

УДК 615.099.07:543.862/.862.34

ОПРЕДЕЛЕНИЕ 2-АЦЕТИЛОКСИБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ В ПЛАЗМЕ КРОВИ

© Шорманов В.К.¹, Чупак В.В.², Салыкина Е.О.¹

¹ Кафедра фармацевтической, токсикологической и аналитической химии
Курского государственного медицинского университета, Курск;

² кафедра фармакологии, клинической фармакологии и фармации
Орловского государственного университета, Орёл

E-mail: R-WLADIMIR@yandex.ru

Изучены особенности определения 2-ацетилоксибензойной кислоты в плазме крови. В качестве изолирующего агента для извлечения 2-ацетилоксибензойной кислоты из биологического материала предложен ацетон. Показана возможность очистки анализируемого соединения от эндогенных веществ биоматериала адсорбционной хроматографией в колонке силикагеля L 40/100 мкм с использованием подвижной фазы гексан-диэтиловый эфир (5:5). Для идентификации и количественного определения 2-ацетилоксибензойной кислоты в извлечениях из биоматериала предложены хроматография в тонком слое силикагеля, УФ- и ИК-спектрофотометрия, а также метод ГЖХ в сочетании с масс-селективным детектированием. Разработана методика химико-токсикологического исследования 2-ацетилоксибензойной кислоты в плазме крови, позволяющая определять $88,19-89,23 \pm 2,29-3,56\%$ данного соединения при его содержании 2,5-50,0 мг в 25 г биожидкости.

Ключевые слова: 2-ацетилоксибензойная кислота, изолирование, очистка, идентификация и определение.

IDENTIFICATION OF 2-ACETYLOXYBENZOIC ACID IN BLOOD PLASMA

Shormanov V.V.¹, Chupak V.V.², Salykina E.O.¹

¹ Department of Pharmaceutical, Toxicological and Analytical Chemistry of Kursk State Medical University, Kursk;

² Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Pharmacy of Orel State University, Orel

The features of the 2-acetylhydroxybenzoic acid identification in blood plasma have been studied. An acetone has been suggested as an isolating agent for extraction of 2-acetylhydroxybenzoic acid from biological material. The possibility of purifying the analyte from endogenous substances by the adsorptive chromatography in a silica gel "L 40/100 microns" column using a mobile phase of hexane and diethyl ether (5:5) has been shown. To identify and quantify 2-acetylhydroxybenzoic acid in extractions from biomaterials we have suggested the methods of thin-layer chromatography of silica gel, ultraviolet and infrared spectrophotometry and GLC combined with mass selective detection. The technique of chemical and toxicological studies of 2-acetylhydroxybenzoic acid in blood plasma, which allows to identify $88.19-89.23 \pm 2.29-3.56\%$ of the compound with its proportion of 2.5-50.0 mg in 25g biofluid, has been developed.

Keywords: 2-acetylhydroxybenzoic acid, isolation, purification, identification and determination.

2-Ацетилоксибензойная кислота (ацетилсалициловая кислота) (в дальнейшем 2-АОБК) – вещество, широко применяющееся в качестве противовоспалительного, жаропонижающего, болеутоляющего и антиагрегационного средства в медицинской практике [1, 6, 7].

2-АОБК – это белый мелкокристаллический порошок или бесцветные игольчатые кристаллы или листочки, кисловатые на вкус, плавящиеся при $136,5^\circ\text{C}$ (по другим данным – при $133-138^\circ\text{C}$ или при $135-137^\circ\text{C}$). При 20°C растворимость 2-АОБК составляет (г/100 г): 20 в этаноле, 5,9 в хлороформе, 3,57 в диэтиловом эфире, 0,25 в воде. В кипящей воде растворимость данного соединения заметно возрастает. 2-АОБК также растворима в концентрированном растворе ацетата аммония [2, 3, 4].

2-АОБК обладает достаточной токсичностью для теплокровных организмов. ЛД₅₀ данного соединения при внутрижелудочном введении крысам составляет 200 мг/кг, мышам – 250 мг/кг.

Известны многочисленные случаи отравления людей 2-АОБК различной степени тяжести. Летальная доза для взрослых – 30-40 г [8, 9].

