



УДК 340.67:615.285.7.099.074

Использование метода тонкослойной хроматографии при определении тетраэтилтиурамдисульфида в биологических жидкостях

Просветова А.П., Дурицын Е.П., Илюшина Т.Н.

Воронежская государственная медицинская академия, Воронеж

Шорманов В.К.

Курский государственный медицинский университет, Курск

Поступила в редакцию 20.01.2010 г.

Аннотация

Определены оптимальные условия изолирования тетраэтилтиурамдисульфида из биологических жидкостей (кровь, моча) этилацетатом.

Для идентификации и количественного определения тетраэтилтиурамдисульфида в извлечениях из биологических жидкостей (кровь, моча) предложен метод тонкослойной хроматографии с использованием нормальнофазных сорбентов и УФ-спектрофотометрия.

Ключевые слова: биологические жидкости, тетраэтилтиурамдисульфид, изолирование, идентификация, тонкослойная хроматография, определение

Optimal conditions have been determined for tetraethylthyuramdisulphide isolation from biomaterial of blood and urine by ethylacetate.

Thin-layer chromatography with use of normalphase sorbates and UV-spectrophotometric methods are proposed for identification and quantitative determination of tetraethylthyuramdisulphide in extract from biological fluids.

Key words: biological fluids, tetraethylthyuramdisulphide, isolation, identification, thin-layer chromatography, definition

Введение

Особое место в биофармации занимает определение содержания лекарственных веществ и их метаболитов в биологических жидкостях организма (крови и моче), так как, по мнению многих авторов, для объективной оценки терапевтической эффективности лекарственных средств (форм) необходимо изучение процессов всасывания, распределения, накопления и выведения лекарственных веществ.

Подобные исследования в отношении препарата тетурам (тетраэтилтиурамдисульфид), который применяется в медицинской практике для лечения алкоголизма, были проведены. Однако, методики изолирования, очистки и

количественного определения тетраэтилтиурамдисульфида в крови и моче [1, 3, 4, 6, 10] характеризуется длительностью выполнения, недостаточно высокими селективностью и чувствительностью.

Целью исследования явилась разработка методики идентификации, очистки и количественного определения тетраэтилтиурамдисульфида в биологических жидкостях (крови и моче) методом УФ-спектрофотометрии с предварительной очисткой и идентификацией методом тонкослойной хроматографии.

Эксперимент

В качестве объекта исследования рассмотрен тетурам (тетраэтилтиурамдисульфид), соответствующий требованиям ФС 42-0550630805 с содержанием основного вещества не менее 99 %[11].

В ходе эксперимента изучали особенности извлечения тетурама из крови и мочи.

Кровь для исследования брали цельную, стабилизированную гемоконсервантом Фаглюцид, стабилизированную гемоконсервантом Фаглюцид с добавлением ферментов пепсин и трипсин.

В качестве изолирующего агента применяли этилацетат[7]. Для очистки, обнаружения и предварительной идентификации тетраэтилтиурамдисульфида, выделенного из биологической жидкости, использовали возможность применения хроматографии в тонких слоях нормальнофазного сорбента.

В ряд химических стаканов с одинаковым количеством биологической жидкости (5 мл) вносили различные, последовательно возрастающие количества анализируемого вещества (0,5, 2,0 и 5,0 мг). Один химический стакан оставили без тетраэтилтиурамдисульфида для получения контрольного образца. Приготовленные смеси, а также контрольные образцы выдерживали в течение 1,5 часов при температуре 18-22 °С.

В процессе исследования отдельные порции искусственных смесей или контрольных образцов помещали в делительную воронку, затем прибавляли 5 мл этилацетата, взбалтывали и оставляли на 45 минут. Нижний слой извлечения возвращали в химические стаканы, а верхний слой сливали в отдельные пробирки. Процесс настаивания нижнего слоя в химических стаканах повторяли в тех же условиях. Первое и второе извлечения верхнего слоя из модельной смеси объединяли в отдельной пробирке.

