

УДК 615.074:543.544

**ТСХ-СКРИНИНГ СИЛЬНОДЕЙСТВУЮЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
ПРЕПАРАТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ¹*****З. А. Темердашев², Н. В. Киселёва³, Р. А. Клищенко⁴ А. В. Удалов⁵*****TLC SCREENING OF STRONG DRUGS IN BIOLOGICAL OBJECTS****Temerdashev Z. A., Kiseleva N. V., Klischenko R. A., Udalov A. V.**

The methodology of TLC screening of organic compounds on the basis of relative retention parameters has been offered. The possibility of application of standard substances in drugs has been found effective for determining relative R_f values. Chromatographic behaviour of several organic foundations in 5 systems of elution on the silica gel has been studied. Experimental and handbook values have been found to be in good agreement. The methods for preliminary identification of strong drugs in biological objects have been developed.

Предложен новый методический подход для ТСХ-скрининга сильнодействующих лекарственных препаратов в биологических объектах, основанный на использовании величин относительной миграции веществ.

В судебно-медицинской экспертизе отравлений, клинической токсикологии и диагностике наркотического опьянения важной задачей является идентификация наркотических и сильнодействующих лекарственных препаратов.

Скрининг, проводимый на первом этапе идентификации, позволяет исключить из последующего рассмотрения пробы, не содержащие искомых веществ, и сделать предварительные выводы об их природе в так называемых положительных пробах.

Для скрининга обычно используются иммуно-ферментные и хроматографические методы [1]. По сочетанию производительности, экспрессности и стоимости анализа наиболее эффективен метод тонкослойной хроматографии.

Использование величины R_f для идентификации и сопоставления результатов ис-

следований, полученных в разных лабораториях, затруднено невоспроизводимостью свойств хроматографических пластинок разных производителей и даже разных партий. Улучшить этот показатель можно на основе корреляционных зависимостей между параметрами удерживания, полученными по справочным и экспериментальным данным. Другой подход, предложенный профессором Карташовым [2], основан на использовании величин относительной миграции, полученных по стандартным веществам. Однако в литературе приводятся данные только для одной хроматографической системы, причем с фиксированными стандартными веществами.

Цель нашей работы — разработать методику обработки результатов ТСХ-скрининга лекарственных и наркотических веществ, провести статистическую оценку возможности использования литературных данных и подобрать оптимальные пары скрининговых и подтверждающих хроматографических систем.

Как уже указывалось, автором работы [2] предложено использовать не абсолютные зна-

¹Работа выполнена при поддержке РФФИ р2003юг (03-03-96542).

²Темердашев Зауаль Ахлоевич, д-р хим. наук, профессор, заведующий кафедрой аналитической химии Кубанского государственного университета.

³Киселева Наталья Владимировна, канд. хим. наук, доцент кафедры аналитической химии Кубанского государственного университета.

⁴Клищенко Роман Александрович, аспирант Кубанского государственного университета.

⁵Удалов Андрей Вениаминович, канд. хим. наук, инженер химико-токсикологической лаборатории Краснодарского краевого наркологического диспансера.

чения удерживания, а их относительные величины по отношению к пяти веществам, выбранным им в качестве стандартных: кодеин, дикаин, новокаин, амидопирин и седуксен. Стандартные вещества выбраны для пластинок на основе силикагеля и ацетона в качестве элюента. При этом все вещества разделены на 6 хроматографических групп. Вещества, попадающие в зону между линией старта и линией миграции кодеина, отнесены к I хроматографической группе; в зону между линией миграции кодеина и дикаина — ко II группе; в зону между дикаином и новокаином — к III группе; в зону между новокаином и амидопирином — к IV группе; в зону между амидопирином и седуксеном — к V группе; в зону между линией миграции седуксена и линией фронта растворителя — к VI хроматографической группе. Для данной системы наработан банк данных, включающий 83 соединения, которые являются органическими азотсодержащими основаниями. С целью дифференциации веществ внутри групп рассчитывались величины их миграции относительно стандартных веществ по формуле

$$M_{\text{отн}} = \frac{R_{\text{ф в-ва}} - R_{\text{ф н.ст}}}{R_{\text{ф в.ст}} - R_{\text{ф н.ст}}},$$

где $M_{\text{отн}}$ — относительная миграция вещества; $R_{\text{ф в-ва}}$, $R_{\text{ф н.ст}}$, $R_{\text{ф в.ст}}$ — $R_{\text{ф}}$ вещества, $R_{\text{ф}}$ нижнего и верхнего стандартов соответственно.

Нами предложено использовать произвольное количество стандартных веществ, причём величины миграции рассчитываются по формуле

$$M_{\text{отн}} = M_{\text{отн.н.ст}} + \frac{R_{\text{ф в-ва}} - R_{\text{ф н.ст}}}{R_{\text{ф в.ст}} - R_{\text{ф н.ст}}},$$

где $M_{\text{отн.н.ст}}$ — относительная миграция нижнего стандарта.