Применение 2-АОБК в лечебной практике и наличие случаев летального отравления делают её важным объектом химико-токсикологического исследования. Вместе с тем отдельные аспекты судебно-химического анализа данного вещества остаются недостаточно разработанными. Это касается, в частности, особенностей изолирования, очистки и определения 2-АОБК в биологических жидкостях.

Целью настоящего исследования явилась разработка методики определения 2-АОБК в плазме крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования – 2-ацетилоксибензойная кислота (2-АОБК) (ОФС

42-0220-07) с содержанием основного вещества $\geq 99,5\%$.

Предварительные исследования на модельных смесях с тканью трупной печени показали, что для изолирования 2-АОБК из биоматериала целесообразно использование настаивания с ацетоном, позволяющим достичь высокой степени извлечения рассматриваемого соединения.

В дальнейшем рассмотрена возможность применения ацетона в качестве изолирующего агента (экстрагента) для извлечения 2-АОБК из плазмы крови. Эксперименты проводили на модельных смесях 2-АОБК с плазмой крови человека, которые выдерживали 1,5 часа при температуре 18-20°C в темном месте. Исследовали зависимость степени извлечения анализируемого вещества из биожидкости ацетоном от кратности настаивания, ее продолжительности, количественного соотношения изолирующего агента и биологического материала по ранее описанной методике [5].

В каждом случае часть извлечения подвергали хроматографированию на пластинках «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ (подвижная фаза - гексан-диэтиловый эфир (3:7)). Хроматограммы детектировали в УФ-свете. Анализируемое вещество идентифицировали по величине R_f , совпадающей с таковой вещества-свидетеля, и элюировали из сорбента 95% этанолом. По величине оптической плотности элюата определяли количественное содержание 2-АОБК, используя уравнение градуировочного графика.

В качестве предполагаемого метода очистки 2-АОБК, выделенной из биологического материала, рассматривали адсорбционную колоночную хроматографию низкого давления. С этой целью предварительно изучали хроматографическое поведение анализируемого вещества в колонке силикагеля L 40/100 мкм при использовании мало- и среднеполярных элюентов. При этом в каждом случае остаток, получаемый после испарения изолирующего агента из объединенного извлечения, растворяли в 3 мл ацетона, смешивали раствор с 1,5 г силикагеля L 40/100 мкм и, после испарения растворителя, вносили смесь в стеклянную колонку размером 190×10 мм, заполненную 8,5 г силикагеля L 40/100 мкм. Элюаты собирали фракциями по 2 мл каждая.

Обнаружение и идентификацию 2-АОБК во фракциях элюата осуществляли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ), используя пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ и подвижную фазу гексан-диэтиловый эфир (3:7). Объем каждой фракции, наносимый на пластину, – 5-10 мкл.

В найденных оптимальных условиях проводили контрольное хроматографирование на колонке извлечения из 25 г ткани печени. Фракции

элюата, в которых теоретически предполагалось присутствие 2-АОБК объединяли в отдельных выпарительных чашках, испаряли элюент и растворяли остаток в 10 мл ацетона. 2,5 мл полученного раствора вносили в выпарительную чашку и испаряли растворитель в токе воздуха. Остаток растворяли в 5 мл 95% этанола и измеряли оптическую плотность этанольного раствора при 278 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм на фоне 95% этанола (условия количественного определения 2-АОБК).

Для предварительной идентификации рассматриваемого соединения изучена возможность применения нормальнофазового варианта ТСХ. 2-АОБК хроматографировали вместе с близкими по структуре соединениями на пластинах «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ.

Для подтверждающей идентификации анализируемого вещества изучена возможность применения УФ- и ИК-спектрофотометрии, а также метода хромато-масс-спектрометрии (ГХ МС).

УФ-спектры снимали, используя прибор СФ-56 и кварцевые кюветы с длиной оптического пути 10 мм. Метод УФ-спектрофотометрии применяли также для количественного определения анализируемого соединения.

При применении метода ИК-спектрофотометрии анализируемые образцы запрессовывали в таблетки с бромидом калия и исследовали особенности их поглощения в интервале частот 4000—400 см^{-1} на приборе Nicolette Magna 750.

