

В.А. Тютрина¹, Н.В. Чмелевская², Е.А. Илларионова¹

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИЗОЛИРОВАНИЯ ОФЛОКСАЦИНА В МОДЕЛЬНОЙ СМЕСИ МОЧИ

¹Иркутский государственный медицинский университет,
664003, ул. Красного Восстания, 1, тел. 8-(3952)-24-38-25;

²ГБУЗ «Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы»,
664022, бул. Гагарина, 6, тел. 8-(3952)-28-09-48, г. Иркутск

Резюме

Исследования проводились с водными растворами и модельными смесями мочи, изучалось влияние pH среды и природы растворителя, наличия электролита, времени и кратности экстракции на эффективность экстракции анализируемого вещества. Установлено, что оптимальными органическими растворителями являются хлороформ и дихлорметан при pH 6,0. Высаливающим действием для офлоксацина обладает аммония сульфата раствор насыщенный. Максимальное изолирование наблюдается при двукратном экстрагировании в случае изолирования хлороформом и трехкратном экстрагировании при изолировании дихлорметаном в течение 3 минут. Установлено, что из модельной смеси мочи извлекается от 46,99 до 74,10 % офлоксацина при изолировании хлороформом и от 45,64 до 80,2 % при изолировании дихлорметаном.

Ключевые слова: химико-токсикологический анализ, изолирование, офлоксацин.

V.A. Tyutrina¹, N.V. Chmelevskaya², E.A. Illarionova¹

DEVELOPMENT OF METHODS OF ISOLATING OFLOXACIN IN MODEL MIXTURES OF URINE

¹Irkutsk State Medical University;

²Irkutsk regional forensic medicine expertise agency, Irkutsk

Summary

The effect of the nature of the organic solvent, the pH of the medium, the presence of electrolyte, time and multiplicity of the extraction on the isolation process of ofloxacin from the model urine mixture was studied. It was found out that the optimal organic solvents are chloroform and dichloromethane at pH 6,0. Saturated solution of Ammonium sulfate has salt-ing out action for ofloxacin. Maximum isolation is observed with double extraction with isolation by chloroform and triple extraction with dichloromethane for 3 minutes. It is revealed that from the model mixture of urine it is possible to isolate from 46,99 to 74,10 % of ofloxacin isolated by chloroform, and from 45,64 to 80,2 % isolated with dichloromethane.

Key words: chemical-toxicological analysis, isolation, ofloxacin.

В современном химико-токсикологическом анализе предпочтение отдается процедурам пробоподготовки, которые позволяют извлекать токсикологически значимые вещества и их метаболиты, используя при этом наименьшее количество опасных для здоровья растворителей, с максимальным выходом исследуемых веществ и минимальными затратами времени. В судебно-химическом анализе объектами исследования главным образом являются органы и биологические жидкости организма человека. Особое внимание при этом акцентируется на крови и моче [3]. В качестве биологического объекта в работе была выбрана моча по следующим причинам: большинство веществ экскретируется из организма с мочой, в связи с этим концентрация токси-кантов и (или) метаболитов, как правило, высока; может быть получена в достаточном количестве; низкое содержание белков; анализ мочи можно проводить и при освидетельствовании живых лиц [2].

Объектом настоящего исследования является офлоксацин – лекарственное средство группы фторхинолонов II поколения, применяемое в медицинской практике в качестве антибактериального препарата. Встречаются случаи отравления больных офлоксацином при использовании его как самостоятельно, так и в комплексной терапии с психотропными лекарственными средствами. Так как для диагностики интоксикации этим лекарственным средством большое значение имеют результаты химико-токсикологического исследования, а в литературе отсутствуют сведения о химико-токсикологическом исследовании офлоксацина, для проведения химико-токсикологического анализа офлоксацина необходимо разработать методику изолирования данного вещества из водных растворов и биологических объектов.

Цель работы – разработка методики изолирования офлоксацина в модельной смеси мочи.

