

Фармация и фармакология

ТСХ-СКРИНИНГ И ИНДЕКСЫ УДЕРЖИВАНИЯ ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

Карташов Владимир Антонович.

доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармации
Майкопского государственного технологического университета,
г. Майкоп

Резюме Предложена схема исследования токсических веществ основного характера методом ТСХ – скрининга. Установленные значения индексов удерживания исследованных токсических веществ могут быть использованы в химико-токсикологическом анализе для предварительной идентификации при отравлениях неизвестным токсическим веществом.

Ключевые слова тонкопленочная хроматография (ТСХ) азотистых оснований, индексы удерживания

TLC (THIN - LAYER CHROMATOGRAPHY) - SCREENING AND INDEXES OF DEDUCTION OF TOXIC SUBSTANCES

Kartashov Vladimir Antonovich, the doctor of pharm. sciences, the professor of chair of pharmacy of Maikop state technological university, Maikop

Abstract It is offered researches of toxic substances of the basic character by method TLC - screening the established values of indexes of keeping of the investigated toxic substances can be used in chimiko - the toxicological analysis for preliminary identification at poisonings with unknown toxic substance.

УЫТТЫ ЗАТТАРДЫҢ ЖҰҚА ҚАБАТТЫ ХРОМАТОГРАФИЯЛЫҚ (ЖҚХ) – СКРИНИНГІ ЖӘНЕ ҰСТАЛЫНУ ИНДЕКСТЕРІ

Карташов.В.А фарм. ғылым докторы, Майкоп мемлекеттік технология университетінің фармация кафедрасының профессоры Майкоп қаласы

Түйін Негізді қасиеті бар уытты заттарды ЖҚХ – скрининг әдісімен зертеудің бір нұсқасы ұсынылған. Уытты заттарды ЖҚХ зерттеу нәтижесінде олардың ұсталыну индекстері анықталған. Анықталған ұсталыну индекстері мәтіндерін химия-токсикологиялық талдауда қолдану мүмкіншіліктері көрсетілген.

ЖҚХ – скрининг, ұталыну индекстері

ТСХ-скрининг

Вариант ТСХ-скрининга ряда токсических веществ кислотного и основного характера, разработанный нами,

используется для предварительной групповой идентификации, очистки и препаративного выделения. Сущность метода при исследовании токсических веществ основного характера заключается в следующем. На пластины Силуфол или Сорбфил 10х15 см количественно наносят исследуемый экстракт в виде полосы, а по краям пластины - смесь растворов стандартных веществ в форме оснований, в качестве которых используют кодеин, дикаин, новокаин, амидопирин и сибазон. Хроматографирование проводят в стандартных камерах, **ненасыщенных парами подвижной фазы** - ацетона, до продвижения фронта растворителя на 13,5 см. После окончания хроматографирования и удаления растворителя хроматограмму рассматривают в УФ-свете (светофильтры с максимумом пропускания 254 и 360 нм), отмечают зоны флуоресценции и обрабатывают реактивом Драгендорфа. Затем центры желто-оранжевых пятен одних и тех же стандартных веществ, нанесенных в две разные точки стартовой линии и разделившихся в условиях эксперимента, осторожно с помощью препаровальной иглы соединяют пунктирными линиями, пересекающими направление движения фронта растворителя. Таким образом, на хроматограмме получают шесть зон, расположенных между двумя соседними линиями: стартовой линией, линиями миграции стандартных веществ и линией фронта растворителя (рис. 1). Далее определяют в какую зону (хроматографическую группу) попадает анализируемое вещество, которое проявляется в виде полосы желто-оранжевого цвета (в случае положительного результата). Если полоса оказалась между линией старта и линией миграции кодеина, вещество относится к первой хроматографической группе, если - между линиями миграции кодеина и дикаина - ко второй группе и так далее.

