

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСТРАКЦІЙНИХ ТА ХРОМАТОГРАФІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ АМІНОБЕНЗОФЕНОНІВ ГІДАЗЕПАМУ

Ключові слова: гідазепам, амінобензофенони, екстракція, тонкошарова хроматографія

Виявлення похідних 1,4-бензодиазепінів у біологічному матеріалі здійснюють після кислотного або ферментативного гідролізу останнього [8]. При цьому метаболіти та залишки неметаболізованих засобів перетворюються у спільні продукти – амінобензофенони, які й виявляють різними методами, після їх екстракції з підлученого гідролізату [6, 8, 9, 11].

Як нами було встановлено раніше [3], вітчизняний 1,4-бензодиазепін – гідазепам [1, 2] у разі гідролізу дає три амінобензофенони – амінобромбензофенон (АББ), метиламінобромбензофенон (МББ) та амінокарбоксібромбензофенон (АКББ) (рис. 1). При чому АКББ є специфічним саме для гідазепаму і тому наявність його у біологічному матеріалі слугує маркером факту вживання останнього.

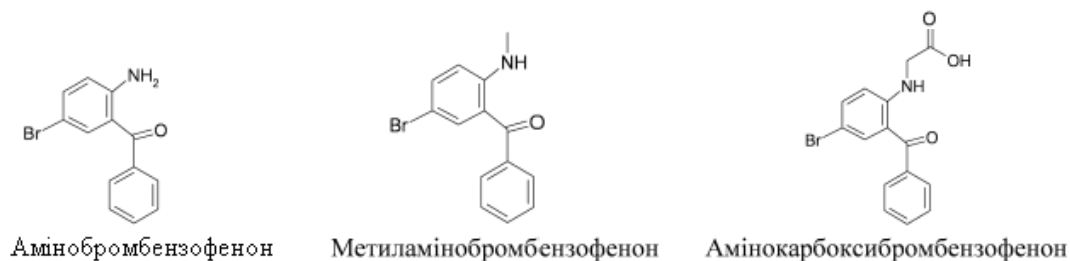


Рис. 1. Амінобензофенони гідазепаму

Гідазепам є вітчизняним лікарським засобом і токсикологічні дослідження його раніше не здійснювали. Саме такі обставини зумовили мету роботи – дослідити вплив природи екстрагента і рН середовища на ізолювання амінобензофенонів гідазепаму, а також їхню хроматографічну поведінку в різних хроматографічних системах.

Матеріали та методи дослідження

Амінобензофенони гідазепаму одержували шляхом гідролізу субстанції гідазепаму [3]. Індивідуальні амінобензофенони виділяли методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на препаративних хроматографічних пластинках та ідентифікували методом хромато-мас-спектрометрії. Аналогічним чином з відповідних представників похідних 1,4-бензодиазепіна одержували та виділяли амінобензофенон (АХБ) – з оксазепаму, метиламінобензофенон (МХБ) – з діазепаму, амінітробензофенон (АНБ) – з нітразепаму та амінітроброхлорбензофенон (АНХБ) – з клоназепаму. Метилловий ефір АКББ одержували шляхом взаємодії останнього з діазометаном [3]. ТШХ-дослідження виконували на аналітичних пластинках Sorbfil (ТУ26-11-17-89). Підготовку ТШХ-пластинок у разі використання систем ТА, ТВ, ТС та ТЛ здійснювали згідно з [10, 11].

Дослідження впливу рН на екстракцію робили на фосфатних буферних розчинах (4 мл), до яких додавали розчин суміші амінобензофенонів гідазепаму в метанолі. Екстрагували рівною кількістю хлороформу як найпоширенішим універсальним екстрагентом упродовж 5 хв. Контрольним екстрактом слугували 20 мкл упареного метанольного розчину суміші АББ, МББ та АКББ без екстракції. Кінцеві екстракти та контрольний розчин досліджували методом двомірної хромато-мас-спектрометрії [7] на хромато-мас-спектрометрі Agilent 6890N/5973N/FID виробництва Agilent Technologies (США) з мікропотоковим перемикачем Діна. Відсоток екстракції визначали як відношення площ хроматографічних піків досліджуваних амінобензофенонів в екстрактах до площ відповідних хроматографічних піків контрольного розчину.