Материалы и методы

В работе использовали таблетки «Офлоксацин» производство ООО «Озон» (Россия), субстанцию офлоксацина. Для измерения оптической плотности растворов использовали спектрофотометр СФ-2000; измерение проводили в кюветах с толщиной слоя 1 см

на фоне растворителя. Величину pH контролировали с помощью универсального ионметра ЭВ – 74. В качестве растворителей использовали 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты, раствор аммиака 25 %, хлороформ, дихлорметан, этилацетат, диэтиловый

эфир, толуол, бензол. При статистической обработке результатов анализа использовали методы Стьюдента

и Фишера [1]. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез $p=0,05$.

Результаты и обсуждение

Жидкость-жидкостная экстракция является эффективным и распространенным методом изолирования в химико-токсикологическом анализе. На извлечение веществ органическими растворителями оказывают влияние различные факторы (природа экстрагируемого вещества, природа экстрагента, pH среды, добавление электролита, время и кратность изолирования, температура, скорость взбалтывания и др.) [4]. В ходе работы было изучено влияние природы органического растворителя, pH среды, наличия электролита, времени и кратности экстракции на изолирование офлоксацина из водных растворов.

По химическому строению офлоксацин является веществом основного характера, так как содержит в своей структуре атомы азота, обладающие основными свойствами, характеризуется гидрофобностью из-за наличия в структуре атомов фтора, циклов и других гидрофобных фрагментов.

Для определения степени экстракции офлоксацина использовали спектрофотометрический метод. Аналитическая длина волны офлоксацина в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты соответствует 293 нм. В качестве рабочего образца сравнения использовалась субстанция офлоксацина.

В качестве растворителя для спектрофотометрического определения офлоксацина был выбран 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты (pH 1,1), так как офлоксацин хорошо растворяется в данном растворителе, кроме того, 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты обеспечивает стабильность испытуемого раствора. При выборе оптимального растворителя для экстракции необходимо определить растворимость офлоксацина в органических растворителях. В хлороформе, дихлорметане, этилацетате, диэтиловом эфире, толуоле, бензоле растворимость извлекаемого вещества значительно выше, чем в исходном растворе, поэтому они были предложены для изучения процесса экстракции.

Экстрагируемость органических веществ зависит от ряда факторов, в том числе и от pH среды. После получения сухого остатка он был растворен в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты, после чего спектрофотометрическим методом определялась степень экстракции офлоксацина при варьировании pH от 2 до 12, добавляя 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты или раствор аммиака 25 %. Результаты экспериментальных исследований в виде диаграммы представлены на рисунке 1.

Определено, что оптимальными органическими растворителями для экстракции офлоксацина из растворов являются хлороформ и дихлорметан, которые экстрагируют исследуемое вещество при pH 6 в максимальном количестве.

Прибавление хорошо растворимых солей к водному раствору другого вещества может уменьшать или увеличивать его растворимость в воде. Высаливание является фактором, понижающим растворимость веществ в воде и повышающим их экстрагируемость

органическими растворителями из водных растворов. Можно предположить, что при добавлении электролита степень экстракции офлоксацина органическим растворителем будет увеличиваться. Установлено, что офлоксацин в щелочной среде является неустойчивым и разрушается. На данном этапе было изучено влияние раствора натрия хлорида 20 %, натрия хлорида насыщенного, натрия сульфата 5 %, натрия сульфата насыщенного, аммония сульфата 20 %, аммония сульфата насыщенного на экстракцию офлоксацина из растворов (табл. 1, 2).

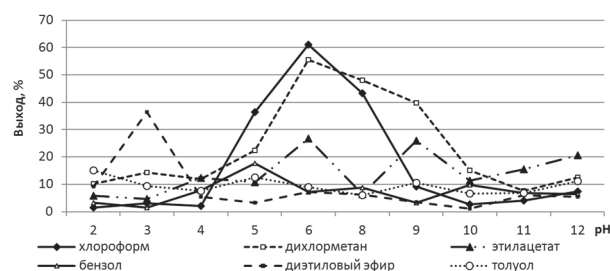


Рис. 1. Зависимость степени извлечения офлоксацина от pH среды и природы органического растворителя

Таблица 1

Выход офлоксацина в присутствии различных электролитов при экстракции хлороформом