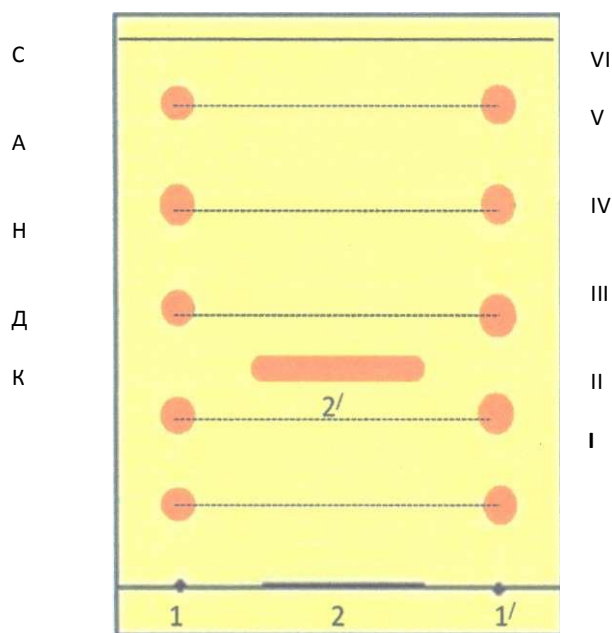


Рис. 1. Хроматограмма при исследовании токсических веществ основного характера методом ТСХ-скрининга: 1 и 1' - точки нанесения смеси стандартных веществ, 2 и 2' - стартовая и обнаруженная полосы вещества, К,Д,Н,А,С - кодеин, дикаин, новокаин, амидопирин, сибазон, I, II, III, IV, V, VI - хроматографические группы. Предварительно исследуемые вещества основного характера были проанализированы методом ТСХ-скрининга и разделены на шесть хроматографических групп (таблица 1).

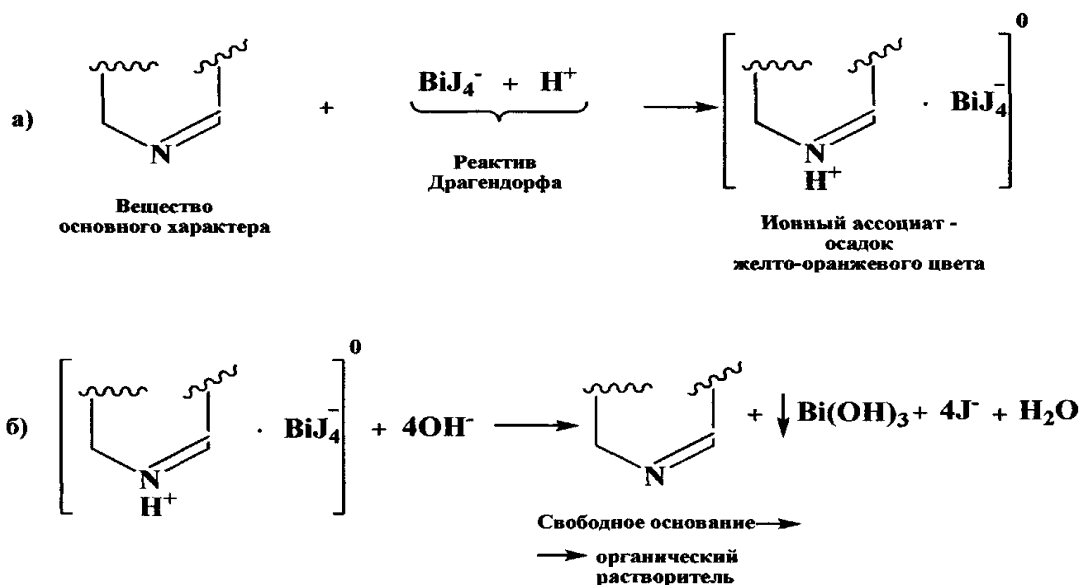
Таблица 1. Распределение токсических веществ основного характера по хроматографическим группам

