

Карташов Владимир Антонович, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармации Майкопского государственного технологического университета, т.: 8(8772)521979, e-mail: kartashov_v@mail.ru;

Чернова Лариса Владимировна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармации Майкопского государственного технологического университета, т.: 8(8772)521994, e-mail: farmmgtu@mail.ru;

Величко Галина Павловна, преподаватель кафедры фармация Майкопского государственного технологического университета, т.: 8(8772)521994, e-mail: velicgalina2008@yandex.ru.

ТСХ-СКРИНИНГ И ИНДЕКСЫ УДЕРЖИВАНИЯ ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ (рецензирована)

Приведены результаты исследования токсических органических веществ основного характера методом тонкослойной хроматографии в скрининговом варианте. Для дополнительной идентификации впервые предложено использовать индексы удерживания анализируемых веществ.

Ключевые слова: токсические вещества, тонкослойная хроматография, ТСХ-скрининг, хроматографические группы, индексы удерживания.

Kartashov Vladimir Antonovich, Doctor of Pharmacy, professor of the Department of Pharmacy, Maikop State Technological University, tel: 88772521979, e-mail: kartashov_v@mail.ru;

Chernova Larisa Vladimirovna, Candidate of Pharmacy, associate professor of the department of Pharmacy, Maikop State Technological University, tel: 88772521994, e-mail: farmmgtu@mail.ru.

Velichko Galina Pavlovna, lecturer of the Department of Pharmacy, Maikop State Technological University, tel: 88772521994, e-mail: velicgalina2008@yandex.ru;

TLC SCREENING AND TOXIC SUBSTANCES RETENTION INDICES (reviewed)

The results of the study of toxic organic substances by thin layer chromatography in the screening version have been presented. Usage of the retention indices of analytes for further identification has been suggested for the first time.

Key words: toxic substances, thin-layer chromatography, TLC screening, chromatography groups, retention indices.

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 10x15 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 параами 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 флюоресценции 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 препаративной 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).

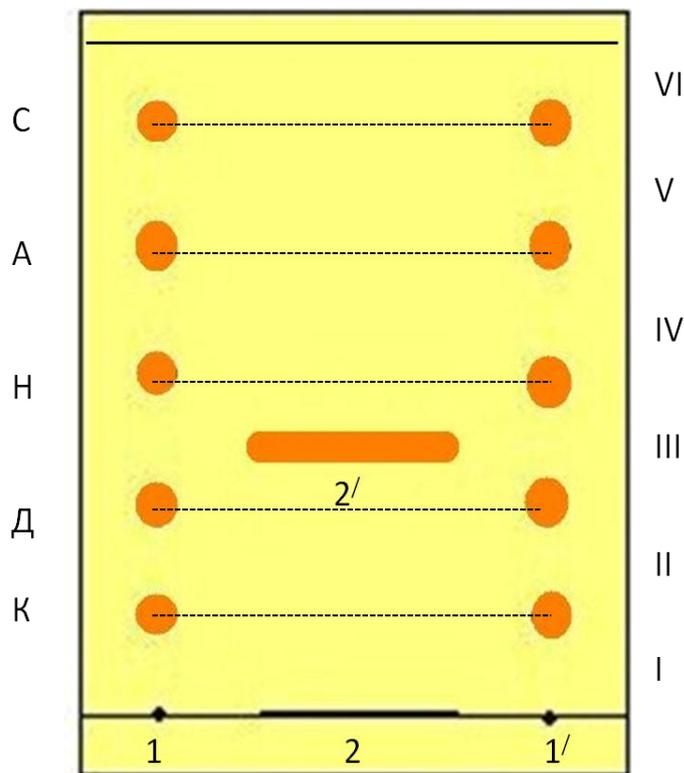


Рис. 1. Хроматограмма при исследовании токсических веществ основного характера методом ТСХ-скрининга: 1 и 1' – точки нанесения смеси стандартных веществ, 2 и 2' – стартовая и обнаруженная полосы вещества, К, Д, Н, А, С – кодеин, дикаин, новокаин, амидопирин, сибазон, I, II, III, IV, V, VI – хроматографические группы

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.

Предварительно исследуемые вещества основного характера были проанализированы методом ТСХ-скрининга и разделены на шесть хроматографических групп (табл. 1).

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 (табл. 2).

