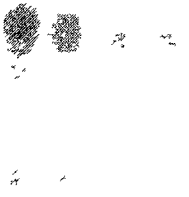


Рисунок 3 – ТС-хроматограмма аминазина в диапазоне 0,1–10,0 мкг

Исследование хроматографического поведения производных фенотиазина

Определение связи между удерживанием вещества и условиями хроматографирования является актуальной прикладной и теоретической задачей. Удерживание в жидкостной хроматографии является функцией трех основных факторов – характеристик сорбата, сорбента и элюента. При условии постоянства сорбата и сорбента эта величина будет зависеть только от параметров подвижной фазы, поэтому функция удерживания упрощается и ее можно рассматривать как более простую – однопараметрическую. Применение такой эмпирической зависимости может быть эффективным для скрининга исследуемых веществ при наличии данных об аналитическом виде этой функции.

Как было показано ранее, наиболее высокие значения R_f производных фенотиазина наблюдаются при использовании метанола. Улучшить разделение компонентов в этом случае можно при использовании его смеси с малополярным растворителем. Метанол крайне ограниченно смешивается с гексаном, поэтому исключается возможность применения последнего в качестве разбавителя. Для этих целей вторым компонентом элюента выбрали бензол и в дальнейшем исследования проводили со смесью бензола и метанола Было детально изучено хроматографическое поведение исследуемых веществ и при различных составах элюента определены значения R_f (таблица 2).

Таблица 2 – R_f фенотиазинов в системе бензол – метанол

Вещество	Соотношение бензола и метанола в элюенте						
	10:0	9:1	7:3	5:5	3:7	1:9	0:10
Аминазин	0,00	0,37	0,66	0,71	0,58	0,45	0,45
Перициазин	0,00	0,18	0,61	0,80	0,76	0,68	0,69
Этаперазин	0,00	0,19	0,63	0,78	0,75	0,65	0,59
Нонахлазин	0,00	0,21	0,61	0,72	0,64	0,57	0,52
Сонапакс	0,00	0,30	0,64	0,68	0,50	0,40	0,37
Трифтазин	0,00	0,27	0,64	0,74	0,64	0,53	0,44
Тизерцин	0,00	0,50	0,65	0,77	0,66	0,56	0,54

Графический вид зависимости R_f от состава элюента для всех исследуемых веществ идентичен и на рисунке 4 приведен пример для аминазина.

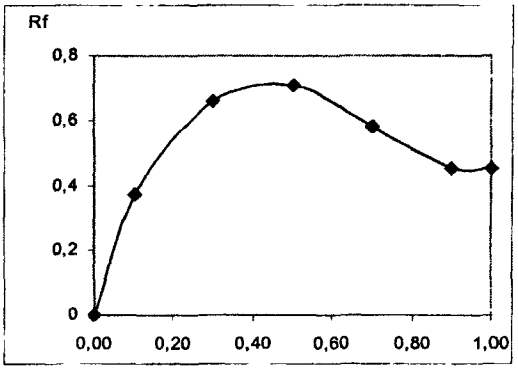


Рисунок 4 – Зависимость R_f аминазина от объемной доли метанола в смеси с бензолом

Как видно, такая зависимость имеет максимум и отличается от классического вида зависимости R_f – состав при использовании в качестве элюента бинарной смеси гексан – полярная добавка, в соответствии с которой R_f монотонно возрастает с увеличением доли полярной добавки.

Это дало основание предположить, что содержание полярного модификатора в рассмотренных системах элюирования не является определяющим фактором для величины R_f по сравнению с вариантами использования гексана в качестве разбавителя Многовариантность задачи оптимизации хроматографической системы делает эту работу достаточно трудоемкой и для ее успешной практической реализации необходима информация о возможных типах физико-химических взаимодействий и закономерностях изменения параметров удерживания, на основании которых можно было бы получить эмпирические зависимости, описывающие экспериментальные данные. Для этого необходим подбор параметров, отражающих все возможные типы взаимодействий, присутствующих в рассматриваемой системе: дисперсионные, диполь-дипольные, кислотно-основные.

