

УДК 615.451.16.214.2:543.421/.424

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ УФ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ МЕТАПРОТА ИЗ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ

Т.Х. Вергейчик, В.А. Линникова, Г.Б. Гуськова

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ
Минздрава России, г. Пятигорск

E-mail: toxic-pgfa@yandex.ru

Изучены условия экстракции метапрота из водных растворов при значениях pH 1 – 12,45. Установлено, что метапрот максимально экстрагируется хлороформом при pH 6,86 – 9,19, смесью хлороформ – ацетон 9:1 при pH 4,01 – 12,45. Определена возможность использования УФ спектрофотометрии для обнаружения и определения метапрота в извлечениях. Полученные результаты рекомендованы для использования при разработке метода изолирования метапрота из биологических жидкостей и его обнаружения и определения с помощью УФ спектрофотометрии для целей химико-токсикологического анализа.

Ключевые слова: метапрот, экстракция, УФ спектрофотометрия.

UV SPECTROPHOTOMETRY APPLICATION FOR IDENTIFICATION OF CONDITIONS FOR METAPROTE EXTRACTION FROM WATER SOLUTIONS

T.H. Vergeychik, V.A. Linnikova, G.B. Guskova

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a branch of Volgograd State Medical University

E-mail: toxic-pgfa@yandex.ru

We have studied conditions for metaprote extraction from water solutions with pH indices 1 – 12.45. We have also established that metaprote is maximally extracted with chloroform with pH index 6.86 – 9.19, with chloroform-acetone mixture 9:1 with pH index 4.01 – 12.45. We have determined the probability of UV spectrophotometry application for detection and identification of metaprote in extracts. The results received are recommended for use in development of method of metaprote isolation from biological liquids and its detection and identification with UV spectrophotometry for chemical and toxicological analysis.

Keywords: metaprote, extraction, UV spectrophotometry.

Первоначально метапрот как адаптоген использовался для целей военной медицины. Он выпускался как средство, способное усилить боеспособность воинов, повысить защитные свойства их организма, особенно в неблагоприятных климатических условиях (пустыни, высокогорье и др.). С 1990-х годов этот препарат стали выпускать для населения как средство, повышающее работоспособность, устойчивость организма к физической нагрузке, стрессу, гипоксии, гипертонии, а также для усиления действия депрессивных средств и др. [8, 10, 11]. Метапрот рекомендован к использованию при некоторых экстремальных воздействиях, в частности, при отравлении карбофосом, дихлорэтаном, этиленгликолем с целью восстановления физической работоспособности и нормализации биохимических показателей [2, 3, 4, 6].

Метапрот выпускается в капсулах по 50, 125 и 250 мг. Препарат медленно всасывается из желудочно-кишечного тракта. Он способен кумулироваться в организме, что при длительном или даже курсовом приеме приводит к появлению ряда нежелательных побочных эффектов. Среди них отмечены неприятные ощущения в животе, в области печени, головная боль, проявление аллергии в виде покраснения кожи лица, насморка [12].

Фармакокинетика препарата характеризуется интенсивным распределением его из крови в органы и ткани и способностью накапливаться в них [5, 9]. Это вызывает необходимость контроля метапрота в организме путем анализа биологических жидкостей (крови, мочи, слюны) в процессе приема препарата и в случае токсического действия.

Для изолирования лекарственных веществ из жидких объектов чаще всего в анализе рекомендуется использовать метод жидкость-жидкостной экстракции [1]. Для его использования необходимо знать условия экстракции изучаемого препарата из водных растворов. Чтобы оценить основные факторы, влияющие на процесс изолирования метапрота, нами применен метод УФ спектрофотометрии.

Вначале был изучен характер УФ спектра поглощения метапрота в различных растворителях с целью определения степени поглощения при разных значениях pH. Препарат растворяли в воде очищенной, спирте этиловом, 0,1 М растворе кислоты хлороводородной и 0,1 М растворе натрия гидроксида. Во всех растворах концентрация метапрота составляла 0,01 мг/мл. Затем снимали спектр поглощения каждого раствора, используя спектрофотометр СФ-56. Анализ проводили в трех повторностях. По средним значениям оптической плотности при каждой длине волны строили график зависимости величины оптической плотности от длины волны (рисунок 1).