Таблица 1 - Распределение токсических веществ основного характера по хроматографическим группам

№ хромат. группы	Токсические вещества		
1	2		
I	Бензогексоний Прозерин Карбахолин Кониин Гоматропин Атропин Пахикарпин Тропацин Азеластин	Хингамин Стрихнин Платифиллин Бруцин Азафен Мажептил Метеразин Анабазин Фенспирид	Морфин Хинидин Хинин Гидрокодон Этаперазин Карбидин Диметинден Цетиридин
II	Кодеин Трифтазин Новокаинамид Галидор Пропазин Этилморфин Супрастин Хлоропирамин	Анаприлин Мелипрамин Тиоридазин Амитриптилин Димедрол Аймалин Пилокарпин	Аминазин Никотин Дипразин Промедол Стугерон Оланзапин Ципрогептадин
III	Дикаин Неулептил Хлорпротиксен	Хлорацизин Физостигмин Скополамин	Совкаин
IV	Новокаин Тизерцин Галоперидол Фторацизин Мебикар Изоптин Антипирин	Дротаверин Текодин Вератрин Динезин Центедрин Антипирин Триседил	Аконитин Хлозепид Кокаин Апрофен Френолон Кордиамин
V	Амидопирин Финлепсин Курантил Оксазепам Папаверин Этмозин Протионамид	Этионамид Дибазол Коразол Мезапам Феназепам Нитразепам Стугерон	Ультракаин Лидокаин Лоратадин Анестезин Золпидем Залеплон
VI	(Лоратадин) Сибазон	Резерпин Фепранон	Эфедрин Мидокалм

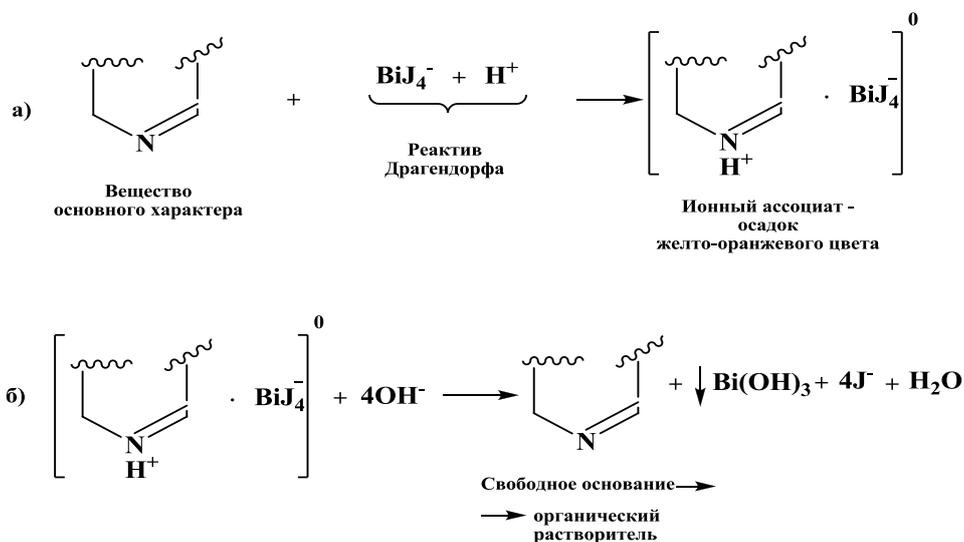


Таблица 2 - Токсические вещества первой и второй подгрупп первой хроматографической группы

№ подгруппы	Токсические вещества		
I	Бензогексоний Карбахолин Прозерин Гоматропин	Атропин Бруцин Морфин Платифиллин	Тропацин Пахикарпин Стрихнин
II	Гидрокодон Кониин Анабазин Карбидин	Хингамин Хинин Хинидин Мажептил	Метеразин Кодеин

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. В этом случае хроматограмма имеет вид, изображенный на рис. 2.