С учетом этих факторов форма экспериментальной кривой, показанной на рисунке 4, описывается уравнением зависимости значений R_f для одного из веществ от физико-химических параметров элюента следующего вида:

$$R_f = a_0 + a_1 f(e) + a_2 f(n) + a_3 Pxe + a_4 Pxd + a_5 Pxn, \quad (1)$$

где f(e) – функция диэлектрической проницаемости элюента, f(n) – функция коэффициента преломления элюента, Pxe – параметр элюента, характеризующий его как акцептор электрона (по Снайдеру), Pxd – параметр элюента, характеризующий его как донор электрона и Pxn – параметр элюента, характеризующий его как диполь. Функции f(e) и f(n) характеризуют неспецифическую сольватацию растворителя, обусловленную полярностью и дисперсионными взаимодействиями. Данные по e и n аппроксимированы полиномом второй степени в координатах e(n) – состав смеси. Коэффициенты корреляции составляют 0,9992 и 0,9998 соответственно.

Параметры Pxe, Pxd и Pxn включены в уравнение (1) для характеристики кислотности и основности элюентов. Их значения рассматривались как аддитивная сумма составляющих её растворителей.

Расчет коэффициентов a_0–a_5 для каждого вещества проводился решением системы уравнений вида (1) для шести различных составов элюентов. Полученные значения коэффициентов приведены в таблице 3.

Таблица 3 – коэффициенты a_0–a_5

Вещество	a_0	a_1	a_2	a_3	a_4	a_5	r
Аминазин	-16,45	2,95	28,64	2,93	1559,82	-1106,74	0,9908
Перициазин	17,49	6,14	-35,25	0,84	1775,42	-1267,57	0,9948
Этаперазин	10,06	4,74	-22,90	-0,22	755,80	-539,43	0,9991
Нонахлазин	8,70	5,61	-17,87	0,86	1328,79	-948,08	0,9969
Сонапакс	-0,52	6,15	1,72	2,79	2170,90	-1546,55	0,9880
Трифтазин	-0,73	4,08	-2,29	1,17	1241,22	-882,77	0,9971
Тизерцин	-39,28	0,02	69,70	3,71	982,17	-689,82	0,9974

Анализ данных таблицы 3 на наличие связи между коэффициентами a_0–a_5 показал, что коэффициенты корреляции выше 0,9 имеются между: a_0–a_1 (0,9303); a_0–a_2 (-0,9989); a_1–a_2 (-0,9126) и a_4–a_5 (-0,9999). Наличие корреляции свидетельствует о взаимосвязи между соответствующими параметрами и предложенное уравнение (1) может быть упрощено, однако это приведет к снижению точности расчета. Отрицательная корреляция между коэффициентами a_1 и a_2, а также a_4 и a_5 указывает на обратно-пропорциональную связь между специфическим и неспецифическим взаимодействием сорбата с элюентом. Величина коэффициента a_3 незначительна по сравнению со значениями a_4 и a_5, что свидетельствует о том, что свойства элюента в данной системе как акцептора электрона проявляются в наименьшей степени. Вместе с тем, исключение из уравнения какого-либо параметра приводило к значительному снижению точности расчета.

Знаки «+» и «–» указывают на вклад соответствующего параметра в величину удерживания. Pxd увеличивает R_f и уменьшает удерживание, а Pxn, наоборот, уменьшает R_f и увеличивает удерживание. Это напрямую связано со свойствами сорбата и сорбента Специфическое кислотно-основное взаимодействие сорбата с элюентом препятствует его сорбции на сорбенте, а неспецифическое диполь-дипольное, наоборот, способствует.

С учетом вышеизложенных зависимостей уравнение (1) принимает вид:

$$R_f = a_0 + a_1 f(e) + a_2 f(n) + a_{1p}\varphi P_1 + a_{2p}(1-\varphi)P_2 \qquad (2)$$

Уравнение (2) более наглядно, из него видно, что величина R_f пропорциональна полярности каждого из растворителей В случае если полярность одного из растворителей равна нулю, то R_f зависит только от полярности второго компонента смеси, что реализуется в случае использования гексана в качестве одного из компонентов элюента. Коэффициенты a_{1p} и a_{2p} можно интерпретировать как суммарный вклад каждого растворителя в полярность элюента с учетом рассмотренных выше типов взаимодействий.