0,3 мл каждого извлечения наносили на линию старта хроматографической пластины типа «Сорбфил» UV-254. Параллельно на одну и ту же пластинку наносили раствор вещества-свидетеля. Хроматографировали в стеклянных камерах внутренним объёмом около 600 см³ с использованием в качестве подвижной фазы системы растворителей гексан – диоксан – пропанол-2 (15:5:1). После завершения процесса хроматографирования пластину вынимали из хроматографической камеры, высушивали и проявляли в УФ-свете.

На полученных хроматограммах в УФ-свете наблюдали пятно тетраэтилтиурамдисульфида темно-фиолетового цвета. Анализируемое вещество идентифицировали по величине R_f , совпадающей с таковой вещества-свидетеля ($R_f=0,875\pm 0,02$). Пятно тетраэтилтиурамдисульфида вырезали из хроматограммы вместе с участком пластинки, помещали в пробирку и элюировали вещество из сорбента ацетонитрилом в течение 15 минут. Оптическую плотность полученного элюата измеряли при длине волны 280 нм на спектрофотометре СФ-46 в кювете с

толщиной рабочего слоя 10 мм. Измерения проводили на фоне раствора, полученного в контрольном опыте. По величине оптической плотности определяли количество тетраэтилтиурамдисульфида, изолированного из биологического материала, используя при этом уравнение градуировочного графика $y = 0,118 \cdot 10^{-5} \cdot x$, ($R^2=0,9983$) [2].

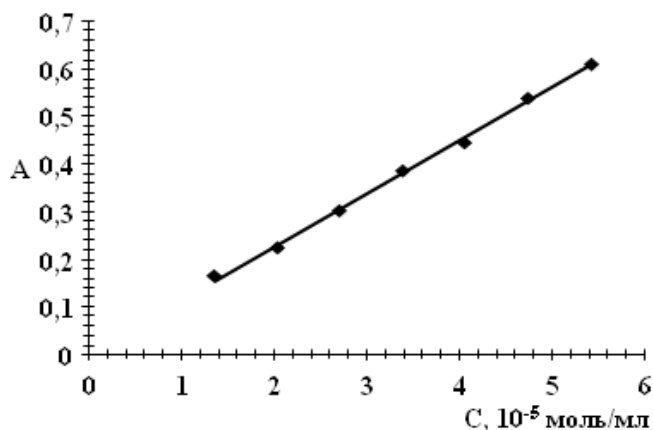


Рис. 1. Градуировочный график для определения концентрации тетраэтилтиурамдисульфида в ацетонитриле

Определяли количество извлечённого антабуса в мг и % по отношению к навеске, предварительно внесённой в биожидкость.

В дальнейшем исследовали влияние гемоконсерванта Фаглюцид и ферментов пепсин и трипсин на степень извлечения тетраэтилтиурамдисульфида из биоматериала от количественного соотношения анализируемого вещества и биологической жидкости.

Обсуждение результатов

В табл. 1 представлены результаты извлечения тетраэтилтиурамдисульфида из биологических жидкостей с использованием в качестве изолирующего агента этилацетата.

Использование этилацетата в качестве изолирующего агента и предложенные условия изолирования позволяют достичь достаточно высокой степени извлечения тетраэтилтиурамдисульфида из мочи не зависимо от его концентрации в биоматериале. Однако, количественное определение тетурама в крови весьма затруднительно, вероятно, вследствие адсорбции вещества белками крови[8, 9, 10].

Таблица 1. Результаты изолирования различных концентраций тетраэтилтиурамдисульфида из биожидкости (кровь, моча) ($n=5$, $P = 0,95$)

Внесено тетурама (мг) на 5 мл биожидкости	Кровь		Моча	
	найдено			
	мг	%	мг	%
0,5	0,02	3,34	4,60	91,98
2,0	0,08	4,18	1,87	93,65
5,0	0,33	6,69	4,72	94,49

Для увеличения степени изолирования тетраэтилтиурамдисульфида из крови использовали кровь с гемоконсервантом Фаглюцид, который обеспечивает сохранение морфофункциональной полноценности крови в течение 50 дней за счет поддержания физиологического уровня АТФ в эритроцитах, реологических свойств крови и величины рН на физиологическом уровне[5], а также кровь с гемоконсервантом Фаглюцид и ферментами трипсином и пепсином.

