

**ВИЗНАЧЕННЯ АПРОФЕНУ В БІОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ
МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ****Ключові слова:** високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), токсикологічне визначення, апрофен

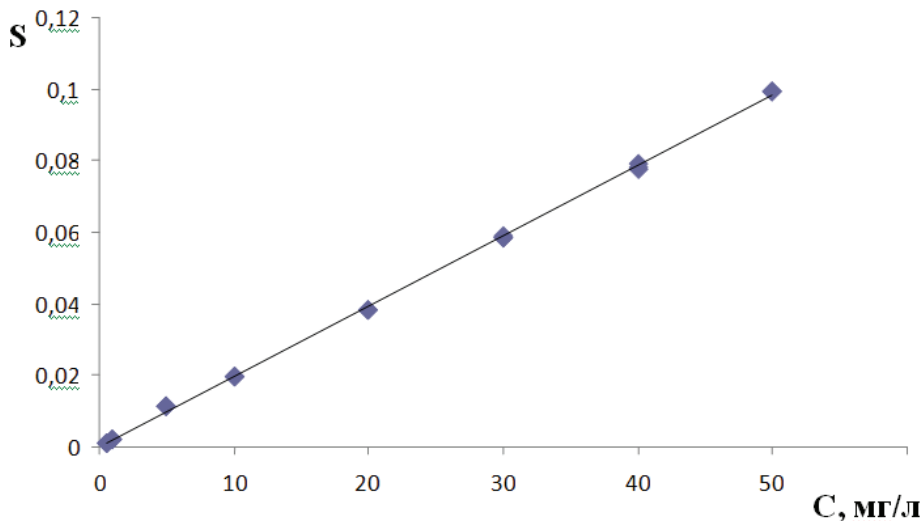
Динаміка розвитку наркоманії та токсикоманії в Україні наближає ситуацію до рівня епідеміологічної [1]. Особливого поширення набуло немедичне використання лікарських засобів, що виявляють психотропні властивості [2, 3]. Одним з таких препаратів є апрофен, який входить до складу таблеток тарену [4]. Відомі численні випадки зловживання останнім, які іноді супроводжувались гострими або летальними отруєннями [5–7]. Незважаючи на це, методи виявлення та визначення апрофену, які були б придатні для клініко- або судово-токсикологічних досліджень до цього часу, є невідомими. Тому метою цієї роботи є розробка відповідної методики визначення апрофену в крові та іншому біологічному матеріалі за допомогою методу ВЕРХ.

Для визначення часу утримання апрофену та можливого впливу ендогенних речовин було досліджено розчини апрофену в ацетонитриллі, у ацетонитрильних екстрактах з крові та печінки, а у якості бланків – чисті екстракти з крові та печінки. При хроматографічному дослідженні цих розчинів було виявлено по одному піку з часом утримання $23,12 \pm 0,20$ хв. Максимум поглинання спостерігали при 210 нм. Таким чином, компоненти матриці не заважають виявленню апрофену у біологічному матеріалі.

Кількісне визначення апрофену проводили після встановлення градуовальної залежності відгуків площ піків від концентрації. Для цього було виготовлено серію градуовальних розчинів з концентраціями 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1, 0,5 мг/л. Кожний градуовальний розчин відповідно до рекомендацій GTFCh [8–10] було досліджено 6 разів. При хроматографічних дослідженнях було встановлено, що залежність концентрації від площі піку в усьому діапазоні застосованих концентрацій (від 0,5 до 50 мг/л) лінійна (рисунок) і має такий вигляд (формула) $y = b \cdot x$:

$$S = 0,002 \cdot C,$$

де C – концентрація розчину, мг/л; S – площа піку.



Градуовальна залежність відгуків площ піків від концентрації апрофену

Метрологічні характеристики отриманої градуовальної залежності, одержаної методом ВЕРХ ($\lambda=210$ нм; об'єм проби – 4 мкл) ($n=48$; $P=0,95$) – $r=0,9997$, $b=0,00197$.

Метод визначено з межою чутливості 0,5 мкг/мл у крові.

Далі були визначені метрологічні властивості методики. Для цього були приготовлені контрольні розчини апрофену. В якості розчинника використано ацетонітрильний екстракт крові.

Результати кількісного визначення апрофену і метрологічні характеристики методики представлені в табл. 1.