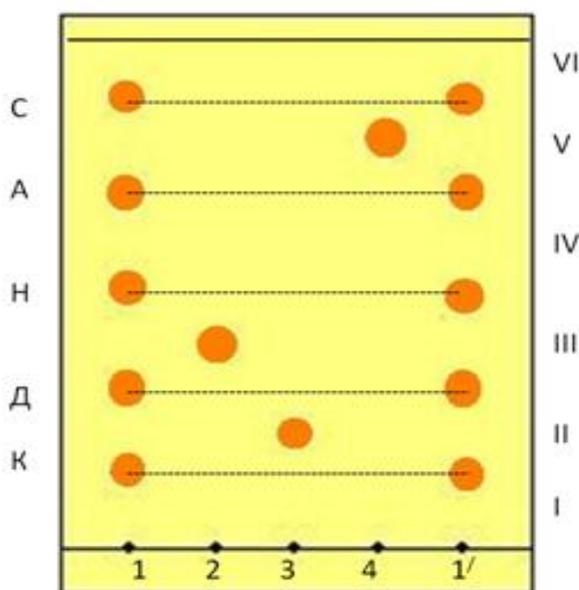
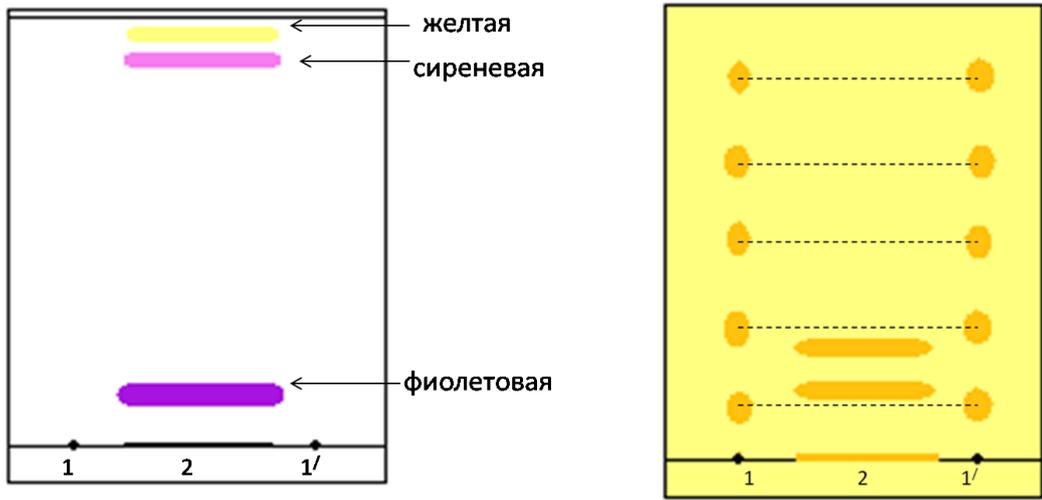


Рис. 2. Хроматограмма, полученная при ТСХ-скрининге веществ основного характера (для обнаружения):

1, 1' - точки нанесения смеси стандартных веществ;
2, 3, 4 - точки нанесения исследуемых веществ

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 amitриптилина. 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. 3 а, б).

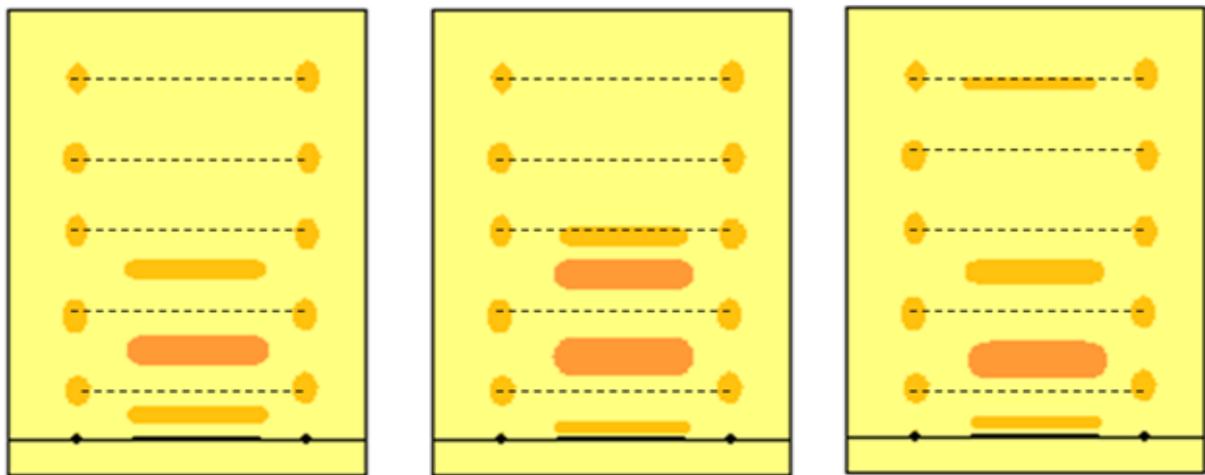
При использовании ТСХ-скрининга в экспертных случаях нам удалось предварительно обнаружить вещества при отравлениях людей неизвестными психотропными препаратами. На рис. 4 приведены хроматограммы, полученные при исследовании печени трупов людей в случаях отравлений аминазином (а), amitриптилином (в) и комбинированного отравления аминазином и хлопратиксеном (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.