Пепсин — фермент эндопептидаза, который расщепляет центральные пептидные связи в молекулах белков и пептидов (кроме кератинов и других склеропротеинов) с образованием более простых пептидов и свободных аминокислот. С наибольшей скоростью пепсин гидролизует пептидные связи, образованные ароматическими аминокислотами — тирозином и фенилаланином, однако, в отличие от других протеолитических ферментов — трипсина и хемотрипсина, — строгой специфичностью не обладает. Протеолитическая активность пепсина наблюдается при рН < 6,0, достигая максимума при рН 1,5 — 2,0.

Трипсин — фермент класса гидролаз, расщепляющий пептиды и белки; обладает также эстеразной (гидролиз сложных эфиров) активностью. Трипсины относятся к группе сериновых протеаз и содержат в активном центре остатки серина и гистидина. Фермент активен при рН 5,0 - 8,0 с оптимумом активности при рН 7,0.

Ферменты в модельные смеси вносили в виде порошка в количестве 5 мг, после того как приготовленные смеси, а также контрольные образцы были выдержаны в течение 1,5 часов при температуре 18-22 °С.

Далее определение степени извлечения тетраэтилтиурамдисульфида из биологической жидкости (крови или мочи) проводили согласно выше описанной методике.

Результаты изолирования различных концентраций тетраэтилтиурамдисульфида из крови с гемоконсервантом и ферментами представлены в табл. 2.

Таблица 2. Результаты изолирования различных концентраций тетраэтилтиурамдисульфида из крови с гемоконсервантом ($n=5$, $P = 0,95$)

Масса навески тетурама, мг	Кровь с гемоконсервантом Фаглюцид		Кровь с гемоконсервантом Фаглюцид и трипсином		Кровь с гемоконсервантом Фаглюцид и пепсином	
	найдено					
	мг	%	мг	%	мг	%
0,5	0,02	3,86	0,04	7,71	0,03	5,14
2,0	0,56	29,86	1,14	56,83	0,53	26,65
5,0	1,51	30,18	2,78	55,61	1,18	23,63

Использование гемоконсерванта и ферментов позволило существенно увеличить степень извлечения тетраэтилтиурамдисульфида из биожидкости (крови). Наилучшие результаты были получены при проведении ферментативного гидролиза путем добавления трипсина. Кроме того, использование гемоконсерванта улучшило реологические свойства крови, что позволило сократить время проведения анализа.

В дальнейшем была исследована зависимость степени изолирования тетраэтилтиурамдисульфида из крови с гемоконсервантом Фаглюцид от количества внесенного фермента (пепсина).

Таблица 3. Зависимость степени изолирования тетраэтилтиурамдисульфида из крови с гемоконсервантом Фаглюцид от количества пепсина ($n=5$, $P=0,95$)

Масса навески пепсина, мг	Масса навески тетурама, мг	Найдено	
		мг	%
5	0,5	0,03	5,14
	2,0	0,53	26,65
	5,0	1,18	23,63
10	0,5	0,03	6,42
	2,0	0,47	23,44
	5,0	1,12	22,48
15	0,5	0,03	6,42
	2,0	0,87	43,35
	5,0	2,20	44,05

Увеличение навески пепсина до 15 мг позволило увеличить степень извлечения тетраэтилтиурамдисульфида из крови.

Заключение

1. На основании проведённых исследований для выделения тетраэтилтиурамдисульфида из биологических жидкостей (крови, мочи) предложен этилацетат.

2. Использование гемоконсерванта Фаглюцид улучшает реологические свойства крови, что позволяет сократить время проведения анализа.