Рассчитанные значения коэффициентов a_{1p} и a_{2p} для соединений фенотиазинового ряда представлены в таблице 4.

Таблица 4 – коэффициенты a_{1p} и a_{2p}

Вещество	a_{1p}	a_{2p}
Аминазин	1,79	1,48
Перициазин	-2,08	-1,95
Этаперазин	-0,94	-1,05
Нонахлазин	-1,23	-1,16
Сонапакс	-0,62	-0,49
Трифтазин	0,21	-0,03
Тизерцин	4,73	4,01

Высокая степень корреляции между коэффициентами a_{1p} и a_{2p} (r = 0,9989) свидетельствует о том, что сольватация исследуемых веществ элюентом происходит по одному механизму.

С использованием полученных коэффициентов a_0–a_5 были рассчитаны значения R_f для исследуемых веществ в тех же элюентах (таблица 5).

Таблица 5 – Рассчитанные значения R_f для системы бензол – метанол

Вещество	Соотношение бензола и метанола в элюенте						
	10:0	9:1	7.3	5:5	3:7	1:9	0:10
Аминазин	0,00	0,33	0,70	0,71	0,62	0,51	0,45
Перициазин	0,00	0,13	0,66	0,80	0,81	0,75	0,69
Этаперазин	0,00	0,17	0,65	0,78	0,77	0,67	0,59
Нонахлазин	0,00	0,17	0,65	0,72	0,68	0,58	0,52
Сонапакс	0,00	0,24	0,70	0,68	0,56	0,43	0,37
Трифтазин	0,00	0,23	0,68	0,74	0,68	0,53	0,44
Тизерцин	0,00	0,47	0,78	0,77	0,68	0,59	0,54

Расхождение между расчетными и экспериментальными данными не превышает 0,07.

Таким образом, полученное уравнение, позволяет прогнозировать значение R_f некоторых соединений фенотиазинового ряда на пластинах с силикагелем в системе бензол–метанол. Данное уравнение применимо для целей направленного скрининга и,

при наличии данных о R_f произвольной группы веществ для шести базовых составов элюентов позволяет рассчитать оптимальный состав элюента для разделения любой гипотетической смеси веществ из этой группы. В случае большого числа веществ процедуру расчета и оптимизации хроматографических параметров целесообразно проводить с использованием ЭВМ.

Использование величины R_f для идентификации и сопоставления результатов исследований, полученных в разных лабораториях, затруднено низкой воспроизводимостью свойств хроматографических пластинок разных производителей и даже разных партий.

С учетом методического подхода Карташова В.А. по исследованию воспроизводимости параметра относительной миграции веществ нами было предложено использовать произвольное количество стандартных веществ, причём величины миграции рассчитываются по формуле:

$$M_{отн} = M_{отн.н.ст} + \frac{R_{fв-ва} - R_{fн\ ст}}{R_{fв\ ст} - R_{fн.ст}},$$

где $M_{отн}$ – относительная миграция вещества, $M_{отн\ н\ ст}$ – относительная миграция нижнего стандарта, $R_{f\,в\ ва}$, $R_{f\,н\ ст}$, $R_{f\,в\ ст}$ – R_f вещества, нижнего и верхнего стандартов соответственно.

Величина относительной миграции для линии старта равна 0, первого стандартного вещества – 1, второго – 2, третьего – 3, и т.д.

Для проверки эффективности такого подхода к идентификации компонентов сложных смесей использовали вещества разных классов, поскольку литературных данных по отдельному классу производных фенотиазина недостаточно для проведения подобных расчетов.