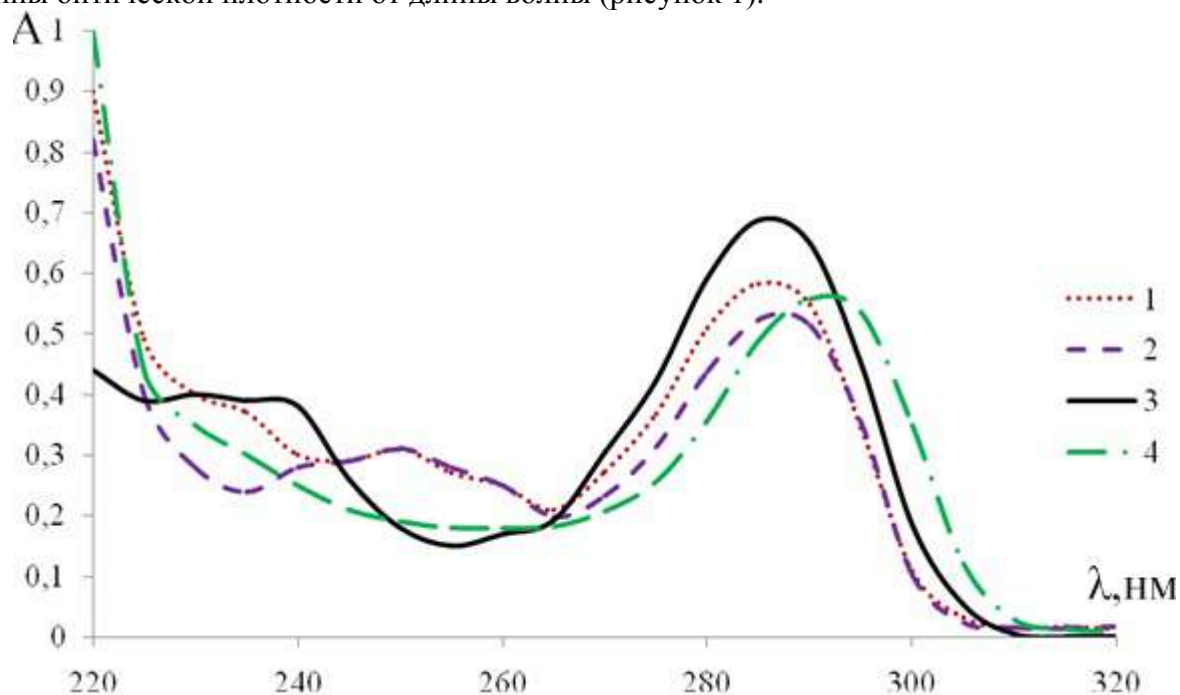


Рисунок 1 – Спектры поглощения растворов метапрота с концентрацией 0,01 мг/мл: 1 – в воде; 2 – в этиловом спирте; 3 – в 0,1 М растворе кислоты хлороводородной; 4 – в 0,1 М растворе натрия гидроксида

Как следует из полученных данных, наибольшую интенсивность метапрот обнаруживает в 0,1 М растворе кислоты хлороводородной. Максимумы светопоглощения метапрота в воде, спирте и 0,1 М растворе кислоты хлороводородной находятся при длине волны 285 нм, в 0,1 М растворе натрия гидроксида – при 290 нм. В дальнейшем обнаружение и определение метапрота проводили в 0,1 М растворе кислоты хлороводородной.

Для изучения условий экстракции метапрота из водных растворов готовили буферные растворы с рН 1; 1,68; 3,56; 4,01; 6,86; 9,18 и 12,45. К 9 мл полученных растворов добавляли по 1 мг метапрота и экстрагировали в соотношении 1:1 однократно органическим растворителем (хлороформом) или смесью растворителей (хлороформ – ацетон 9:1). Для ряда препаратов рекомендуется использовать для экстракции смеси, а не отдельные растворители, что позволяет увеличить их переход в органическую фазу [7]. При каждом значении рН готовили по 6 опытов, содержащих метапрот и по 3 опыта, в которые препарат не добавляли. Полученные экстракты испаряли при комнатной температуре в темноте до сухих остатков, которые растворяли в 0,1 М растворе кислоты хлороводородной и объем доводили до 100 мл. Количество экстрагированного метапрота (в %) рассчитывали по формуле, используя величину светопоглощения при длине волны 285 нм:

$$C_{\%} = \frac{A_{\text{исп.}} \cdot C_{\text{ст.}} \cdot 100}{A_{\text{ст.}} \cdot a} \quad (1),$$

где $A_{\text{исп.}}$ – светопоглощение исследуемого раствора;

$C_{\text{ст.}}$ – концентрация метапрота в стандартном растворе, равная 0,01 мг/мл;

$A_{\text{ст.}}$ – светопоглощение стандартного раствора метапрота;

a – количество метапрота, добавленное в буферную смесь, мг.