3. Использование гемоконсерванта Фаглюцид и ферментов пепсина и трипсина (в количестве 5-15 мг) позволяет существенно увеличить степень извлечения тетраэтилтиурамдисульфида из биожидкости (крови).

4. Разработана методика идентификации и количественного определения тетраэтилтиурамдисульфида в извлечениях из биологических жидкостей (крови, мочи) с применением методов ТСХ и УФ-спектрофотометрии.

Список литературы

1. Гадаскина И. Д., Филов В. А. Превращения и определение промышленных органических ядов в организме. – Л.: Медицина, 1971. – с. 254-255.

2. Дурицын Е.П., Шорманов В.К., Илюшина Т.Н., Васильковская Т.В., Просветова А.П. Определение тетраэтилтиурамдисульфида методом УФ-спектрофотометрии. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 10-летию биотехнологического факультета Курского государственного медицинского университета. – Курск, 2008. - с. 160-163.

3. Егорова Н.М. Биофармацевтический анализ тетурама: Автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук: (15.00.02).-М., 1972.- с. 20.

4. Егорова Н.М. Денситометрическое определение тетурама в крови // Материалы конференции молодых учёных 1 ММИ (1-го Московского медицинского института им. И.М. Сеченова).- М., 1972.-Ч. 1.-с. 87-88.

5. Инструкция по медицинскому применению препарата: ФАГЛЮЦИД® раствор гемоконсерванта. Регистрационный номер: N-001596/01 от 17.02.2006.

6. Мужановський Э.Б., Фартушний А.Ф., Седов А.І., Бейкін С.Г. Визначення тетураму і тіураму в біологічному матеріалі // Фармацевтичний журнал.-1979.-№ 2.- с. 54-57.

7. Просветова А.П., Дурицын Е.П., Илюшина Т.Н., Шорманов В.К. Особенности изолирования и определения тетраэтилтиурамдисульфида в биологическом материале. / Вестник ВГУ / серия Химия, Биология, Фармация, 2009, № 2. – с. 44 – 49.

8. РЛС. Энциклопедия лекарств. – 15-й вып./Гл. ред Г.Л. Вышковский. – М.: «РЛС-2007», 2006. – с. 1488.

9. Семенов С.П. Табакокурение. Алкоголизм. Наркомания: (профилактические сведения) / С.П. Семенов. – СПб: Б.и., 2008. – 112 с.

10. Трухина В.И., Егорова Н.М., Сенцов П.Л., Ажгихин И.С. Новые критерии оценки лекарственных форм тетурама. // Биофармацевтические аспекты получения и назначения лекарств (материалы конференции). – М., 1971. – с. 28-30.

11. ФС 42-0550630805 (на субстанцию тетраэтилтиурамдисульфида).

Просветова Анастасия Петровна – аспирант кафедры фармацевтической химии и клинической фармации Воронежской государственной медицинской академии, Воронеж

Дурицын Евгений Петрович – к.ф.н., доцент кафедры фармацевтической химии и клинической фармации Воронежской государственной медицинской академии, Воронеж. Тел. (4732) 53-02-49.

Илюшина Татьяна Николаевна – к.х.н., ассистент кафедры фармацевтической химии и клинической фармации Воронежской государственной медицинской академии, Воронеж.

Шорманов Владимир Камбулатович – д.ф.н., профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета, Курск.

Prosvetova Anastasiya P. – post-graduated student of pharm. chemistry department, Voronezh State medical academy, Voronezh

Duritsin Evgeniy P. – k.ph.n., assistant professor of pharm. chemistry department, Voronezh State medical academy, Voronezh

Ilyushina Tatiana N. - k.ch.n., assistant professor of pharm. chemistry department, Voronezh State medical academy, Voronezh, e-mail: ilyushina_t@mail.ru

Shormanov Vladimir K. – d.ph.n., professor of pharm. chemistry department, Kursk State medical university, Kursk