№ группы	хромат,	Токсические вещества		
1		2		
I	Бензогексоний	Хингамин	Морфин	
	Прозерин	Стрихнин	Хинидин	
	Карбахолин	Платифиллин	Хинин	
	Кониин	Бруцин	Гидрокодон	
	Гоматропин	Азафен	Этаперазин	
	Атропин	Мажептил	Карбидин	
	Пахикарпин	Метеразин		
	Тропацин	Анабазин		
II	Кодеин	Анаприлин	Аминазин	
	Трифтазин	Мелипрамин	Никотин	
	Новокаионамид	Тиоридазин	Дипразин	
	Галидор	Амитриптилин	Промедол	
	Пропазин	Димедрол	Стугерон	
	Этилморфин	Аймалин	Оланзапин	
	Супрастин	Пилокарпин	Ципрогептадин	
III	Дикаин	Хлорацезин	Совкаин	
	Неулептил Хлорпротиксен	Физостигмин Скополамин		

IV	Новокаин Тизерцин Галоперидол Фторацизин Мебикар Изоптин Антипирин	Дротаверин Текодин Вератрин Динезин Центедрин Антипирин Триседил	Аконитин Хлорзепид Кокаин Апрофен Френолон Кордиамин
V	Амидопирин Финлепсин Курантил Оксазепам Папаверин Этмозин Протионамид	Этионамид Дибазол Коразол Мезапам Феназепам Нитразепам Стугерон	Ультракаин Лидокаин Лоратадин Анестезин Золпидем
VI	(Лоратадин) Сибазон	Резерпин Фепранон	Эфедрин Мидокалм

Далее, участок силикагеля, содержащий окрашенную полосу йодвисмутата токсического вещества, переносят в пенициллиновый флакон и подщелачивают раствором гидроксида натрия. При этом йодвисмутат разрушается с образованием свободного основания, которое для окончательной идентификации

и количественного определения экстрагируют органическим растворителем. Реакции, протекающие при обнаружении на хроматограмме (а) и элюировании (б) исследуемых токсических веществ основного характера представлены в виде следующих уравнений:



Если токсическое вещество попало в первую хроматографическую группу, то оно, как правило, загрязнено соэкстрактивными веществами. Для отделения анализируемых веществ от примесей

полученную хроматограмму помещают в камеру, насыщенную парами аммиака до обесцвечивания, и повторно хроматографируют в системе ацетон - 25% раствор аммиака (9:1) в камере, насыщенной парами

подвижной фазы. При этом часть экстрактивных примесей остается на старте, часть - перемещается с фронтом растворителя. Кроме того, вещества первой хроматографической группы имели разные величины R_f

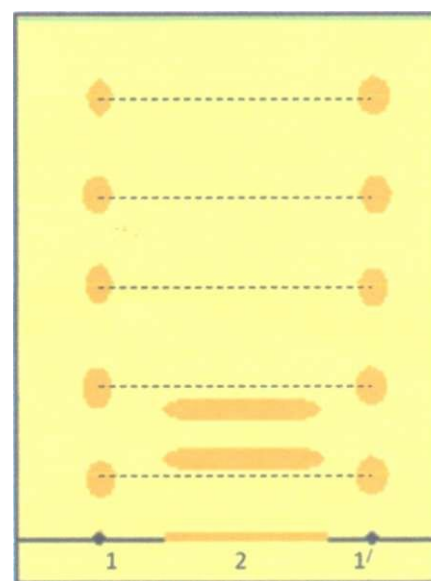
что позволило нам разделить их на две подгруппы относительно кодеина: вещества, имеющие $R_f < 1$, отнесены к первой хроматографической подгруппе, вещества с $R_f > 1$ - ко второй (таблица 2).