Использовали 5 хроматографических систем, из них первые 4 из числа 10-ти стандартных, применяемых в химико-токсикологическом анализе с различными элюентами: ацетон (1, 5), этилацетат-метанол-25%аммиак (17:2:1) (2), метанол (3), хлороформ-метанол (9:1) (4) При использовании в качестве подвижной фазы ацетона и смеси хлороформ-метанол (9 1) пластинки обрабатывали 0,1М раствором КОН

Сравнивали рассчитанные значения относительной миграции по литературным и экспериментальным данным В системе 1 в качестве стандартных веществ были выбраны прокаин и седуксен, в системе 2 – изониазид и папаверин, в системе 3 – хинин, галоперидол и папаверин и в системе 4 – димедрол и папаверин. Полученные результаты для систем 1-4 представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Значения относительной миграции

Название	$M_{отн}$							
	Ацетон 0.1М КОН (1)		EtAc–MeOH–NH_3 (25%) (2)		MeOH (3)		$CHCl_3$–MeOH (9:1) (4)	
	Эксп.	Табл.	Эксп.	Табл.	Эксп.	Табл.	Эксп.	Табл.
Церукал	0,51	0,44	1,53	1,55	0,58	0,67	0,37	0,22
Обзидан	0,41	0,24	1,61	1,58	0,89	0,75	0,51	0,31
Циннаризин	2,07	2,15	-	-	3,16	3,20	2,11	2,38
Прокаин	1,00	1,00	2,18	2,04	-	-	1,07	0,94
Лидокаин	2,09	2,10	2,27	2,36	3,10	2,83	2,02	2,23
Изоптин	1,25	1,42	2,18	2,17	1,37	1,71	1,82	2,15
Папаверин	1,47	1,52	2,00	2,00	3,00	3,00	2,00	2,00
Курантил	1,00	1,42	1,53	1,30	3,17	3,31	1,32	1,13
Изониазид	-	-	1,00	1,00	1,98	2,18	0,54	0,34
Амитриптилин	0,68	0,50	2,18	2,04	0,87	0,97	1,22	0,97
Атропин	0,11	0,04	-	-	0,32	0,23	0,21	0,10
Димедрол	0,63	0,50	1,96	1,98	0,82	1,05	1,00	1,00
Тразикор	0,40	0,44	-	-	0,86	0,71	0,50	0,34
Галоперидол	1,04	1,11	2,07	2,17	2,00	2,00	0,93	0,82
Кодеин	0,25	0,10	-	-	0,67	0,75	0,66	0,55
Дипразин	0,60	0,57	-	-	0,94	1,13	1,29	1,07
Седуксен	2,00	2,00	-	-	3,09	3,31	2,02	2,23
Хинин	0,26	0,14	-	-	1,00	1,00	0,53	0,34

Полученные значения лежат в пределах разброса относительно идеальной кривой, соответствующей идентичности экспериментальных результатов и величин

относительной миграции, рассчитанных по справочным данным, что подтверждается величиной t-критерия (P = 0,95)

ВЭЖХ определение производных фенотиазина в биологических объектах

Для подтверждения результатов скрининга и количественного определения производных фенотиазина использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Установлено, что все соединения, за исключением нонахлазина, имеют три максимума поглощения в диапазонах 200–210 нм и 250–260 нм, поэтому в качестве рабочих волн детектирования выбрали 254 и 210 (для нонахлазина) нм

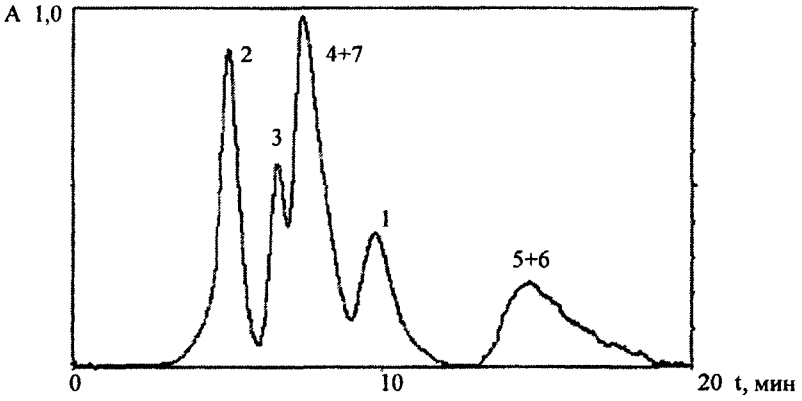
Методику количественного определения фенотиазинов разрабатывали в обращенно-фазовом режиме хроматографии на колонках с различной эффективностью Варьировали состав и концентрацию подвижной фазы

Наиболее положительные результаты получили при использовании колонки Нуклеосил-C_{18} и элюента, составленного из фосфатного буфера с концентрацией 50 мМ в смеси с ацетонитрилом в соотношении 60·40, а также на колонке Диасорб-130C_{16}Т с тем же буфером в соотношении с ацетонитрилом 45·55 Вид хроматограмм, полученных в этих условиях, представлен на рисунках 5 и 6.