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

1. Экспериментальная часть

Экспериментальные исследования проводили методом ТСХ на пластинах Сорбфил (силикагель СТХ-1А, зернение 5–17 мкм, толщина слоя 110 мкм, связующее — силиказоль,

тип подложки ПЭТФ и алюминий, размеры пластин 100×100 мм). В работе изучено поведение 25 азотсодержащих органических веществ [4,5] в пяти хроматографических системах.

Растворы исследуемых веществ с концентрацией 0,5–50 мкг/мл готовили из лекарственных форм (таблетки и ампулы). Таблетки измельчали до тонкого порошка, исследуемые компоненты экстрагировали хлороформом три раза по 1 мл, объединённый экстракт упаривали досуха и осадок растворяли в 10 мл этанола. Содержимое ампул также экстрагировали хлороформом, упаривали досуха, и растворяли в этаноле. В этанольный раствор добавляли аммиак до pH = 10–11, чтобы удалить возможное присутствие солевых форм соединений и перевести их в основное состояние.

Для повышения точности анализов и эффективности пластин проводили их очистку в хроматографической камере, заполненной ацетоном на 8–10 мм, до тех пор, пока фронт не достигал верхнего края пластины. После испарения растворителя верхний край срезался на 10 мм. Пластины активировали в термощкафу при температуре $80 \pm 5^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. Активацию проводили непосредственно перед использованием пластин. Хроматографирование выполняли в направлении, перпендикулярном рискам-царапинам на обратной стороне подложки. В случае необходимости нанесения больших объёмов растворов на пластины использовали дробное нанесение. Размер пятен составлял не более 5 мм в диаметре. Для ускорения процесса нанесения проб на пластины применяли нагревательное устройство.

В хроматографическую камеру (длина, ширина и высота — соответственно 165–55–125 мм), снабжённую подставкой для пластин, помещали элюент, выдерживали 30 мин., опускали в нее пластину и хроматографировали в течение 30–40 мин. Эксперимент с каждым веществом повторяли по 3 раза.

В качестве проявителя использовали реактив Драгендорфа. Для повышения чувствительности проявления дополнительно применяли 20% раствор H_2SO_4 и 5–10% раствор FeCl_3 .

На проявленных пластинах отмечали пятна, соответствующие индивидуальным компонентам, центром пятна считали наиболее ин-

Т а б л и ц а 1

Значения hR_f исследуемых веществ

Название препарата	hR_f							
	Ацетон 0,1М КОН (1)		EtAc – MeOH – NH ₃ (25%) (2)		Метанол (3)		Хлороформ – метанол (9:1) (4)	
	Эксп.	Табл.	Эксп.	Табл.	Эксп.	Табл.	Эксп.	Табл.
Церукал	33±3	13	62±4	51	23±2	18	16±2	7
Обзидан	26±4	7	65±5	52	36±3	20	22±1	10
Метиндол	86±1	—	—	—	62±2	—	—	—
Ранитидин	—	—	34±4	—	33±5	—	17±3	—
Циннаризин	86±2	65	—	—	70±2	79	81±5	78
Прокаин	64±4	30	87±3	70	—	—	47±4	31
Лидокаин	86±2	63	89±3	80	68±1	70	79±1	73
Изоптин	70±2	42	87±3	74	47±2	44	72±4	70
Папаверин	74±1	45	85±2	69	65±2	74	79±1	65
Курантил	65±2	42	65±1	41	71±1	82	55±2	37
Кокаин	86±4	54	89±3	77	39±2	—	68±2	47
Изониазид	—	20	36±5	29	57±2	55	24±2	11
Амитриптилин	44±4	15	87±4	70	35±1	26	52±1	32
Атропин	7±1	1	—	—	13±1	—	9±1	3
Димедрол	40±5	15	83±6	68	33±2	28	44±2	33
Тразикор	26±2	13	—	—	35±3	19	22±1	11
Галоперидол	66±6	33	86±4	74	57±1	51	41±2	27
Кодеин	16±2	3	—	—	27±1	20	29±2	18
Дипразин	39±3	17	—	—	38±2	30	46±4	35
Амидопирин	71±3	—	—	—	62±3	71	68±5	—
Седуксен	85±3	59	—	—	68±2	82	79±5	73
Кофеин	—	25	—	—	—	—	66±1	58
Хинин	17±1	4	—	—	41±1	27	23±3	11
Феназепам	81±2	—	—	—	64±2	—	64±8	—
Дибазол	81±2	—	—	—	68±2	—	71±1	—

тенсивную его область, по которой оценивали значения подвижностей.