Дослідження природи екстрагента здійснювали на гідролізаті печінки, який одержували гідролізом печінки в середовищі 6 М хлорводневої кислоти згідно з [6]. До гідролізату (4 мл) додавали розчин суміші амінобензофенонів гідазепаму в метанолі, кислотність доводили до рН ~ 2 та екстрагували впродовж 5 хв рівним об'ємом відповідного розчинника. Одержані екстракти досліджували аналогічно як у разі дослідження впливу рН на екстракцію.

Результати дослідження та обговорення

Результати екстракції амінобензофенонів гідазепаму за різного значення водневого показника подано в табл. 1 та графічно зображено на рис. 2.

Таблиця 1

Ступінь екстракції амінобензофенонів гідазепаму хлороформом з водних буферних розчинів ($X_{cp} \pm \sigma, n = 5$)

рН буферного розчину	Ступінь екстракції, %		
	АББ	МББ	АКББ
1,0	98 ± 4	99 ± 4	98 ± 5
2,0	99 ± 5	98 ± 3	98 ± 4
3,0	98 ± 6	99 ± 5	99 ± 5
4,0	99 ± 6	99 ± 5	98 ± 4
5,0	98 ± 5	97 ± 6	94 ± 7
6,0	99 ± 4	98 ± 3	37 ± 3
7,0	99 ± 3	99 ± 5	9 ± 1
8,0	98 ± 6	99 ± 4	0
9,0	98 ± 4	98 ± 5	0
10,0	99 ± 3	99 ± 6	0
11,0	98 ± 5	99 ± 3	0
12,0	98 ± 4	98 ± 5	0

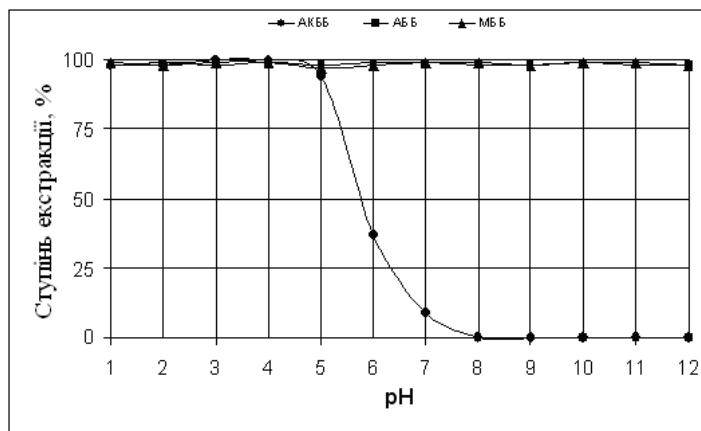


Рис. 2. Залежність екстракції амінобензофенонів гідазепаму хлороформом з водних буферних розчинів від рН

Аналіз отриманих даних свідчить, що екстракція АББ та МББ не залежить від кислотності середовища, в той час як на екстракцію АКББ суттєво впливає водневий показник. Вже у разі збільшення рН до 6 ступінь екстракції АКББ становить близько 40%, а у разі подальшого підвищення рН до 7 становить лише 9%. Така поведінка АКББ зрозуміла та очікувана, адже зумовлена наявністю карбоксильної групи в будові молекули. АББ та МББ хоча і є органічними основами, але дуже слабкими для протонізації в діапазоні рН 1–6. В цілому, одержані результати свідчать, що найбільш оптимальним середовищем для екстракції амінобензофенонів гідазепаму є слабокисле середовище ($\text{pH} \leq 5$). Слід зазначити, що в цьому діапазоні рН, із слабкислого середовища також екстрагуються й інші амінобензофенони [5], що дає змогу рекомендувати саме слабокисле середовище для екстракції амінобензофенонів в ході скринінгу на похідні 1,4-бензодіазепіна.

Вплив природи екстрагента на ступінь екстракції амінобензофенонів гідазепаму подано в табл. 2.