	Анабазин	Хинидин	
	Карбидин	Мажептил	

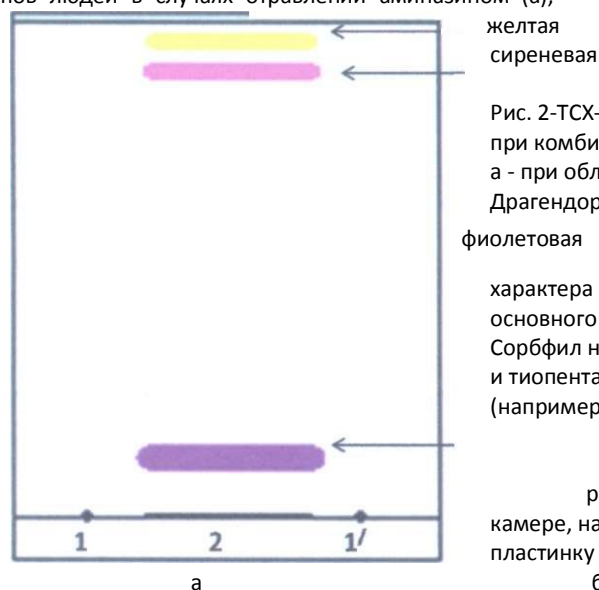
Данный вариант ТСХ-скрининга может быть использован также только для предварительной групповой идентификации токсических веществ основного характера. Для этого смесь стандартных веществ наносят на стартовую линию в две точки, между которыми также в виде точек наносят исследуемые пробы, и далее хроматографируют в описанных выше условиях.

ТСХ-скрининг веществ основного характера был применен нами в опытах на животных. В качестве примера приводим один из экспериментов: собаке с помощью зонда вводили в желудок смесь двух лекарственных веществ - мелипрамина и амитриптилина. После гибели животного проводили изолирование веществ ацетоном из тканей внутренних органов, экстракционную очистку, ТСХ-скрининг на пластинах с силикагелем КСК. При облучении хроматограммы УФ-светом (254 нм) наблюдали флюоресценцию фиолетового цвета (мелипрамин), а при обработке реактивом Драгендорфа - разделение исследуемых веществ во второй хроматографической группе, благодаря различию их индексов удерживания (рис. 2 а, б).

При использовании ТСХ-скрининга в экспертных случаях нам удалось предварительно обнаружить вещества при отравлениях людей неизвестными психотропными препаратами. На рис. 3 приведены хроматограммы, полученные при исследовании печени трупов людей в случаях отравлений аминазином (а),



амитриптилином (в) и комбинированного отравления аминазином и хлопртиксеном (б). Из рисунка видно, что исследуемые вещества, окрашенные в интенсивный желто-оранжевый цвет, хорошо отделяются от метаболитов и соэкстрактивных веществ, которые на хроматограммах обнаруживались в виде полос, слабо окрашенных в желто-оранжевый цвет.



желтая
сиреневая

а)

б)

Рис. 2-ТСХ-хроматограмма, полученная в опыте на животном (собаке) при комбинированном отравлении амитриптилином и мелипразином: а - при облучении УФ-светом; б - после обработки реактивом Драгендорфа.

фиолетовая

ТСХ-скрининг токсических веществ кислотного характера разработан нами по такому же принципу, как и для веществ основного характера. По краям стартовой линии пластинок Силуфол или Сорбфил наносят в виде точек раствор смеси кислотных форм дифенина и тиопентала, между ними в виде полосы - исследуемую пробу (например, экстракт из кислого раствора) и хроматографируют в системе

растворителей ацетон - н-гексан - диэтиламин (10:10:1), в камере, насыщенной парами подвижной фазы. После высушивания пластинку обрабатывают раствором сульфата ртути (II) до увлажнения.