2. Результаты и их обсуждение

С целью расширения возможностей идентификации по данным ТСХ на основе относительных величин удерживания для исследований использовали 5 хроматографических систем, из них первые 4 из числа 10 стандартных, применяемых в химико-токсикологическом анализе с различными элюентами: ацетон, этилацетат-метанол-25% аммиак (17:2:1), метанол, хлороформ-метанол (9:1). При использовании в качестве по-

движной фазы ацетона и смеси хлороформ-метанол (9:1) пластины обрабатывали 0,1М раствором КОН. Для хроматографических систем значения hR_f веществ, полученные в эксперименте (табл. 1), отличались от справочных. Несоответствие экспериментальных данных справочным величинам по R_f обусловлено рядом факторов, которые были различны при проведении исследований в данной работе и исследований, результаты которых приведены в справочнике. Однако между этими данными (экспериментальными и справочными) наблюдается корреляция. Коэффициенты корреляции соответственно равны: 0,955; 0,962; 0,974; 0,971.

Т а б л и ц а 2

Значения относительной миграции

Наименование вещества	M _{отн}							
	АцетонМКОН		EtAc – MeOH – NH ₃		Метанол		Хлороформметанол	
	Эксп.	Табл.	Эксп.	Табл.	Эксп.	Табл.	Эксп.	Табл.
Церукал	51±5	44	153±9	155	58±5	67	37±5	22
Обзидан	41±7	24	161±11	158	89±8	75	51±3	31
Метиндол	207±7	—	—	—	—	—	—	—
Ранитидин	—	—	—	—	—	—	—	—
Циннаризин	207±14	215	—	—	316±6	320	211±24	238
Прокаин	100±7	100	218±20	204	—	—	107±12	94
Лидокаин	209±14	210	227±20	236	310±3	283	202±5	223
Изоптин	125±10	142	218±20	217	137±13	171	182±12	215
Папаверин	147±5	152	200±5	200	300±25	300	200±3	200
Курантил	100±4	142	153±3	130	317±3	331	132±6	113
Кокаин	205±27	183	227±20	226	—	—	170±6	144
Изониазид	—	—	100±14	100	198±13	218	54±5	34
Амитриптилин	68±7	50	218±27	204	87±3	97	122±3	97
Атропин	11±2	4	—	—	32±3	23	21±3	10
Димедрол	63±8	50	196±13	198	82±5	105	100±5	100
Тразикор	40±4	44	—	—	86±8	71	50±3	34
Галоперидол	104±30	111	207±27	217	200±7	200	93±5	82
Кодеин	25±4	10	—	—	67±3	75	66±5	55
Дипразин	60±5	57	—	—	94±5	113	129±12	107
Амидопирин	—	—	—	—	263±38	287	—	—
Седуксен	200±15	200	—	—	309±6	331	202±24	223
Кофеин	—	—	—	—	—	—	164±3	179
Хинин	26±2	14	—	—	100±8	100	53±7	34
Феназепам	180±10	—	—	—	288±25	—	158±24	—
Дибазол	179±10	—	—	—	309±6	—	178±3	—

Т а б л и ц а 3

Значения hR_f для систем ацетон/силикагель(5) и ацетон/силикагель(0,1М КОН) (1)

Название	hR _f (5)	hR _f (1)	Название	hR _f (5)	hR _f (1)
Церукал	12	33	Амитриптилин	30	44
Обзидан	13	26	Атропин	3	7
Ранитидин	8	16	Димедрол	21	40
Прокаин	37	63	Тразикор	16	26
Лидокаин	77	86	Галоперидол	57	66
Изоптин	46	70	Кодеин	10	16
Папаверин	73	74	Дипразин	23	37
Курантил	71	65	Амидопирин	64	69
Кокаин	67	86	Седуксен	80	82
Изониазид	39	31	Хинин	20	17

По методике расчёта, описанной ранее, были получены величины относительной миграции исследуемых веществ во всех хроматографических системах. Полученные результаты представлены в табл. 2. 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, в системе 4 — димедрол и папаверин.

Значения коэффициентов корреляции относительных экспериментальных и справочных величин удерживания составляют соответственно 0,980; 0,966; 0,978 и 0,979, что несколько выше, чем для абсолютных значений миграции. Кроме того, 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 ($P = 0,95$).

Для систем ацетон/силикагель (0,1М КОН) и ацетон/силикагель значения hR_f некоторых исследуемых веществ представлены в табл. 3.

В работе использовались пластины на основе силикагеля. По данным [4] можно привести некоторые полуколичественные оценки способности силикагеля к образованию различных типов связей.