а)

б)

Рис. 3. ТСХ-скрининг при комбинированном отравлении амитриптилином и мелипрамином: а - при облучении УФ-светом; б – после обработки реактивом Драгендорфа



а

б

в

Рис. 4. ТСХ-хроматограммы, полученные в экспертных случаях при отравлениях амиазином (а), амиазином и хлорпротиксеном (б), амитриптилином (в)

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.

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. 5 а, б).

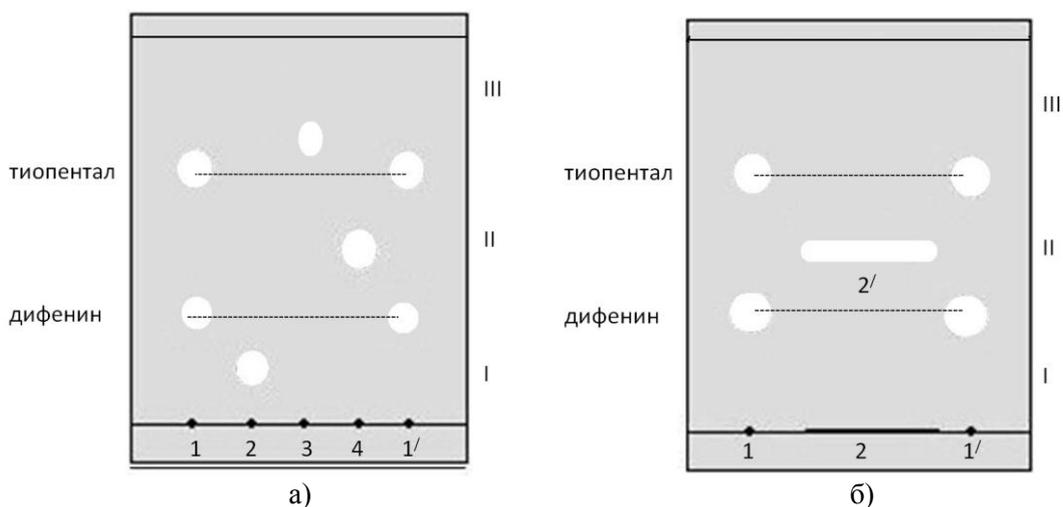


Рис. 5. Хроматограммы, полученные при ТСХ-скрининге веществ кислотного характера: а – для идентификации, б – для элюирования

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

Таблица 3 - Распределение веществ кислотного характера по хроматографическим группам

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

$$I_x = l_x - l_N / l_{N+1} - l_{N+1} N,$$

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

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

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

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

В качестве примера приводим рассчитанные нами индексы удерживания некоторых токсических веществ основного характера (табл. 4). Как видно из таблицы, анализируемые вещества, относящиеся к одной и той же группе, имеют разные величины индексов удерживания, например, фенспирид, азеластан, диметинден (I хроматографическая группа), оланзапин, ципрогептадин, димедрол (II группа), ультракаин, 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.

