

## ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

М.Л. Пивовар, А.И. Жебентяев

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭКСТРАКЦИИ ПРОИЗВОДНЫХ КСАНТИНА РАЗЛИЧНЫМИ ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ

Витебский государственный  
медицинский университет

*В статье представлены количественные характеристики экстракции кофеина, теобромина и теофиллина различными органическими растворителями для подбора оптимального экстрагента и условий экстракции данной группы веществ. Описаны зависимости изменения коэффициентов распределения от рН и ионной силы раствора, рассчитаны коэффициенты распределения изучаемых веществ в системах вода – изобутиловый спирт, вода – изоамиловый спирт, вода – этилацетат, вода – амилацетат, вода – хлороформ, вода – дихлорметан и вода – 1,2-дихлорэтан. В результате проведенного исследования установлено, что максимальное извлечение кофеина (коэффициент распределения 17,76) наблюдается при экстракции хлороформом из слабокислой среды. Максимальное извлечение теобромина получено при экстракции изобутиловым спиртом, а теофиллина – изоамиловым спиртом (коэффициенты распределения составляют соответственно 0,57 и 1,46) при экстракции из слабокислой среды.*

#### ВВЕДЕНИЕ

Инструментальные методы анализа постоянно развиваются и совершенствуются, однако значение методов разделения и концентрирования не уменьшается, а, напротив, возрастает. Органические соединения могут содержаться в биологическом материале в концентрациях, ниже пределов обнаружения, а некоторые компоненты пробы могут обладать маски-

рующим действием, что делает невозможным непосредственный анализ пробы. Методы разделения и концентрирования позволяют преодолеть эти сложности. Одним из наиболее распространенных и доступных методов концентрирования является экстракция.

Экстракционные системы вода – органический растворитель известны давно и используются для выделения и разделения веществ различной химической природы. В большинстве случаев выбор органического растворителя для экстракции осуществляется эмпирическим путем. Как правило, при этом исходят из следующих требований:

1. Высокая степень извлечения исследуемого вещества из водного раствора.
2. Малая растворимость в водной фазе.
3. Химическая инертность по отношению к компонентам экстракционной системы и лабораторному оборудованию [1].

Анализ литературных данных [2-5] показывает, что наиболее распространенным экстрагентом для экстракции метилпроизводных ксантина является хлороформ. Например, авторами [2] использовалась микроэкстракция хлороформом для извлечения кофеина из пищевых продуктов, с последующим анализом экстракта методом ГХМС. В статье [3] предлагается методика определения кофеина в чае и кофе. Она включает экстракцию хлороформом из подщелоченной пробы с анализом объекта методом геля-хроматографии.

Группой авторов [4] предложена методика определения кофеина в плазме крови методом газо-жидкостной хроматографии с пламенно-ионизационным детектором. Процесс пробоподготовки включает добавление внутреннего стандарта (мепивакаина), подщелачивание пробы и экстракцию хлороформом. В статье [5] кофеин определяли в волосах. Согласно разработанной авторами методике, кофеин экстрагировали хлороформом и анализировали экстракт методом ГХМС.

В литературе также имеется информация об использовании других органических растворителей для экстракции метил-

производных ксантина. Например, группой авторов [6] предлагается использовать дихлорметан для экстракции кофеина из проб плазмы крови, слюны и кофеинсодержащих продуктов. Экстракция проводилась в щелочной среде, экстракты анализировались на газовом хроматографе с азот-селективным детектором. В статье [7] описана методика определения кофеина, теобромина и теофиллина в плазме крови. Пробоподготовка включает подкисление проб и экстракцию исследуемых веществ дихлорметаном с последующим анализом экстрактов методом обращеннофазовой ВЭЖХ.

В статье [8] авторами описана методика определения теофиллина в плазме крови методом газо-жидкостной хроматографии. Экстракцию теофиллина проводили этилацетатом. Также экстракцию этилацетатом предложено проводить при анализе сложных лекарственных форм, содержащих кофеин. Экстракция проводится в щелочной среде, экстракты анализируются методом газовой хроматографии [9].

Для обоснованного выбора экстрагента при пробоподготовке необходимо иметь количественные данные, характеризующие экстракционный процесс. В литературе отсутствуют данные по коэффициентам распределения метилпроизводных ксантина для большинства органических растворителей, используемых в лабораторной практике. Также отсутствуют данные об изучении факторов, влияющих на

экстракцию теобромина, теофиллина и кофеина. Как следствие, изучение параметров экстракции данной группы веществ органическими растворителями и изучение факторов, влияющих на их экстракционные характеристики, представляет как теоретический, так и практический интерес.