Содержание воды существенно влияет на дисперсионные и координационные силы взаимодействия. С повышением содержания воды сила дисперсионных взаимодействий повышается, а координационных — уменьшается. На ионные силы взаимодействия содержание воды практически не влияет. Силикагель проявляет способность к образованию водородной связи. При этом он может выступать и как акцептор, и как донор, но способность отдавать протон несколько выше, чем способность принимать. С повышением содержания воды его акцепторные и донорные способности увеличиваются.

Независимо от содержания воды для силикагеля характерно явно выраженное диполь-дипольное взаимодействие с сорбентом. Способность к образованию хелатов очень мала и с повышением содержания воды практически исчезает.

Для подавляющего большинства исследуемых соединений свойственно наличие функциональной группы, содержащей третичный ($-NR_2$) или вторичный атом азота. Эту функ-

циональную группу отличает высокая способность к образованию водородной связи и сильно выраженные акцепторные свойства. Для этой функциональной группы характерно диполь-дипольное взаимодействие, а также высокая способность к дисперсионным и особенно координационным и ионным типам взаимодействия.

На основании сказанного можно сделать вывод, что взаимодействие с сорбентом и, следовательно, удерживание в изученной хроматографической системе осуществляется за счёт образования водородных связей между силикагелем и группой $-NR_2$, диполь-дипольного взаимодействия, а также за счёт сил дисперсионных, координационных и ионных взаимодействий, из которых, в зависимости от содержания воды в силикагеле, преобладают либо координационные (для низкого содержания воды), либо дисперсионные (для высокого содержания воды), а силы ионного взаимодействия малохарактерны.

В случае, когда в качестве растворителя используется ацетон, наблюдается следующая ситуация. Ацетон проявляет склонность к образованию водородной связи, выступая как акцептор, но эта характеристика менее выражена, чем у функциональной группы $-NR_2$. Донорная способность ацетона выражена слабо. Реализация диполь-дипольных взаимодействий для ацетона и функциональной группы $-NR_2$ протекает одинаково. Кроме того, ацетон проявляет способность к дисперсионным и координационным типам взаимодействия, а ионные для него не характерны.

При использовании ацетона в качестве элюента $-NR_2$ группой в некоторой степени осуществляется за счёт незначительного преобладания способности рассмотренных соединений образовывать водородные связи, выступая в качестве акцептора, проявления сил дисперсионных и координационных взаимодействий и значительного превышения сил ионного взаимодействия, по сравнению с ацетоном, которое малохарактерно для силикагеля, в результате чего этот тип взаимодействия будет слабо выражен.

В случае, когда пластина обработана раствором КОН, в силанольных группах атом водорода замещается на атом калия, поэтому способность к образованию водородной связи утрачивается. В результате удерживание веществ сорбентом уменьшается и значение R_f увеличивается.

Как видно из табл. 3, не во всех случаях на обработанных пластинах величина удерживания больше, чем на необработанных пластинах, например, с курантилом, изониазидом и хинином.

Это показывает, что применение одной функциональной группы для определения влияния на процесс адсорбции явно недостаточно. Необходимо рассматривать влияние и других функциональных групп, а также стерический фактор и эффект сопряжения. Например, курантил и хинин содержат полярную —ОН группу, которая имеет несколько иную селективность, что обуславливает более значительное отклонение значений R_f этих соединений от идеальной кривой, зависимости $R_{f\text{спр}}$ от $R_{f\text{эксп}}$.

Таким образом, использование величин относительной миграции веществ на основе модифицированного подхода Карташова для большинства рассмотренных соединений снижает разброс данных и может повысить воспроизводимость результатов, полученных на разных пластинах без построения корреляционных зависимостей справочных и экспе-

риментальных величин R_f , что существенно упрощает процедуру идентификации и позволяет напрямую сравнивать разные экспериментальные данные.

Литература

1. Еремин С. К., Изотов Б. Н., Веселовская Н. В. Анализ наркотических средств. М: Мысль. 1993. 272 с.
2. Карташов В. А., Овсянникова В. М., Кудрикова Л. Е. Вариант ТСХ-скрининга ядовитых и сильнодействующих азотсодержащих органических оснований // Судебно-медицинская экспертиза. 1982. № 3. С. 39–41.
3. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. М.: Мир. 1980. Т. 1. С. 28–31.
4. Машковский М. Д. Лекарственные средства: Пособие по фармакотерапии для врачей. 10-е изд., перераб. и доп. Минск: Беларусь, 1987. Т. 1. 543 с. Т. 2. 528 с.
5. Машковский М. Д. Лекарственные средства: Пособие по фармакотерапии для врачей. 10-е изд., перераб. и доп. Минск: Беларусь, 1987. Т. 2. 528 с.

Статья поступила 6 октября 2003 г.

Кубанский государственный университет

Краснодарский краевой наркологический диспансер

© Темердашев З. А., Киселёва Н. В., Клищенко Р. А., Удалов А. В., 2004