Т а б л и ц я 2

Ступінь екстракції амінобензофенонів гідазепаму із гідролізату печінки різними розчинниками ($X_{\text{cp}} \pm \sigma, n = 5$)

Розчинник	Ступінь екстракції, %		
	АББ	МББ	АКББ
Гексан	42 ± 6	44 ± 5	< 1
Гептан	38 ± 4	39 ± 5	< 1
CHCl_3	66 ± 3	63 ± 4	83 ± 4
CH_2Cl_2	68 ± 4	65 ± 5	85 ± 5
$(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$	75 ± 8	70 ± 7	97 ± 8
$\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$	84 ± 6	86 ± 5	97 ± 7
$\text{C}_4\text{H}_9\text{Cl}$	89 ± 5	92 ± 5	79 ± 4

Як впливає з отриманих даних, гексан та гептан є найменш ефективні як екстрагенти. Незважаючи на те, що ці екстракти найменше з усіх досліджених розчинників містять коекстрактивні речовини, вони майже не екстрагують АКББ, при цьому екстракція АББ та МББ становить близько 40%. Використання таких полярних екстрагентів як діетиловий ефір та етилацетат підвищує ступінь екстракції АББ та МББ до 70–80%, а АКББ майже до 100%, але, разом з тим, одержані екстракти дуже забруднені коекстрактивними речовинами, які ускладнюють подальше дослідження. Хлороформ та дихлорметан майже однаковою мірою достатньо гарно екстрагують всі три амінобензофенони, при цьому хлороформні екстракти, незначною, але все ж таки деякою мірою чистіші за дихлорметанові. Найбільш оптимальним, враховуючи чистоту кінцевих екстрактів та ступінь екстракції, виявився відносно новий у вітчизняній практиці екстрагент н-хлорбутан. За доволі високого ступеня екстракції (АББ та МББ близько 90%, а АКББ близько 80%), кінцеві екстракти виявились значно чистішими навіть за хлороформні. Аналізуючи здатність досліджених розчинників екстрагувати амінобензофенони гідазепаму та коекстрактивні речовини, як найефективніші з практичної точки зору можна рекомендувати насамперед н-хлорбутан, хлороформ, дихлорметан.

Дослідження хроматографічних характеристик АКББ, його метилового ефіру разом з іншими амінобензофенонами в десяти хроматографічних системах, що їх використовують у разі систематичного токсикологічного аналізу [10, 11], чотирьох

хроматографічних системах розчинників, що їх використовують у вітчизняній практиці (№ 3–6), двох (№ 1 та 2), використовуваних у разі дослідження амінобензофенонів [2, 5], а також враховуючи полярну природу АКББ, хроматографічних систем ТАК та ТАЛ [11], виявило значну хроматографічну інертність АКББ, разом з тим, АББ та МББ, як і інші амінобензофенони, навпаки, виявляють значну рухливість (табл. 3).

Т а б л и ц я 3

Значення hR_f амінобензофенонів у різних хроматографічних системах

Система*	$hR_f \pm 5$								
	АКББ	АКББ- Ме	АББ	МББ	АХБ	МХБ	АБХБ	АНБ	АНХБ
Бензол	0	15	50	75	51	75	62	24	24
Толуол	0	14	45	67	45	67	57	24	25
ТА	91	78	90	92	90	92	91	89	89
ТВ	0	26	35	79	35	80	62	9	9
ТС	2	95	93	94	93	94	93	90	91
ТD	0	88	92	94	92	93	93	87	88
ТE	20	93	94	95	94	95	95	93	93
ТF	0	88	93	93	93	94	93	91	91
ТL	0	93	93	94	93	94	93	92	92
ТАD	2	89	91	92	91	92	92	89	89
ТАE	93	79	95	95	95	95	95	95	95
ТАF	74	85	94	94	94	94	94	94	94
ТАК	75	86	85	85	86	90	85	74	75
ТАЛ	92	95	94	95	94	95	95	94	94
1	0	7	14	38	14	38	19	6	6
2	0	0	3	10	3	10	4	0	0
3	54	85	80	86	80	86	78	69	70
4	4	90	85	90	85	90	85	83	83
5	2	89	86	89	86	89	86	80	80
6	0	94	93	95	93	95	93	92	92

П р и м і т к и: * – рухомі фази ТА–ТL, ТАD, ТАE, ТАF, ТАК та ТАЛ згідно з [13]; 1 – хлороформ–чотирихлористий вуглець (1:1); 2 – гексан–хлороформ (3:1); 3 – бензол–етанол–діетиламін (9:1:1); 4 – бензол–і-пропанол–25%-й аміак (17:3:0,2); 5 – толуол–ацетон–етанол–25%-й аміак (9:9:1,5:0,5); 6 – диоксан–хлороформ–ацетон–25%-й аміак (19:18:2:1). АКББ-Ме – метиловий ефір амінокарбоксібромбензофенону.