Электролит	Оптическая плотность	Выход (%)
NaCl 20 %	0,2826	62,21
NaCl насыщ	0,2614	57,55
Na ₂ SO ₄ 5 %	0,2765	60,87
Na ₂ SO ₄ насыщ	0,2964	65,51
(NH ₄) ₂ SO ₄ 20 %	0,3129	69,16
(NH ₄) ₂ SO ₄ насыщ	0,3328	73,56

Таблица 2

Выход офлоксацина в присутствии различных электролитов при экстракции дихлорметаном

Электролит	Оптическая плотность	Выход (%)
NaCl 20 %	0,2521	53,90
NaCl насыщ.	0,2932	62,68
Na ₂ SO ₄ 5 %	0,2985	63,82
Na ₂ SO ₄ насыщ.	0,3165	67,66
(NH ₄) ₂ SO ₄ 20 %	0,3599	76,85
(NH ₄) ₂ SO ₄ насыщ.	0,3671	78,39

Изучение влияния электролита на степень экстракции офлоксацина показало, что аммония сульфата раствор насыщенный обладает высаливающим действием для офлоксацина. Всаливающим действием для офлоксацина обладает натрия хлорида раствор насыщенный в случае экстракции хлороформом и 20 % в случае экстракции дихлорметаном.

Дальнейшим этапом экспериментальных исследований являлось исследование влияния времени экстрагирования и кратности на степень экстракции офлоксацина (табл. 3, 4, 5, 6).

Таблица 3

Определение степени извлечения офлоксацина в зависимости от времени экстракции хлороформом

Время, мин.	Степень извлечения, %
3	73,56
5	66,15
7	73,09

Таблица 4

Определение степени извлечения офлоксацина в зависимости от кратности экстракции хлороформом в течение трех минут

Кратность	Степень извлечения, %
Однократная	73,09
Двукратная	96,55
Трехкратная	82,21

Таблица 5

Определение степени извлечения офлоксацина в зависимости от времени экстракции дихлорметаном

Время, мин.	Степень извлечения, %
3	78,39
5	63,50
7	72,69

Таблица 6

Определение степени извлечения офлоксацина в зависимости от кратности экстракции дихлорметаном в течение трех минут

Кратность	Степень извлечения, %
Однократная	78,39
Двукратная	84,01
Трехкратная	89,63

Изучение влияния времени экстрагирования и кратности на степень экстракции офлоксацина показали, что наибольший выход офлоксацина (%) достигается при двукратном экстрагировании хлороформом и трехкратном экстрагировании дихлорметаном в течение трех минут.

На основании выше представленных исследований была разработана методика изолирования офлоксацина из модельной смеси мочи.

Методика изолирования офлоксацина из модельной смеси мочи: в колбу вместимостью 100 мл вносят 25 мл мочи, содержащей раствор таблеток «Офлоксацин» в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты, настаивают в течение 24 часов при комнатной температуре и периодическом перемешивании на Шейкер S-3.08L (фирмы ELMi). 1 мл модельной смеси мочи помещают в коническую колбу объемом 25 мл, добавляют 25 % раствор аммиака до pH=6, раствор аммония сульфата насыщенного 1 мл и хлороформ/дихлорметан 3 мл. Содержимое колбы взбалтывают в течение 3 минут и помещают в делительную воронку. Слой органического растворителя отделяют после разделения фаз. Экстрагируют повторно 3 мл хлороформа, и дважды 3 мл в случае экстрагирования дихлорметаном, извлечения объединяют. Растворители удаляют при комнатной температуре. Сухой остаток, полученный после испарения экстрагента, растворяют

в 10 мл 0,1 М хлористоводородной кислоты и доводят до 25 мл в мерной колбе вместимостью 25 мл. 1 мл приготовленного раствора доводят до объема 100 мл 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты. Измерение оптической плотности приготовленного раствора проводят на спектрофотометре при длине волны 293 нм. В качестве раствора сравнения используют 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора рабочего стандартного образца офлоксацина.

Методика приготовления рабочего стандартного образца офлоксацина: 0,0500 г (точная навеска) субстанции офлоксацина растворяют в 20 мл 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствора этим растворителем до метки. 1 мл приготовленного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора до метки 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты.

Результаты определения степени извлечения офлоксацина из модельной смеси мочи представлены в таблице 7 и 8.