Идентификацию 2-АОБК методом ГХ МС осуществляли на газовом хроматографе Agilent Technologies 7890А с масс-селективным квадрупольным детектором модели 5975С, работающим в режиме электронного удара (70 эВ). Температура источника электронов составляла 230°C, масс-фильтра - 150°C. Сигналы регистрировали по полному ионному току (диапазон 45-550 m/z).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимальные условия изолирования 2-АОБК ацетоном достигались уже при двукратном настаивании, если количество изолирующего агента в два раза по массе превосходило количество биоматериала, а продолжительность каждого отдельного настаивания составляла как минимум 45 минут.

Установлено, что для хроматографирования 2-АОБК в колонке силикагеля L 40/100 мкм наиболее целесообразно использование элюента гексан-диэтиловый эфир (5:5). Анализируемое вещество обнаруживается при этом во фракциях с 8-й по 21-ю включительно (15-42 мл).

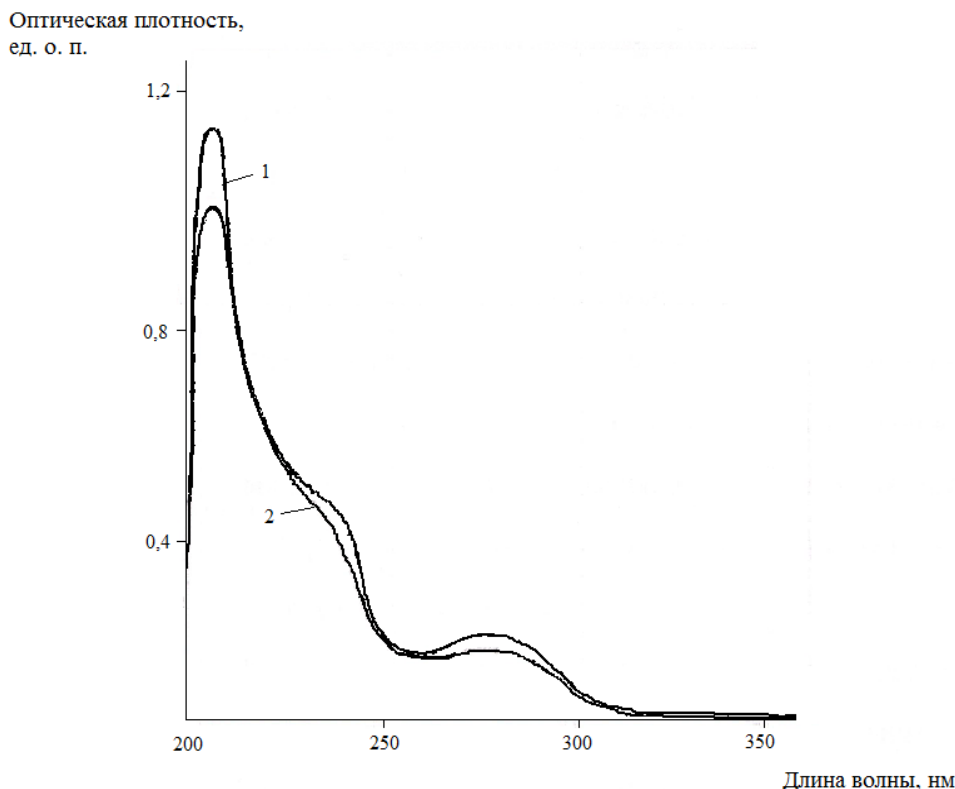


Рис. 1. УФ-спектры 2-ацетилоксибензойной кислоты в 95% этаноле: 1 – изолированной из плазмы крови; 2 – стандартного вещества (0,002 %).

В экспериментах с тканью печени, не содержащей 2-АОБК, установлено, что фоновое поглощение раствора $\frac{1}{4}$ сухого остатка фракций, в которых возможно присутствие анализируемого вещества, в 95% этаноле незначительно и не превышает 0,011 при 278 нм ($\lambda_{\text{макс}}$ для спектрофотометрического определения 2-АОБК).

Результаты изучения хроматографического поведения 2-АОБК в тонком слое нормальнофазового сорбента представлены в табл. 1.