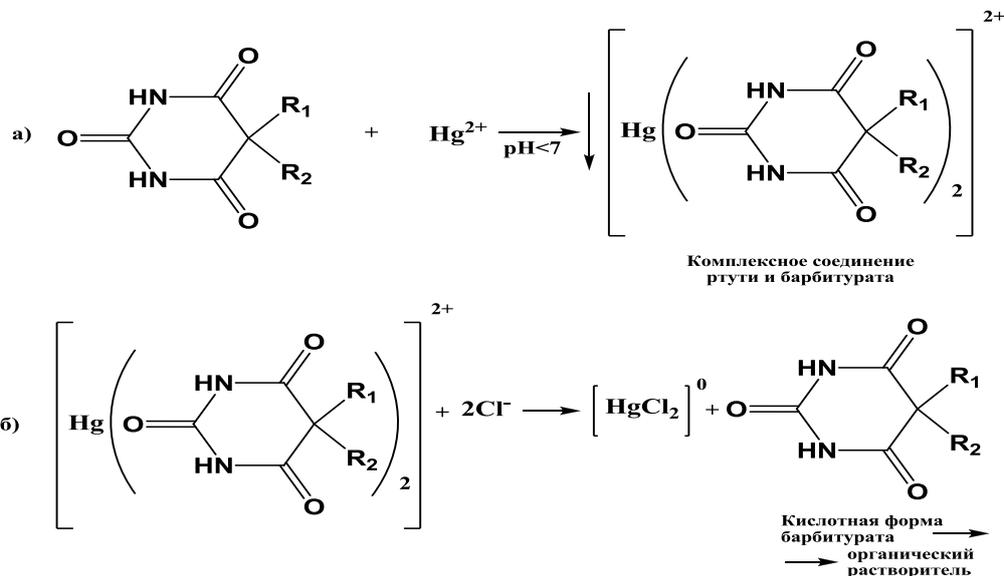


Таблица 4 - Индексы удерживания некоторых токсических веществ

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
Зопиклон	3,04±0,076	Кветиапин	3,89±0,17
Ультракаин	5,30±0,04	Анестезин	4,08±0,06
Золпидем	5,43±0,06		5,97±0,03
Залеплон	5,78±0,06		
Лидокаин	5,67±0,03		
Лоратадин	6,04±0,04		

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

Литература:

1. Зимнухов В.В. Модификация ТСХ-скрининга лекарственных третичных азотсодержащих оснований / Зимнухов В.В., Удалов А.В. // Проблемы судебной медицины, экспертизы и права: сб. - 2000.- Вып. 1. - С. 57-59.
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, Л.В. Капилевича. – 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. // Судебно-мед. экспертиза. - 1982. - №3. - С. 39-41.
4. Карташов В.А. Изучение вопросов экстракции лекарственных веществ из биологического материала: дис. ... д-ра фармацевт. наук / В.А. Карташов. - Барнаул, 1990. - 361 с.
5. Удалов А.В. Хроматографическая идентификация и определение малолетучих органических веществ в судебно-химическом анализе: автореф. дис. ... канд. хим. наук / А.В. Удалов. - Краснодар, 1999. - 16 с.
6. Чернова Л.В. Изолирование, обнаружение и определение хлорпротиксена, аминазина, амитриптилина и мелипрамина при исследовании биологического материала: дис. ... канд. фармацевт. наук. - Барнаул, 1990. - 219 с.

References:

1. Zimukhov V.V. Modification of the TLC-screening of drug tertiary nitrogen bases / Zimukhov V.V., Udalov A.V. // Problems of forensic medicine, expertise and law.- 2000. - Vol. 1. - P. 57-59

2. Kazartsev I.A. *Modification of the method of TLC screening of toxic and potent nitrogen-containing organic bases* / Kazartsev I.A. // *Sciences about Man: Proceedings of VI Congress of Young Scientists and Specialists* / L.M. Ogorodova, L.V. Kapilevich. - Tomsk: SSMU, 2005. - 120 p.

3. Kartashov V.A. *Option of TLC screening of toxic and potent nitrogen-containing organic bases* / Kartashov V.A., Ovsyannikova V.M., Kudrikova L.E. // *Forensic expertise* - 1982. - № 3. - P. 39-41

4. Kartashov V.A. *Learning about the extraction of drugs from biological material: diss ... Dr. Pharmacy* / Kartashov V.A. - Barnaul, 1990. - 361 p.

5. Udalov A.V. *Chromatographic identification and determination of non-volatile organic substances in forensic chemical analysis: abstract of diss. ... Cand. Chemistry* / Udalov A.V. - Krasnodar, 1999. - 16 p.

6. Chernova L.V. *Isolation, detection and identification of chlorprothixene, aminazine, amitriptyline and imipramine in the study of biological material: diss. ... Cand. Pharmacy* / Chernova L.V. - Barnaul, 1990. - 219 p.