Для определения правильности методики готовили 9 растворов стандартного образца метапрота на трех уровнях концентраций в трех повторностях. В каждом растворе определяли содержание метапрота с помощью УФ спектрофотометрии при длине волны 285 нм. Полученные данные приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты, полученные при установлении правильности методики количественного определения метапрота с помощью УФ спектрофотометрии

Уровень	Взято метапрота, мкг/мл	Найдено метапрота мкг/мл	Найдено метапрота, %	Метрологические характеристики
1	5	4,9511	99,02	$\bar{X} = 99,78\%$ $SD = 0,52$ $RSD = 0,52\%$
1	5	4,9492	98,98	
1	5	4,9805	99,61	
2	10	9,9983	99,98	
2	10	9,9919	99,92	
2	10	9,9914	99,91	
3	15	15,0114	100,08	
3	15	15,0910	100,61	
3	15	14,9921	99,95	

Для определения воспроизводимости методики готовили растворы стандартного образца метапрота в шести повторностях и в каждом растворе определяли концентрацию препарата. Полученные данные приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты, полученные при определении воспроизводимости методики количественного определения метапрота с помощью УФ спектрофотометрии

№ п/п	Взято метапрота, мкг/мл	Найдено метапрота, мкг/мл	Найдено метапрота, %	Метрологические характеристики
1	10	9,8590	98,59	$\bar{X} = 99,83\%$ $SD = 0,88$ $RSD = 0,88\%$
2	10	9,9861	99,86	
3	10	9,9901	99,90	
4	10	10,1010	100,01	
5	10	10,0490	100,49	
6	10	9,9130	99,13	

Рассчитанный коэффициент Стьюдента при Р = 95% не превышал табличного значения, следовательно, вклад систематической ошибки в результаты количественного определения незначителен.

Полученные данные позволяют рекомендовать метод УФ спектрофотометрии для обнаружения и определения метапрота в растворах и в последующем в биологических жидкостях.

Степень экстракции метапрота из водных растворов по описанной ранее методике и при использовании УФ спектрофотометрии представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Степень экстракции метапрота из водных растворов

Экстрагент: хлороформ		
1	2	3
рН	% экстракции	Метрологические характеристики
1	2,55; 2,61; 2,40; 2,52; 2,39; 2,54	$\bar{X} = 2,50\%$; $S_{\bar{X}} = 0,04$; $\Delta\bar{X} = 0,1$; $\epsilon_{OTH.} = \pm 3,68\%$
1,68	7,09; 6,89; 7,03; 6,58; 7,01; 8,53	$\bar{X} = 6,86\%$; $S_{\bar{X}} = 0,1$; $\Delta\bar{X} = 0,25$; $\epsilon_{OTH.} = \pm 3,63\%$
3,56	64,55; 65,10; 63,99; 64,91; 63,89; 65,0	$\bar{X} = 64,57\%$; $S_{\bar{X}} = 0,22$; $\Delta\bar{X} = 0,57$; $\epsilon_{OTH.} = \pm 0,88\%$
4,01	78,0; 77,1; 78,5; 77,68; 77,46; 78,30	$\bar{X} = 77,84\%$; $S_{\bar{X}} = 0,22$; $\Delta\bar{X} = 0,57$; $\epsilon_{OTH.} = \pm 0,73\%$
6,86	100,0; 96,6; 99,3; 98,91; 98,89; 97,93	$\bar{X} = 98,61\%$; $S_{\bar{X}} = 0,49$; $\Delta\bar{X} = 1,25$; $\epsilon_{OTH.} = \pm 1,27\%$
9,18	100,0; 99,6; 99,34; 98,9; 98,99; 99,85	$\bar{X} = 99,44\%$; $S_{\bar{X}} = 0,17$; $\Delta\bar{X} = 0,43$; $\epsilon_{OTH.} = \pm 0,43\%$
12,45	81,43; 81,12; 80,25; 78,99; 81,51; 80,36	$\bar{X} = 80,78\%$; $S_{\bar{X}} = 0,27$; $\Delta\bar{X} = 0,69$; $\epsilon_{OTH.} = \pm 0,85\%$
Экстрагент: смесь хлороформ – ацетон 9:1		
рН	% экстракции	Метрологические характеристики
1	2	3
1	12,55; 13,10; 12,09; 13,00; 12,63; 12,84	$\bar{X} = 12,70\%$; $S_{\bar{X}} = 0,15$; $\Delta\bar{X} = 0,38$; $\epsilon_{OTH.} = \pm 3,02\%$
1,68	27,27; 27,30; 26,99; 26,81; 26,79; 27,27	$\bar{X} = 27,07\%$; $S_{\bar{X}} = 0,10$; $\Delta\bar{X} = 0,25$; $\epsilon_{OTH.} = \pm 0,92\%$
3,56	82,0; 83,0; 80,96; 82,1; 81,99; 82,3	$\bar{X} = 82,06\%$; $S_{\bar{X}} = 0,27$; $\Delta\bar{X} = 0,69$; $\epsilon_{OTH.} = \pm 0,84\%$