Как видно из таблицы, оптимальными для хроматографирования данных веществ в тонких слоях силикагеля на пластинах «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ следует считать подвижные фазы гексан-этилацетат (4:6) и гексан-диэтиловый эфир (3:7).

Исследование особенностей поглощения 2-АОБК электромагнитного излучения в УФ-области спектра показало, что оптимальные условия определения могут быть достигнуты при использовании в качестве растворителя 95% этанола.

Спектральная кривая, характеризующая поглощение УФ-излучения этанольным раствором 2-АОБК, представлена на рисунке 1.

Как свидетельствуют полученные данные, а электронном спектре 2-АОБК в 95% этаноле присутствуют выраженные полосы поглощения с максимумами в областях 204 нм ($\epsilon = 37115$), 230 нм (скрытый) ($\epsilon \approx 14360$) и 278 нм ($\epsilon = 1745$).

Открываемый минимум 2-АОБК спектрофотометрическим методом - 2,5 мкг в 1 мл фотометрируемого раствора.

По величине оптической плотности этанольных растворов 2-АОБК, измеряемой при 278 нм, возможно проведение количественного определения данного вещества спектрофотометрическим методом. Градуировочный график в данном случае имеет вид: $A = 0,007750 \cdot C + 0,022432$, где A – оптическая плотность, C – содержание анализируемого вещества в фотометрируемом растворе (в мкг/мл). Коэффициент корреляции 0,996.

При исследовании ИК-спектра 2-АОБК показано присутствие в нем ряда характеристических полос, соответствующих определенным видам колебаний различных структурных фрагментов молекулы рассматриваемого вещества (табл. 2). Это обуславливает принципиальную возможность применения метода ИК-спектрофотометрии для идентификации 2-АОБК.

ИК-спектр вещества, изолированного из плазмы крови и очищенного на колонке с силикагелем L 40/100 мкм (табл. 2), практически полностью совпадал с таковым стандартного вещества. Это указывает на высокую степень очистки 2-АОБК методом колоночной хроматографии низкого давления и целесообразность применения ИК-спектрофотометрии для идентификации данного соединения в извлечениях из биоматериала.

Таблица 1

Результаты хроматографирования 2-ацетилоксибензойной кислоты (2-АОБК) и близких по структуре соединений в тонких слоях силикагеля СТХ-1А (пластины «Сорбфил») ПТСХ-АФ-В-УФ)

Подвижные фазы	2-АОБК		2-ГОБК		2,4-ДХФОУК	
	Rf	Rs	Rf	Rs	Rf	Rs
Диэтиловый эфир	0,87	1,74	0,57	1,14	0,50	1,00
Гексан-диэтиловый эфир (4:6)	0,45	1,73	0,28	1,08	0,26	1,00
Гексан-диэтиловый эфир (3:7)	0,53	1,50	0,33	0,87	0,38	1,00
Гексан-ацетон (7:3)	0,39	1,03	0,33	0,87	0,38	1,00
Гексан-этилацетат (4:6)	0,48	1,66	0,25	0,86	0,29	1,00

Примечание: 2-ГОБК – 2-гидроксибензойная кислота; 2,4-ДХФОУК – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (внутренний стандарт).

Таблица 2

Характеристика ИК-спектров 2-ацетилоксибензойной кислоты (2-АОБК), извлеченной из плазмы крови, и стандарта рассматриваемого вещества

Виды колебаний	Максимумы характеристических полос, см ⁻¹	
	2-АОБК, извлеченной из плазмы крови	стандарта 2-АОБК
Валентные С-Н симметрические –CH ₃	1870	2870
Валентные колебания С=О в алифатических (предельных) эфирах	1751	1751
Валентные ароматические С = С	1605, 1574, 1483, 1458	1605, 1574, 1482, 1458
Деформационные С-Н симметрические –CH ₃	1371	1370
Колебания с участием связи С – О в сложнэфирной группе ?	1307	1306
Плоскостные деформационные С-Н в ароматическом ядре (1,2-замещенных)	1095?, 1039, 1013, 969	1095?, 1039, 1013, 969
Внеплоскостные деформационные С-Н в ароматическом ядре (1,2-замещенных)	756	755

Определение 2-АОБК методом ГХ МС проводили в капиллярной кварцевой колонке HP-5MSD размерами 30 м×0,25 мм с толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм. Температура инжектора составляла 280°C, температура испарителя - 300°C. Введение пробы осуществляли в режиме без деления потока, объем вводимой пробы был равен 2 мкл. Начальная температура термостата колонки составляла 50°C, ее выдерживали 0,5 мин, после чего увеличивали со скоростью 99°C/мин до 100°C (выдержка 1 мин), а затем – со скоростью 35°C /мин до 300°C (конечная температура термостата). Время при конечной температуре – 23 мин. Подвижной фазой являлся гелий, скорость подвижной фазы - 1 мл/мин.