б

в

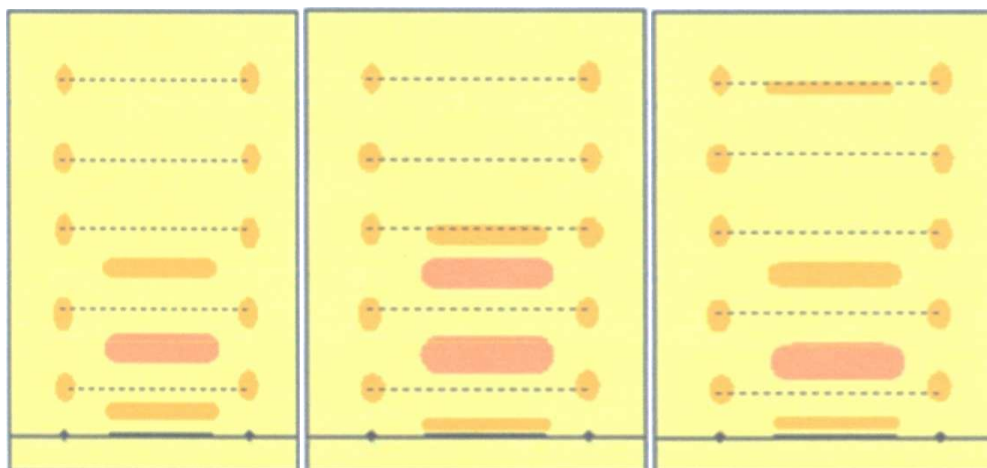


Рис. 3. ТСХ-хроматограммы, полученные в экспертных случаях при отравлениях аминазином (а), аминазином и хлорпротиксеном (б), амитриптилином (в).

Вещества кислотного характера проявляются в виде пятен и полос белого цвета на матовом фоне. Исследуемые вещества могут принадлежать к одной из трёх хроматографических групп (рис. 4 а, б).

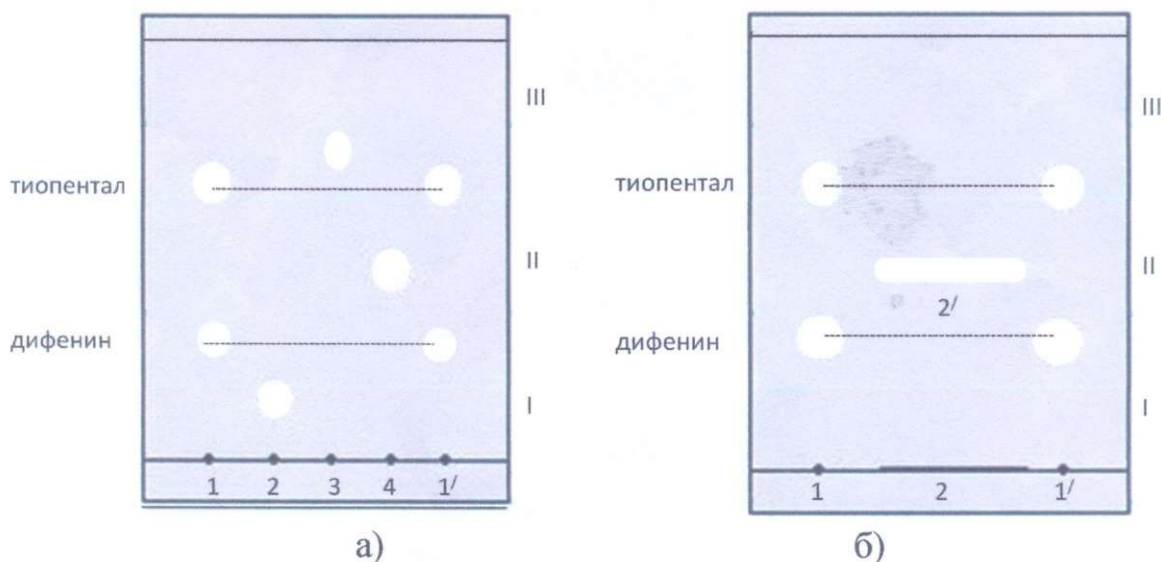


Рис. 4- Хроматограммы, полученные при ТСХ-скрининге веществ кислотного характера: а - для идентификации, б - для элюирования.