Найденные оптимальные режимы были проверены на возможность применения для анализа реального биологического объекта. Установили, что из матрицы пробы получается два хроматографических пика с низкими временами удерживания и наиболее близкий к ним перициазин выходит отдельно от пиков матрицы пробы и может быть обработан

В работе для количественной оценки результатов анализа мы применяли метод абсолютной градуировки Для построения калибровочной зависимости использовали растворы исследуемых веществ в диапазоне концентраций от 5 до 200 мкг/мл. Более высокие концентрации не использовали из-за возможной перегрузки колонки и исходя из реальных концентраций в анализируемых объектах

Графический вид полученных зависимостей представлен на рисунке 7

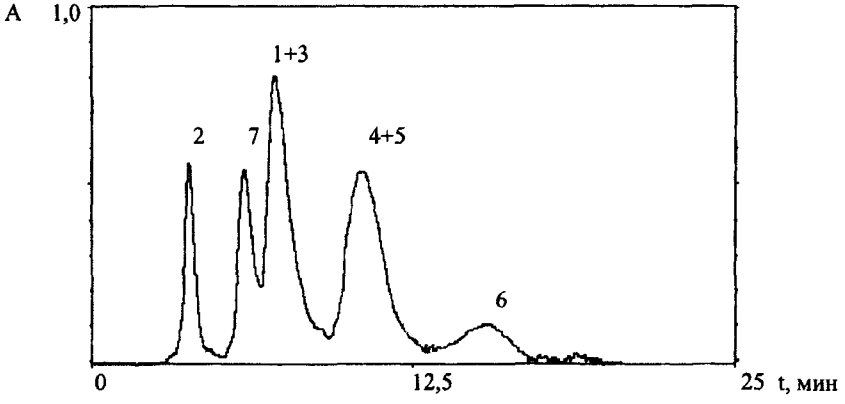


1 – аминазин, 2 – перициазин, 3 – этаперазин, 4 – нонахлазин,

5 – сонапакс, 6 – трифтазин, 7 – тизерцин

Рисунок 5 – Хроматограмма модельной смеси фенотиазинов

при соотношении буфер-ацетонитрил 60:40

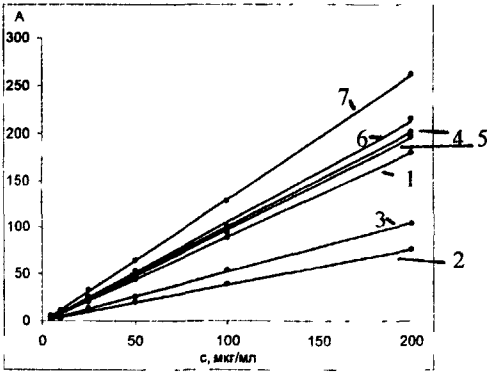


1 – аминазин, 2 – перициазин, 3 – этаперазин, 4 – нонахлазин,

5 – сонапакс, 6 – трифтазин, 7 – тизерцин

Рисунок 6 – Хроматограмма модельной смеси фенотиазинов

при соотношении буфер-ацетонитрил 45:55



1 – аминазин, 2 – перициазин, 3 – этаперазин, 4 – нонахлазин,
5 – сонапакс, 6 – трифтазин, 7 – тизерцин

Рисунок 7 – Зависимость аналитического сигнала
от концентрации фенотиазинов

Для оценки эффективности методики определили степень извлечения определяемых компонентов из матрицы пробы методом ВЭЖХ в подобранных условиях анализа Полученные результаты представлены в таблице 7