Як впливає з даних табл. 3, в більшості ТШХ-систем (ТВ, ТС, ТD, ТF, ТL, ТАD, № 1, № 2, № 3, № 4, та № 6) АКББ не хроматографується взагалі, а в тих, де він проявляє рухливість (системи ТА, ТЕ, ТАE, ТАК, ТАЛ та № 3), не відбувається хоча б задовільного розділення інших амінобензофенонів. Зі всіх досліджених рухомих фаз виключення становлять лише системи ТВ, бензол та толуол, в яких можливо одночасно розділити АКББ, однак лише у вигляді метилового ефіру, та інші амінобензофенони, але без розділення АББ і АХБ та МББ і МХБ. Хроматографічна інертність АКББ обумовлена насамперед його полярністю. Складність в розділенні пар АББ/АХБ та МББ/МХБ обумовлена подібністю цих сполук, адже вони розрізняються лише природою галогену.

В и с н о в к и

1. Для амінобензофенонів гідазепаму найефективнішою є екстракція із слабо-кислого середовища (рН = 5 та нижче).
2. Найоптимальнішими екстрагентами для АББ, МББ та АКББ з гідролізатів органів виявилися н-хлорбутан, дихлорметан та хлороформ.
3. Враховуючи екстракційні властивості амінобензофенонів гідазепаму та інших 1,4-бензодіазепінів у разі проведення токсикологічного скринінгу на похідні 1,4-бенздіазепіна по продуктам гідролізу доцільним є екстракція амінобензофенонів за рН ≤ 5, а не за рН = 9, як це прийнято.
4. Дослідження хроматографічних властивостей амінобензофенонів гідазепаму в умовах загального ТШХ-скринінгу виявило близьку хроматографічну рухливість АББ та МББ до амінобензофенонів інших 1,4-бензодіазепінів, що ускладнює їх ідентифікацію методом ТШХ.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Жук О. В., Карпинчик В. А. Гидазепам – новый отечественный дневной транквилизатор // Провизор. – 2000. – № 17. – С. 33–35.
2. Андронати С. А., Воронина Т. А., Головенко Н. Я. и др. Гидазепам. – К.: Наук. думка, 1992. – С. 15–16, 21, 50–52, 70–75, 63–75, 120–131.
3. Савченко М. А., Петюнін Г. П. Дослідження поведінки гідазепаму та його метаболітів в умовах кислотного гідролізу // Буковинський мед. вісн. – 2013. – Т. XVII, № 3 (67), Ч. 1. – С. 143–148.
4. Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г., Андронати С. А. Масс-спектрометрический анализ производных 2-аминобензофенонов и их метаболитов // Биоорг. химия. – 1986. – № 6. – С. 88–91.
5. Барцев А. И., Воронова Н. В., Кошелев А. С. Изолирование и определение различных наркотических и лекарственных веществ после кислотного гидролиза биологического материала (сообщение 1) // Судебно-медицинская экспертиза. – 1998. – № 6. – С. 26–27.
6. Еремин С. К., Изотов Б. Н., Веселовская Н. В. Анализ наркотических средств. – М., 1993. – С. 47, 188–194.
7. Preston H. «Capillary flow technology for GC/MS: a simple tee configuration for analysis at trace concentrations with rapid backflushing for matrix elimination». Agilent Technologies publication 5989-8664EN.
8. Recommended Methods for the Detection and Assay of Benzodiazepines in Biological Specimens Manual for Use by National Laboratories: ST/NAR/27. – N.Y.: United Nations, 1997 – С. 78.
9. Schtitz H. Benzodiazepines II – a handbook. – Berlin, Heidelberg, New-York, London, Paris, Tokyo: Springer, 1988. – P. 47–48.
10. Thin-Layer Chromatographic Rf Values of Toxicologically Relevant Substances on Standardized Sysmtes; 2nd Ed. Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) Copyright 1992 VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim. – P. 306–308.
11. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material fourth edition. – P. 612–615.

Надійшла до редакції 01. 07. 2014.