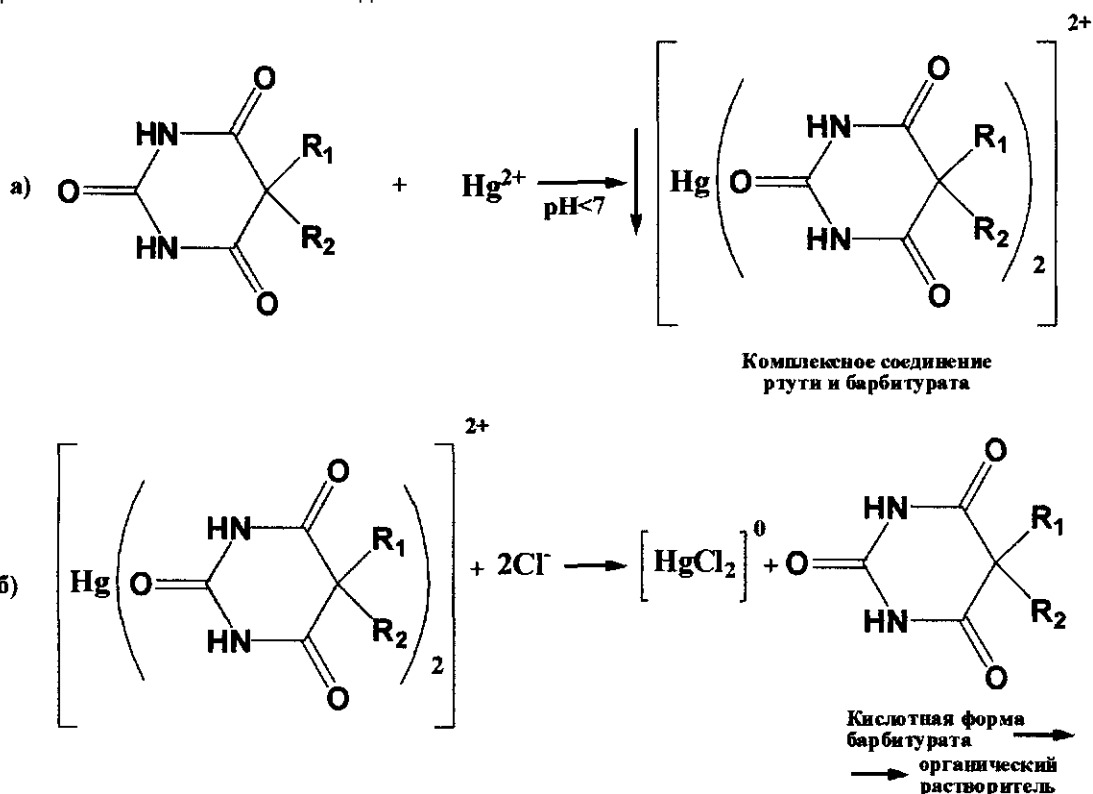
Принадлежность веществ кислотного характера к хроматографическим группам показана в табл. 3.

Таблица 3- Распределение веществ кислотного характера по хроматографическим группам

№ группы	хромат.	Токсические вещества
I		Ацетилсалициловая кислота Салициловая кислота
		Бутадион Бензойная кислота
		Бегообамил Фенобарбитал
II		Барбамил Барбитал
		Дифенин Этаминал
III		Мепробамат Этосуксимид
		Тиопентал Ноксирон Пуфемид

Участок силикагеля (рис. 5б), содержащий исследуемое вещество в виде полосы, количественно переносят во флакон, добавляют насыщенный раствор хлорида натрия, экстрагируют хлороформом и, после удаления растворителя, токсическое вещество исследуют различными аналитическими методами с

целью окончательной идентификации и количественного определения. Ниже приведены уравнения реакций, протекающих при обнаружении на хроматограмме (а) и элюировании (б) веществ кислотного характера (на примере барбитурата):



Индексы удерживания

Токсические вещества внутри каждой хроматографической группы имеют разную миграцию, что позволяет их дополнительно идентифицировать. С этой целью мы предлагаем определять индексы удерживания (I_x), которые показывают относительное положение веществ в группах. Индексы удерживания могут быть рассчитаны по следующей формуле:

$$I_x = I_x - I_N / I_{N+1} - I_N + N, \text{ где:}$$

I_x - индекс удерживания вещества (x) в соответствующей хроматографической группе (N);

I_x - расстояние от линии старта до центра пятна анализируемого вещества;

I_N - расстояние от линии старта до линии миграции стандартного вещества предыдущей хроматографической группы (для веществ первой группы $I_N = 0$);

I_{N+1} -расстояние от линии старта до линии миграции стандартного вещества следующей хроматографической группы (для веществ шестой группы I_{N+1} равно расстоянию, пройденному фронтом растворителя).