Таблица 7 – Степень извлечения фенотиазинов из матрицы пробы

Название	Степень извлечения, φ, %
Аминазин	82±5
Перициазин	77±5
Этаперазин	75±5
Нонахлазин	78±5
Сонапакс	81±5
Трифтазин	75±5
Тизерцин	84±5

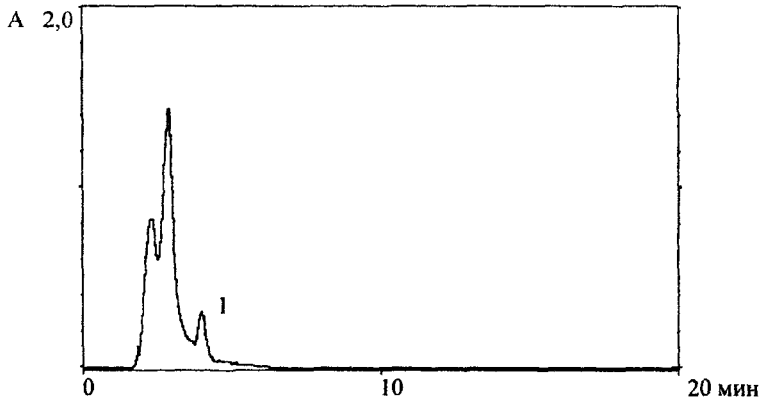
В случае проведения направленного анализа на наличие в образце конкретного вещества схему анализа можно представить в виде последовательности образец – пробоподготовка – скрининг – подтверждение – результат

Все виды задач можно разделить на три группы: 1 – когда нужно определить конкретно оговоренное соединение; 2 – когда нужно определить соединение из какого-либо списка; 3 – когда об определяемом соединении ничего неизвестно. Для каждой такой задачи нужна своя методика анализа

По вышеизложенной схеме нами проводился систематический анализ реального биологического образца на наличие в нем фенотиазинов. Для пробоподготовки образца применили метод ТФЭ, скрининг образца проводили с использованием метода ТСХ, а подтверждающий анализ – ОФ ВЭЖХ с УФ-детектированием. Для скрининга применили систему ацетон-25% аммиак (100 1), а подтверждение провели на колонке Диасорб-130C_{16}Т с элюентом фосфатный буфер (50мМ) – ацетонитрил (45:55) ТС-хроматограмма показана на рисунке 8.

В пробе обнаружено вещество со значением $R_f = 0,65$, которое по положению на пластинке соответствует таким соединениям как аминазин ($R_f = 0,67$) и перициазин ($R_f = 0,64$). ВЭЖХ-хроматограмма анализируемого образца представлена на рисунке 9, которая показала на наличие 0,80±0,12 мкг/мл перициазина.

Рисунок 8 – ТС-хроматограмма экстракта биологического объекта



1 – перициазин

Рисунок 9 – Хроматограмма экстракта биологического объекта

Предложенная схема аналитического контроля является возможным вариантом реализации схемы ненаправленного систематического анализа.

ВЫВОДЫ

1. Разработана аналитическая схема систематического анализа биологических объектов для определения производных фенотиазина, включающая ТФЭ, ТСХ-скрининг и подтверждение результатов скрининга методом ВЭЖХ, обеспечивающая определение с относительной погрешностью 15% и чувствительностью 1–10 мкг/мл для разных веществ соответственно.
2. Реализован новый метод количественной тонкослойной хроматографии для определения производных фенотиазина в биологических объектах на основе компьютеризированной обработки сканированных изображений хроматографических пластин. Установлен диапазон линейности для производных фенотиазина с нижним пределом 0,1–1,0 мкг и верхним пределом 5 мкг.
3. Изучены закономерности удерживания производных фенотиазина на силикагеле и построено параметрическое уравнение зависимости R_f в тонкослойной хроматографии от физико-химических свойств элюента, позволяющее теоретически

оптимизировать его состав в системе бензол-метанол Установлено, что основными параметрами, влияющими на величину R_f, являются диэлектрическая проницаемость, коэффициент преломления, кислотность, основность и полярность элюента.