Целью данной работы являлось определение количественных характеристик экстракции кофеина, теобромина и теофиллина различными органическими растворителями с целью подбора оптимального экстрагента и условий экстракции данной группы веществ.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали образцы кофеина (моногидрата), теобромина и теофиллина (моногидрата) фармакопейной чистоты. Структурные формулы исследуемых веществ приведены ниже. В качестве экстрагентов были использованы алифатические спирты, алкилацетаты и хлорпроизводные алканов, а также исследована возможность применения для экстракции производных бензола, простых эфиров и предельных нециклических углеводов. Основные свойства примененных растворителей представлены в таблице 1. Перед проведением эксперимента хлороформ предварительно очищали от этилового спирта. Остальные растворители дополнительной очистке не подвергали.



Для исследования высаливающей способности солей и приготовления буферных растворов использовались соли квалификации ч.д.а.

Таблица 1 - Основные свойства изученных растворителей.

№	Название	Диэлектрическая проницаемость (~20°C) [10]	Растворимость		Температура кипения °C [10]	Плотность при 20°C, г/см <sup>3</sup> [10]	Классификация чистоты
			в воде, г/100мл (20°) [10]	воды в р-теле, г/100мл (20°) [1]			
1.	н-Бутиловый спирт	17,8 [1]	20,5% [1]	7,9	117 [1]	0,810 [1]	х.ч.
2.	Изобутиловый спирт	18,8	8,5	9,5	108	0,803	х.ч.
3.	Изоамиловый спирт	15,8	2,67 (25°)	2,67	128	0,806	х.ч.
4.	Диэтиловый эфир	4,3	6,95	6,5	34,6	0,714	х.ч.
5.	Этилацетат	6,2	7,9	8,6	77,15	0,901	х.ч.
6.	Амилацетат	5,26	0,25 (15°)		135,5	0,856	х.ч.
7.	Дихлорметан	9,1 [1]	0,2% [1]	2	40 [1]	1,336 [1]	х.ч.
8.	Хлороформ	5,1	0,82	0,8	61,2	1,489	ч.д.а.
9.	Четыреххлористый углерод	2,2	0,08	0,08	76,7	1,595	х.ч.
10.	1,2-Дихлорэтан	10,5	0,87	0,87	83,5	1,257	х.ч.
11.	Бензол	2,3	0,175	0,082	80,8	0,8790	ч.д.а.
12.	Нитробензол	35,5	0,19	0,19	210	1,203	ч.д.а.
13.	Гексан (норм.)	1,9	0,014 (16°)	0,014	66,8	0,6603	ч.д.а.

Равновесную экстракцию при равных объемах водной и органической фаз (по 5 мл) изучали во флаконах из стеклотрота объемом 10 мл. Температура при изучении экстракционных характеристик составляла 20±1°C. В каждый флакон помещали рассчитанные объемы растворов теобромина, теофиллина или кофеина, 5 М или 1 М растворов NaCl (для создания постоянной ионной силы раствора) и буферных растворов. Общий объем водной фазы довели до объема 5 мл водой очищенной. Экстракцию проводили 5 мл органического растворителя в лабораторном аппарате для встряхивания пробирок в течение 5 мин. По окончании экстракции флаконы центрифугировали при 3000 об/мин 5 мин для предотвращения образования микроэмульсии в водной фазе. Анализ водной фазы осуществляли УФ-спектрофотометрическим методом (при длине волны 273 нм для кофеина и теобромина и 272 нм для теофиллина) на регистрирующем спектрофотометре Spcord 250 и спектрофото-

метре СФ-46. Для расчета концентраций исследуемых веществ в водной фазе предварительно были построены градуировочные графики и рассчитаны молярные коэффициенты поглощения.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе предварительных исследований было установлено, что степень однократной экстракции метилпроизводных ксантина четыреххлористым углеродом, диэтиловым эфиром и гексаном не превышает 10%, что нельзя считать удовлетворительным для их использования в химико-токсикологическом анализе. Так же столь низкая экстрагируемость приводит к высокой погрешности при измерении, что делает неточным расчет коэффициентов распределения по выше описанной методике.

Бензол и нитробензол в значительной степени поглощают в ближней УФ-области спектра. В связи с тем, что они

частично растворимы в воде, становится невозможным точное определение количества непроэкстрагированного вещества в водной фазе спектрофотометрическим методом. В условиях проведения эксперимента *n*-бутиловый спирт на 20,5% (по массе) растворяется в водной фазе. Это вводит значительную погрешность в определяемые коэффициенты распределения по выше описанной методике. В связи с указанными причинами, для дальнейших исследований были использованы изобутиловый и изоамиловый спирты, этилацетат и амилацетат, хлороформ, дихлорметан и дихлорэтан.