Продолжение таблицы 3

4,01	100,0; 99,8; 99,9; 99,86; 101,3; 100,96	$\bar{X} = 100,3\%; S_{\bar{X}} = 0,49; \Delta\bar{X} = 1,26$ $\varepsilon_{\text{отн.}} = \pm 1,26\%$
6,86	100,0; 99,74; 98,91; 99,1; 98,89; 99,85	$\bar{X} = 99,42\%; S_{\bar{X}} = 0,21; \Delta\bar{X} = 0,53$ $\varepsilon_{\text{отн.}} = \pm 0,53\%$
9,18	100,0; 99,63; 99,71; 99,86; 100,13; 98,99	$\bar{X} = 99,72\%; S_{\bar{X}} = 0,16; \Delta\bar{X} = 0,42$ $\varepsilon_{\text{отн.}} = \pm 0,42\%$
12,45	100,0; 99,99; 101,3; 98,76; 99,82; 98,86	$\bar{X} = 99,79\%; S_{\bar{X}} = 0,34; \Delta\bar{X} = 0,87$ $\varepsilon_{\text{отн.}} = \pm 0,87\%$

Как видно из полученных данных, максимальная экстракция метапрота хлороформом из водных растворов наблюдается при значениях pH 6,86 – 9,18; смесью хлороформ – ацетон (9:1) при pH 4,1 – 12,45. Диапазон pH максимальной экстракции метапрота смесью хлороформ – ацетон (9:1) шире по сравнению с экстракцией хлороформом. Замечено повышение процента экстракции метапрота смесью хлороформ – ацетон (9:1) при значениях pH 1 – 5,5.

С целью проверки влияния электролитов на экстракцию были проведены повторные опыты при различных значениях pH с добавлением до насыщения в буферные смеси электролитов – натрия хлорида и аммония сульфата. Установлено, что присутствие электролитов практически не влияет на процент экстракции метапрота, что важно при последующем их использовании для очистки извлечений от эндогенных примесей при анализе биологических жидкостей.

Выводы

При разработке метода изолирования метапрота из биологических жидкостей рекомендуется использовать хлороформ или смесь хлороформа и ацетона в соотношении 9:1, однократную экстракцию при значениях pH 6,86 – 9,18 (при экстракции хлороформом) или pH 4,01 – 12,45 (при использовании смеси хлороформ – ацетон 9:1).

Библиографический список

1. Вергейчик Т.Х. Токсикологическая химия: учебник / Под ред. проф. Е.Н. Вергейчика. – 4-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2013. – 432 с.
2. Воробьева В.В., Зарубина И.В., Шабанов П.Д. Защитные эффекты метапрота и этомерзола в экстремальных моделях отравлений бытовыми ядами // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2012. Т. 10, №11. С. 3-21.
3. Воробьева В.В., Зарубина И.В., Шабанов П.Д. Защитные эффекты метапрота и этомерзола при отравлении карбофосом // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2012. Т.75., №8. С. 25-30.
4. Воробьева В.В., Зарубина И.В., Шабанов П.Д. Метаболические протекторы в комплексном лечении отравлений фосфорорганическими соединениями // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2013. №1. С. 66-73.
5. Курлякова А.Ф., Гейбо Д.С., Быков В.Н. Особенности фармакокинетики бемитила при ингаляционном введении // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2014. Т.77, №4. С. 25-28.
6. Лесновская Е.Е. Метапрот при экстремальных воздействиях. – СПб.: «Полет», 2010. – 103 с.
7. Мелентьев А.Б. Влияние pH среды водной фазы на экстракцию веществ с различными кислотно-основными свойствами // СМЭ. – 2003. – №2. – С. 40-43.
8. Рылов А. Мирные профессии военного препарата метапрот // Медицинский вестник. – 2010. – № 29 (534). – С. 10-13.

-
9. Сорокина Е.А. Актопротекторы – производные бензимидазола: влияние на цитохром Р450-зависимые монооксидазы и некоторые особенности фармакокинетики: Автореф. канд. фарм. наук. М., – 2002. – 43 с.
 10. Шабанов П.Д. Нейропротектор метапрот: механизм действия и новые клинические направления использования // Consilium medicum. – 2010. – №2. – С.140-144.
 11. Шабанов П.Д. Метапрот – новый противоастенический препарат с психоактивирующими свойствами // Русский медицинский журнал. – 2009. – Т.17, №20. – С. 1406-1407.
 12. Энциклопедия лекарств. Регистр лекарственных средств России / Под ред. Г.Л. Вышковского.– М.:ЛИБРОФАРМ, 2012. – Вып. 20. – 1368 с.

Вергейчик Тамара Харитоновна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: судебно-химический и химико-токсикологический анализ лекарственных средств. E-mail: toxic-pgfa@yandex.ru

Линникова Валентина Акимовна – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: судебно-химический и химико-токсикологический анализ лекарственных средств.

Гуськова Галина Багдасаровна – преподаватель кафедры фармацевтической и токсикологической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: судебно-химический и химико-токсикологический анализ лекарственных средств.