Таблица 4- Индексы удерживания некоторых токсических веществ

Вещество	I_x	Вещество	I_x
Азеластин	1,27±0,03	Диметинден	1,41±0,05
Фенспирид	1,00±0	Цетиридин	1,00±0
Оланзапин	2,33±0,06	Дипразин	2,84±0,05
Хлоропирамин	2,38±0,03	Ципрогептадин	2,48±0,07
Хифенадин	3,16±0,19	Димедрол	2,88±0,10
		Кветиапин	3,89±0,17
Ульттракаин	5,30±0,04		4,08±0,06
Золпидем	5,43±0,06	Анестезин	5,97±0,03
Лидокаин	5,67±0,03		
Лоратадин	6,04±0,04		

Как видно из таблицы, анализируемые вещества, относящиеся к одной и той же группе, имеют разные величины индексов удерживания, например, фенспирид, азеластин, диметинден (I хроматографическая группа), оланзапин, ципрогептадин, димедрол (II группа), ульттракаин, золпидем, лидокаин (V группа). Некоторые вещества мигрируют на расстояние, равное миграции стандартных веществ, тогда их индексы удерживания равны номеру хроматографической группы. Имеются случаи, когда индексы удерживания веществ имеют высокие значения в предыдущей группе и низкие - в последующей, однако различия между результатами, полученными в той и другой группе, обычно, не значимы, например, как в случае лоратадина и кветиапина.

Таким образом, изложенный вариант ТСХ-скрининга и индексы удерживания могут быть использованы в химико-токсикологическом анализе для предварительной идентификации при отравлениях неизвестным токсическим веществом.

Литература

1. Зимнухов, В.В. Модификация ТСХ-скрининга лекарственных третичных азотсодержащих оснований / Зимнухов В.В., Удалов А.В. // Проблемы суд. медицины, экспертизы и права: сб. - 2000. - Вып. 1. - С. 57-59

В качестве примера приводим рассчитанные нами индексы удерживания некоторых токсических веществ основного характера (таблица 4).

2. Казарцев, И.А. Модификация метода ТСХ-скрининга ядовитых и сильнодействующих азотсодержащих органических оснований / Казарцев И.А. // «Науки о человеке»: материалы VI конгресса молодых ученых и специалистов / под. ред. Л.М. Огородовой и Л.В. Капиличева. - Томск: СибГМУ, 2005. - 120 с.
3. Карташов, В. А. Вариант ТСХ-скрининга ядовитых и сильнодействующих азотсодержащих органических оснований / Карташов В.А, Овсянникова В.М., Кудрикова Л.Е. // Суд.-мед. экспертиза. - 1982. - № 3. - С. 39-41
4. Карташов, В.А. Изучение вопросов экстракции лекарственных веществ из биологического материала: дисс... д-ра фармац. наук / Карташов В.А. - Барнаул, 1990. - 361 с.
5. Удалов, А.В. Хроматографическая идентификация и определение малолетучих органических веществ в судебно-химическом анализе: автореф. дисс... на соиск. учен. степ. канд. хим. наук / Удалов А.В. - Краснодар, 1999. - 16 с.
6. Чернова, Л.В. Изолирование, обнаружение и определение хлорпротиксена, аминазина, амитриптилина и мелипр амина при исследовании биологического материала: дисс... на соиск. учен. степ. канд. фармац. наук / Чернова Л.В. - Барнаул, 1990. - 219 с.