На хроматограммах присутствовал пик, соответствующий 2-АОБК (время удерживания 4,78 мин). В масс-спектре вещества с временем удерживания 4,78 мин обнаруживались сигналы ряда осколков с массами (m/z): 27 (7,1%), 31 (0,8%), 39 (14,7%), 43 (0,9%), 53 (3,0%), 65 (13,7%), 76 (0,7%), 81 (1,4%), 92 (40,1%), 109 (0,6%), 120 (100%), 138 (2,2%), 148 (0,1%),

166 (34,6%). Открываемый минимум – 2·10⁻⁹ г 2-АОБК в хроматографируемой пробе.

Методика определения 2-АОБК в плазме крови

Изолирование. 25 г плазмы крови, содержащей 2-АОБК (модельная смесь), настаивали в стеклянном химическом стаканчике вместимостью 100 мл дважды по полчаса с порциями ацетона массой 50 г каждая при перемешивании. Каждое извлечение отделяли от выпавшего осадка фильтрованием через бумажный фильтр. После фильтрования последнего извлечения стаканчик и осадок на фильтре промывали 20 мл ацетона. Фильтраты и промывную жидкость объединяли, растворитель из объединенного фильтрата испаряли при 18-22°C до получения сухого остатка.

Очистка извлечений. Сухой остаток, полученный на завершающей стадии процесса изолирования, растворяли в 2-3 мл ацетона, смешивали раствор с 1,5 г силикагеля L 40/100 мкм и, после испарения растворителя, вносили смесь в колонку размерами 490×10 мм, заполненную 8,5 г силикагеля L 40/100 мкм. Хроматографировали,

Таблица 3

Результаты количественного определения ацетилоксибензойной кислоты (2-АОБК) в модельных смесях с плазмой крови

Внесено анализируемого вещества (мг в 25 г биологического объекта)	Найдено 2-АОБК, % (n=5; P=0,95)			
	\bar{x}	S	S \bar{x}	$\Delta\bar{x}$
2,5	88,19	2,86	1,28	3,56
5,0	88,48	2,50	1,12	3,12
12,5	88,72	2,21	0,99	2,74
25,0	89,11	1,99	0,89	2,47
50,0	89,23	1,83	0,82	2,29

используя элюент гексан-диэтиловый эфир (5:5). Элюат собирали фракциями по 2 мл. Фракции с 8 по 21 включительно (15-42 мл) объединяли в выпарительной чашке и упаривали в токе воздуха при температуре 18-22°C до сухого остатка. Остаток растворяли в 10 мл ацетона (исходный ацетоновый раствор). В три выпарительные чашки (№ 1, № 2 и № 3) вносили соответственно 0,2-2,0 мл, 2,5-5,0 мл и 0,2-2,0 мл исходного ацетонового раствора и испаряли растворитель, получая сухие остатки.

Идентификация методом ТСХ. Остаток в чашке № 1 растворяли в незначительном объеме ацетона и количественно наносили на линию старта пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ. Хроматографировали, применяя элюент гексан-диэтиловый эфир (3:7). Хроматограммы детектировали в УФ-свете и идентифицировали вещество по величине R_f, совпадающей с таковым вещества-свидетеля (0,53±0,03 для 2-АОБК).

Идентификация методом УФ-спектрофотометрии. После хроматографирования методом ТСХ пятно анализируемого вещества вырезали из хроматограммы, помещали в пробирку, элюировали вещество из сорбента 95% этанолом 15 минут и исследовали поглощение элюата в интервале длин волн 200-360 нм. УФ-спектр 2-АОБК, выделенной из плазмы крови, представлен на рисунке.