Т а б л и ц я 1

Метрологічні характеристики методики

Вміст апрофену (мг/л)	Площа піку (середнє з трьох значень)	Виявлено апрофену		Метрологічні характеристики (n=3, P=0,95)
		мг/л	%	
0,52	0,00102	0,51	98,08	$X = 99,34$ $S = 1,54$ $S_{\bar{d}} = 0,89$ $\Delta \bar{D} = 3,81$ $\epsilon = \pm 3,84\%$ $X \pm \Delta \bar{D} = 99,34 \pm 3,81$
21,0	0,04244	21,22	101,05	
48,0	0,09550	47,75	98,89	

Далі необхідно було розробити спосіб підготовки проб крові, придатний для подальшого виявлення та визначення апрофену методом ВЕРХ. Для депротейнізації зразків було використано різні осаджувачі білків, а саме: трихлороцтову, фосфорно-вольфрамову та хлороводневу кислоти, етанол та ацетонітрил, а також ізолювання органічними розчинниками з сухої суміші крові з натрію сульфатом.

Проведені дослідження свідчать, що тип осаджувача має значний вплив на вихід апрофену з крові (табл.2).

Т а б л и ц я 2

Результати впливу осаджувачів білка на вихід апрофену з крові

Осаджувач білка	Введено, мг	Виявлено, мг	Вихід, %	
1М розчин трихлороцтової кислоти	5,00	2,05	41,2	
Фосфорно-вольфрамова кислота	5,00	1,99	39,8	
Етанол	5,00	2,83	56,6	
Ацетонітрил	5,00	4,28	85,6	
10% розчин хлороводневої кислоти	5,00	2,04	40,8	
Метод [11,12]	Ефір	5,00	1,71	21,4
	Хлороформ	5,00	1,96	39,2
	Етанол	5,00	2,74	54,8

Як свідчать наведені дані, найкращі результати отримано при використанні в якості депротейнізатора ацетонітрилу, який забезпечував не тільки добрий вихід аналіту, а й прийнятне співвідношення сигнал–шум, що є дуже важливим, ураховуючи подальше використання методу ВЕРХ.

Ще одне важливе питання, яке потрібно було вирішити за допомогою розробленого методу – це встановлення можливого терміну визначення апрофену при його виявленні у біологічному матеріалі з гнильними змінами. Для цього було виготовлено модельну суміш апрофену у подрібненій тканині печінки трупa, наважки якої досліджували один раз на місяць. Результати представлено в табл. 3.

Т а б л и ц я 3

Збереженість апрофену у загниваючому біологічному матеріалі

Місяць зберігання	Виявлено апрофену (% до вихідного)
0	100,0
1	79,2
2	49,5
3	21,3
4	8,6
5	1,4

Експериментальна частина

Умови проведення методу ВЕРХ. Дослідження проводили на рідинному хроматографі «Agilent 1100» у режимі градієнтного елюювання – від 5 % А до 100 % В за 40 хв. Рухома фаза: елюент А – перхлорат літію (0,2 М LiClO₄ – 0,005М HClO₄), елюент В – ацетонітрил. Максимальний тиск – 2,5 МПа, температура колонки – 40°C. Колонка завдовжки 0,2×75 мм з нерухомою фазою «Prontosil» 120-5C18AQ, УФ-детектування в діапазоні хвиль – 210–300 нм. Об'єм проби – 4 мкл (автосамплер). Швидкість рухомої фази – 1 мл/хв.

Методика побудови градуювального графіка. 0,0050 г апрофену вміщували у мірну колбу місткістю 50,00 мл, розчиняли в ацетонітрилі і доводили до позначки ацетонітрилом (вихідний розчин). Розведенням останнього готували градуювальні розчини з концентраціями 50, 40, 30, 20, 10, 5, 1, 0,5 мг/л. Отримані розчини використовували для побудови градуювального графіка.

Результати представлено на рисунку. (див. стор. 62.)

Підготовка крові до експерименту. До 200,0 г трупної крові додавали 0,0100 г апрофену, ретельно перемішували і поміщали на добу до холодильника.

Ізолювання апрофену із крові. 5 мл підготовленої крові вміщували у центрифужну пробірку і для осадження білків додавали 5 мл ацетонітрилу (або насиченого розчину фосфорновольфрамової кислоти, або 1 М розчину трихлороцтової кислоти, або 96 % етанолу, або 10 % розчину хлороводневої кислоти). Вміст пробірки перемішували, залишали на 10 хв і потім центрифугували протягом 5 хв при 5000 об/хв. Для очищення цільових компонентів від найбільш гідрофобних сполук (ліпідів) після відділення надосадової рідини проводили екстракцію гексаном. Для чого до надосадової рідини додавали гексан у співвідношенні 1:5 (за об'ємом), струшували протягом 5 хв, після розділення шарів верхній гексановий шар відкидали, а нижній вміщували у пробірку з позначкою, доводили до об'єму 5,0 мл і досліджували. Операцію проводили тричі.