Таблица 7

Определение степени извлечения офлоксацина хлороформом из модельной смеси мочи

Внесено, г	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики
0,2	73,94; 73,98; 73,81; 74,02; 74,10; 73,97	$\bar{x} = 73,97 \%$ $S\bar{x} = 0,2349$ $\Delta X = 0,6038$ $\epsilon = 0,82 \%$
1,0	57,72; 57,76; 57,84; 57,68; 57,88; 57,77	$\bar{x} = 57,78 \%$ $S\bar{x} = 0,1818$ $\Delta X = 0,4673$ $\epsilon = 0,81 \%$
2,0	47,11; 47,03; 47,13; 47,15; 46,99; 47,06	$\bar{x} = 47,08 \%$ $S\bar{x} = 0,1521$ $\Delta X = 0,3909$ $\epsilon = 0,83 \%$

Таблица 8

Определение степени извлечения офлоксацина дихлорметаном из модельной смеси мочи

Внесено, г	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики
0,2	79,99; 80,20; 80,13; 80,00; 80,16; 79,89	$\bar{x} = 80,06 \%$ $S\bar{x} = 0,2937$ $\Delta X = 0,7548$ $\epsilon = 0,94 \%$
1,0	60,76; 60,83; 60,73; 60,64; 60,89; 60,71	$\bar{x} = 60,76 \%$ $S\bar{x} = 0,2180$ $\Delta X = 0,5602$ $\epsilon = 0,92 \%$
2,0	45,71; 45,75; 45,68; 45,64; 45,81; 45,78	$\bar{x} = 45,73 \%$ $S\bar{x} = 0,1560$ $\Delta X = 0,401$ $\epsilon = 0,88 \%$

Полученные данные свидетельствуют о том, что в извлечении из модельной смеси мочи обнаруживается от 46,99 до 74,10 % офлоксацина при изолировании хлороформом и от 45,64 до 80,2 % при изолировании дихлорметаном. Кроме того, была проведена валидационная оценка методики по показателям прецизионности и правильности, что показало пригодность разработанной методики для анализа.

Основываясь на полученных исследованиях, можно сделать вывод, что разработанная методика позволяет проводить экстракцию офлоксацина из модельной смеси мочи и может быть рекомендована для химикотоксикологического анализа исследуемого лекарственного препарата.

Литература

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. – 13-е изд. – М., 2015. – Т. 1. – 1470 с.
2. Кормишин В.А. Денситометрическое определение некоторых наркотических средств и психотропных веществ в химико-токсикологических исследованиях: дис. ... канд. фарм. наук. – Самара, 2014. – 145 с.
3. Стрельникова Е.С. К вопросу о проведении скрининга наркотических и сильнодействующих веществ // Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики: сборник научно-практических работ. – Новосибирск: STT, 2014. – Вып. 20. – С. 262-267.
4. <http://www.xumuk.ru/toxicchem/34.html>.

Literature

1. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. – 13-th Edition. – M., 2015. – Vol. 1. – 1470 p.
2. Kormishin V.A. Densitometric determination of some narcotic drugs and psychotropic substances in chemical and toxicological studies: Thesis ... of a Candidate of pharm. sciences. – Samara, 2014. – 145 p.
3. Strelnikova E.S. On the issue of screening of narcotic and potent substances // Actual issues of forensic medicine and expert practice: a collection of scientific and practical works. – Novosibirsk: STT, 2014. – Issue 20. – P. 262-267.
4. Electronic source: <http://www.xumuk.ru/toxicchem/34.html>.

Координаты для связи с авторами: Тютрина Вера Александровна – соискатель кафедры фармацевтической и токсикологической химии ИрГМУ, тел. +7-914-876-09-23, e-mail: Illelena24@rambler.ru; Чмелевская Наталья Владимировна – канд. фарм. наук, зав. судебно-химическим отделением ГБУЗ «Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы», тел. 8-(3952)-22-93-90, e-mail: Illelena24@rambler.ru; Илларионова Елена Анатольевна – д-р хим. наук, профессор, зав. кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ИрГМУ, тел. +7-914-876-09-23, e-mail: Illelena24@rambler.ru.