Анализируемое вещество идентифицировали по форме спектральной кривой и положению максимумов поглощения (204 нм, 230 нм (скрытый) и 278 нм).

Как видно из рисунка, в спектре вещества, выделенного из плазмы крови, по сравнению с таковым вещества-стандарта не обнаруживаются дополнительные полосы или заметное увеличение фонового поглощения. Основные оптические характеристики 2-АОБК, выделенной из биоматериала, совпадают с соответствующими параметрами стандартного вещества.

Идентификация методом ИК-спектрофотометрии. Остаток в чашке № 2, содержащий анализируемое вещество, измельчали, запрессовывали в таблетку с бромидом калия и

исследовали поглощение образца в интервале частот 4000—400 см⁻¹ (прибор Nicolette Magna 750).

Определяемое вещество идентифицировали по наличию в его ИК-спектре специфического набора характеристических полос поглощения, максимумы которых совпадали с максимумами соответствующих полос в ИК-спектре вещества-стандарта (табл. 2).

Количественное определение. Количественное содержание 2-АОБК рассчитывали по величине оптической плотности этанольного элюата, измеренной при длине волны 278 нм, используя уравнение градуировочного графика, и пересчитывали на навеску анализируемого вещества, внесенную в биологический материал.

Результаты количественного определения 2-АОБК в плазме крови представлены в табл. 3.

Согласно полученным данным, изменение содержания 2-АОБК в модельных смесях от 2,5 до 50,0 мг при постоянных массах навесок биожидкости (25 г) сопровождается изменением среднего значения степени извлечения, не превышающим 1,1%.

При этом удается извлечь из модельных смесей с плазмой крови 88,19-89,23% рассматриваемого соединения.

Предложенная методика характеризуется воспроизводимостью и правильностью, удовлетворяющими требованиям химикотоксикологического анализа. Полуширина доверительного интервала находится в пределах 2,29-3,56%. Открываемый минимум данной методики составляет 0,3 мг в 100 г плазмы крови.

Таким образом, разработанная методика может быть применена при химикотоксикологическом исследовании 2-АОБК.

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Показана целесообразность и определены оптимальные условия изолирования 2-ацетилоксибензойной кислоты из биологического материала ацетоном.

2. Разработана методика определения 2-ацетилоксибензойной кислоты в плазме крови на ос-

нове изолирования ацетоном и очистки методом адсорбционной макроколлоидной хроматографии.

3. Для идентификации и оценки количественного содержания исследуемого вещества в исследуемой биологической жидкости предложены методы ТСХ, УФ- и ИК-спектрофотометрии, а также ГХ МС.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства. 13-е изд. Т. 1. – Харьков : Торсинг, 1998. – 560 с.
2. *Полудек-Фабини Р., Бейрих Т.* Органический анализ. – Л. : Химия, 1981. – 624 с.
3. *Рабинович В.А., Хавин З.Я.* Краткий химический справочник. – Л. : Химия, 1977. – 376 с.
4. Химический энциклопедический словарь / Под ред. И.Л. Кнунянца. – М. : Советская энциклопедия, 1983. – 792 с.
5. *Шорманов В.К., Коваленко Е.А., Дурицын Е.П., Маслов С.В., Галушкин С.Г., Прониченко Е.И.* Определение карбофурана при судебно-химическом исследовании биологического материала // Суд.-мед. экспертиза. – 2013. – Т. 56, № 4. – С. 30-34.
6. *Aguiar J.L.N., Leandro K.C., Abrantes S.M.P., Albert A.L.M.* Development of a new analytical method for determination of acetylsalicylic and salicylic acids in tablets by reversed phase liquid chromatography // Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2009. – Vol. 45, N 4. – P. 723-727.
7. *Eikelboom J.W., Hankey G.* Aspirin resistance: a new independent predictor of vascular events // J. Am. Coll. Cardiol. – 2003. – Vol. 41. – P. 966-968.
8. *Schulz M., Schmoldt A.* Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics // Pharmazie. – 2003. – Vol. 58. – P. 447-474.
9. *Watson J.E., Tagupa E.T.* Suicide attempts by means of aspirin enema // Ann. Pharmacother. – 1994. – Vol. 28, N 4. – P. 467-469.