М. А. Савченко¹, Г. П. Петюнін²

¹КУ «Черкасское областное бюро судебно-медицинской экспертизы»

²Харьковская медицинская академия последипломного образования

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСТРАКЦИОННЫХ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АМИНОБЕНЗОФЕНОНОВ ГИДАЗЕПАМА

Ключевые слова: гидазепам, аминбензофеноны, экстракция, тонкослойная хроматография

АННОТАЦИЯ

Обнаружение аминбензофенонов после гидролиза биологического материала представляет собой один из этапов скрининга как самой группы производных 1,4-бензодиазепина, так и общей схемы исследования на «неизвестный яд». Одним из факторов успешного обнаружения и идентификации является знание физико-химических свойств искоемых веществ.

Цель настоящей работы - изучить влияние природы экстрагента и кислотности среды на извлечение аминбензофенонов гидаземама из гидролизатов, а также выяснить их хроматографическое поведение в условиях тонкослойной хроматографии.

Объектами исследования были модельные растворы аминбензофенонов гидаземама в буферных растворах и гидролизате печени. Количественную оценку проводили методом газожидкостной хроматографии. Хроматографическое поведение изучалось в двадцати системах для тонкослойной хроматографии.

В результате исследования установлено, что на экстракцию наиболее характерного для гидаземама аминбензофенона значительно влияет рН среды, тогда как на извлечение остальных двух аминбензофенонов гидаземама рН практически не влияет. Изучение природы экстрагента показало возможность применения всех наиболее распространенных в лабораторной практике растворителей. Исключение составляют только неполярные гексан и гептан. Хроматографирование аминбензофенонов гидаземама в различных системах показало значительные различия между ними в хроматографической подвижности. Также обнаружено мешающее влияние на их идентификацию со стороны аминбензофенонов от других производных 1,4-бензодиазепина.

Установлено, что оптимальными условиями экстракции аминбензофенонов гидаземама являются: $\text{pH} \leq 5$, экстрагент *n*-хлорбутан (а также дихлорметан и хлороформ). В условиях классической схемы скрининга на производные 1,4-бензодиазепина методом тонкослойной хроматографии, могут возникнуть трудности в обнаружении и идентификации аминбензофенонов гидаземама.

*M. A. Savchenko*¹, *G. P. Petyunin*²

¹ *The Cherkassy regional bureau of a forensic medicine*

² *Kharkiv Medical Academy of Post-graduate Education*

INVESTIGATE OF EXTRACTIONS AND CHROMATOGRAPHYC CONDITIONS GYDAZEPAM'S AMINO BENZOPHENONES

Key words: gydazepam, aminobenzophenones, extraction, thin layer chromatography

A B S T R A C T

Detection aminobenzophenones, after hydrolysis of a biological tissue, represents one of stages of screening both the derivatives of 1,4-benzodiazepine, and the research on «general unknown». One of factors of successful detection and identification is the knowledge of physical and chemical properties of required substances.

The purpose of this work, to study influence of the nature of extragent and enviroment acidity on extraction gydazepam's aminobenzophenones from hydrolysates and also to find out their chromatographic behaviour in the conditions of thin-layer chromatography.

Model solutions gydazepam's aminobenzophenones in buffer solutions and liver hydrolysate were objects of research. A quantitative assessment made a gas-liquid chromatography method. The chromatographic behaviour was studied in twenty systems for thin-layer chromatography.

In findings of investigation it is discovered that extraction of the most typical aminobenzophenone of gydazepam, considerably influences pH, whereas extraction of other two gydazepam's aminobenzophenones, pH practically does not influence. Studying of the nature of extragent has shown possibility of application of all most widespread solvents in laboratory practice. The exception is only by non-polar hexane and heptane. Chromatographic fractionation gydazepam's aminobenzophenones in various systems has shown significant distinctions between them in chromatographic mobility. Also discovered that on their identification influence aminobenzophenones from other derivatives 1,4-benzodiazepine.

It is discovered that optimal conditions of extraction gydazepam's aminobenzophenones are $\text{pH} \leq 5$, extragent n-chlorbutan (and also dichloromethane and chloroform). In the conditions of the classical schema of screening derivatives 1.4-benzodiazepine, difficulties in detection and identification gydazepam's aminobenzophenones can arise a thin-layer chromatography method.

Електронна адреса для листування з авторами: taxalchemist@yandex.ua