4 Проведены исследования сорбционных свойств сверхсшитого полистирола по отношению к производным фенотиазина, определена удельная динамическая емкость и десорбирующие объемы различных органических растворителей, показана возможность использования сверхсшитого полистирола для экстракции фенотиазинов из биологических проб с эффективностью 75–85%.

5. Оптимизированы условия ТСХ-скрининга и ВЭЖХ определения фенотиазинов в биологических объектах. Минимизирован объем ТФЭ извлечения. Подобраны 10 ТСХ систем элюирования, обеспечивающих разделение и определение производных фенотиазина, а также условия ВЭЖХ анализа на колонке Нуклеосил-C_{18} с элюентом буфер-ацетонитрил (60:40) и на колонке Диасорб-130C_{16}Т с элюентом (45:55).

Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях

1. Клищенко Р.А., Удалов А.В., Киселева Н.В. Автоматизированная система скрининга токсикантов в биологических продуктах / Материалы Международной конференции «Новые технологии и приложения современных физико-химических методов для изучения окружающей среды», Ростов-на-Дону, 25-28 сентября, 2001, с. 35.

2. Р.А. Клищенко, Н.В. Киселева, А.В. Удалов, З.А. Темердашев Идентификация компонентов по данным ТСХ-анализа с использованием параметров относительного удерживания / Материалы Всероссийского симпозиума «Современные проблемы хроматографии», Москва, 18–22 марта, 2002, с. 122.

3. З.А. Темердашев, Н.В. Киселева, А.В. Удалов, Р.А. Клищенко Методика ТСХ-скрининга биообъектов на основе величин относительной миграции компонентов / Материалы Международного симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической химии», Краснодар, 6–11 октября, 2002, с. 114.

4. З.А. Темердашев, Н.В. Киселева, А.В. Удалов, Р.А. Клищенко Методика ТСХ-скрининга биообъектов на основе величин относительной миграции компонентов / Журнал аналитической химии, 2003, т. 58, №7, с. 722–723.

5 Р А Клищенко, Н В. Киселева, З А Темердашев, А В. Удалов Некоторые закономерности удерживания производных фенотиазина на силикагеле в тонкослойной хроматографии / Материалы Всероссийского симпозиума «Хроматография и хроматографические приборы», Москва, 15–19 марта, 2004, с 259

6. Н.В. Кисслева, А.В. Удалов, З А Темердашев, Р.А Клищенко ТСХ-скрининг сильнодействующих лекарственных препаратов в биологических объектах / Экологический вестник научных центров ЧЭС, 2004, №2, с. 25–30.

7. Н.В. Киселева, А.В. Удалов, З А. Темердашев, Р А Клищенко Изучение возможности количественного определения аминазина методом ТСХ / Материалы Всероссийской конференции «Аналитика России», Москва, 27 сентября – 1 октября, 2004, с. 190.

8. Р.А. Клищенко, Н.В. Киселева, З.А Темердашев, А.В. Удалов Хроматографическая идентификация производных фенотиазина при анализе биологических жидкостей / Материалы III Международной конференции «Новые технологии и приложения современных физико-химических методов для изучения окружающей среды», Ростов-на-Дону, 21–25 марта, 2005, с. 215.

9. З.А Темердашев, Н.В. Киселева, Р А. Клищенко, А.В. Удалов Разделение и концентрирование производных фенотиазина / Материалы II Международного симпозиума «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии», Краснодар, 25–30 сентября, 2005, с. 270.

10 Н В Киселева, З.А Темердашев, Р.А. Клищенко Особенности ТСХ-скрининга производных фенотиазина / Известия вузов. Северо-Кавказский регион Естественные науки, 2005, №3, с. 59–61.

11. Н В Киселева, А.В Удалов, З А Темердашев, Р А Клищенко Разделение и идентификация соединений ряда фенотиазина методом тонкослойной хроматографии / Журнал аналитической химии, 2006, т 61, №1, с. 6–9

Кубанский государственный университет
350040 г. Краснодар, ул. Ставропольская № 149.
Типография КубГУ
350023 г. Краснодар ул. Октябрьская № 25
Заказ № 187 Тираж 100

РНБ Русский фонд

2007-4

6576

29 МАЯ 2005