Крім того ізолювання апрофену проводили з сухої суміші крові з натрію сульфатом за методами [11,12]. В останньому разі в якості екстрагентів застосовували 50 мл хлороформу, діетилового ефіру та етанолу. Після екстракції проби упарювали до об'єму 5,0 мл і досліджували.

Методика визначення зберігання апрофену у біологічному матеріалі, який зазнав гнильних змін. До 50 г подрібненої тканини трупної печінки додавали 0,0100 г апрофену, ретельно перемішували і поміщали на добу в холодильник. Наважку 5,0 г гомогенату печінки екстрагували 10 мл ацетонітрилу впродовж 5 хв, екстрагент відфільтровували, додавали гексан у співвідношенні 1:5 (за об'ємом), струшували протягом 5 хв. Після розділення шарів верхній гексановий шар відкидали, а нижній вміщували у мірну колбу місткістю 10,00 мл, доводили до мітки і досліджували розробленим методом. За отриманими величинами S (площами піків) проводили відповідні розрахунки С (концентрації апрофену) за вищенаведеною формулою.

Аналогічні дослідження проводили щомісячно з черговою порцією гомогенату печінки, що зберігався.

В и с н о в к и

1. Розроблено методику ВЕРХ визначення апрофену та встановлені метрологічні параметри методики.

2. Вивчено вплив різних депротеїнізаторів на вихід апрофену з трупної крові й оптимізовано умови пробопідготовки.

3. Встановлено можливість визначення апрофену у біологічному матеріалі, який зазнав гнильних змін протягом 5 місяців.

1. *Лінський І.В., Мінко О.І., Первомайський Е.Б. та ін.* // Вісник психіатрії та психофармакотерапії. – 2007. – № 2. – С. 44–58.

2. *Линский И.В., Минко А.И., Первомайский Э.Б.* // Наркология. – 2005. – № 4. – С. 12–17.

3. *Лінський І.В., Голубчиков М.В., Мінко О.І. та ін.* Актуальні тенденції поширення залежності від психоактивних речовин в Україні: Щорічний аналітичний огляд. – Харків, 2007. – Вип. 4. – 52 с.

4. *Кулакова В.И., Серова В.Н.* Лекарственные средства, применяемые в акушерстве и гинекологии. – М., ГОЭТАР Медиа, 2008. – 185 с.

5. *Жуков С.В., Королюк Е.Г.* **Избранные лекции по медицине катастроф.** –Тверь, 2007. – 120 с.

6. *Зозуля И.С., Иващенко О.В.* // **Український медичний часопис.** – 2007. – № 6. – С. 62.

7. *Лужников Е.А., Суходолова Г.Н.* Клиническая токсикология. – М., Libra, 2008. – 576 с.

8. *F.T.Peters, J.Hallbach, H.H.Maurer.* Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie Arbeitskreis Qualitätssicherung des Arbeitskreises Klinische Toxikologie der GTFCh zur Validierung von Methoden für die toxikologische Analytik im Rahmen der Hirntod-Feststellung. Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie

9. *Peters F.T., Maurer H.H.* // Accred.Qual.Assur. – 2002. – № 7. – P. 441–449.

10. *Peters F.T., Drummer O.H.* // For. Sci. Int. – 2007. – Vol. 165. – P. 216–224.

11. *Петюнін Г.П., Насер І.* // Журнал орган. та фармацевт. хімії. – 2007. – Т. 5, вип. 2(18). – С. 79–82.

12. *Клисенко М.А., Калинина А.А, Новикова К.Ф. и др.* – Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде. – М., Колос, 1992. – 567 с.
Надійшла до редакції 16.02.2011.

Г.П.Петюнин, Хусейн Каафарани

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АПРОФЕНА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЖХ), токсикологическое определение, апрофен

Разработана методика обнаружения и определения апрофена в биологическом материале методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Изучено влияние различных методов депротеинизации на выходы апрофена из крови и его сохраняемость в биологических тканях при гнилостных процессах.

G.P.Petyunin, Husseyn Kaafarani

DETERMINATION OF APROPHENE IN BIOLOGICAL MATERIALS BY THE METHOD OF HIGHLY EFFECTIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Key words: chromatography high performance liquid (HPLC), toxicological definition aprofen

S U M M A R Y

The technique of determination of aprophene in a biological material by a method highly effective fluid chromatography is developed. Influence of various methods of deproteinization on yields of an aprophene from blood and its keeping in biological tissues is studied at putrefactive processes.