**Влияние ионной силы.** Для изучения влияния ионной силы раствора на коэффициенты распределения производных ме-

тилксантина в качестве высаливателя использовался NaCl.

Графические зависимости влияния ионной силы раствора на экстрагируемость исследуемых веществ имеют сходный вид. В качестве примера на рисунке 1 приведены графики, отражающие влияние ионной силы раствора на коэффициенты распределения теofilлина при экстракции различными растворителями. В результате проведенных исследований было установлено, что повышение концентрации соли в растворе положительно сказывается на коэффициентах распределения исследуемых веществ, т.е. наблюдается эффект высаливания. Величины коэффициентов распределения исследуемых веществ возрастают линейно во всем диапазоне изученных концентраций NaCl.

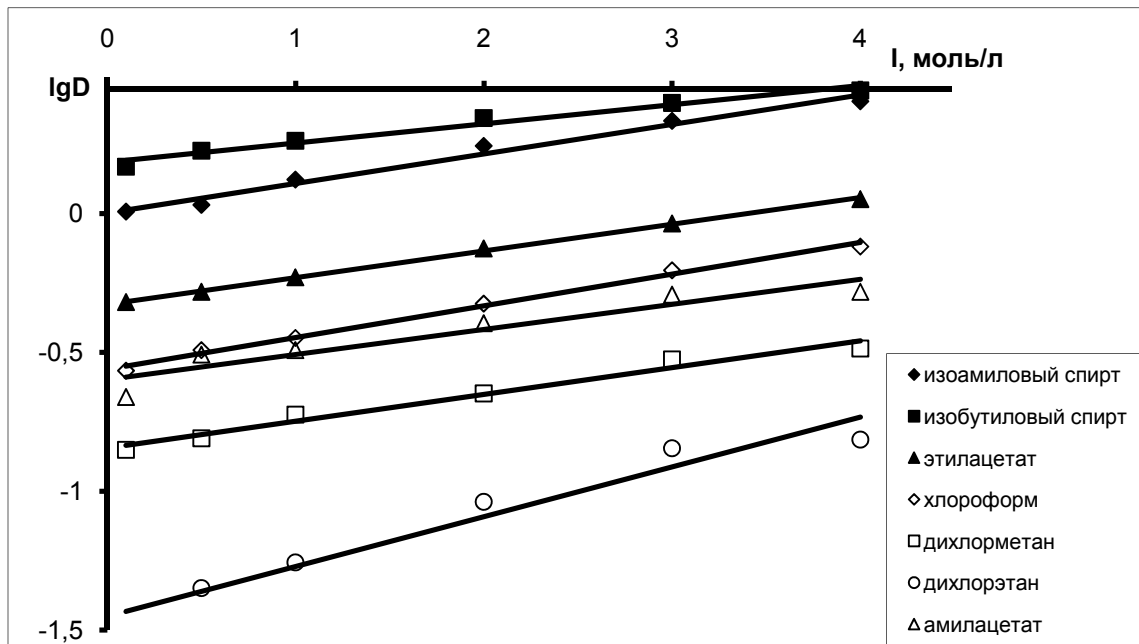


Рис. 1. Влияние ионной силы раствора на экстракцию теofilлина

**Влияние pH раствора.** Представленные в литературе данные о константах кислотности теобромина, теofilлина и кофеина противоречивы [11, 12]. Но анализируя структурные формулы изучаемых веществ, можно сделать вывод, что они обладают слабоосновными свойствами ( $pK_{BH^+} \approx 0,6-3,0$ ). Теобромин и теofilлин, кроме того, обладают слабыми кислотными свойствами (у теобромина  $pK_a = 10,0$  [11], у теofilлина  $pK_a \approx 8,6-8,8$  [11, 12]) и ведут себя в растворе как амфолиты.

Графическое отображение зависимости влияния pH раствора (до экстракции) на экстрагируемость исследуемых веществ представлено на рисунках 2-4. Как видно из рисунка 2, при экстракции теобромина изоамиловым спиртом, хлороформом и дихлорметаном коэффициенты распределения практически не изменяются в диапазоне  $pH=1-9$ , при  $pH$  больше 9 наблюдается спад экстрагируемости, что можно объяснить частичной ионизацией теобромина в водной фазе. Отсутствие значительных

изменений в кривой экстракции этилацетатом во всем исследованном диапазоне pH можно объяснить способностью в равной

степени экстрагировать как ионизированные, так и неионизированные формы теобромина, находящиеся в растворе.

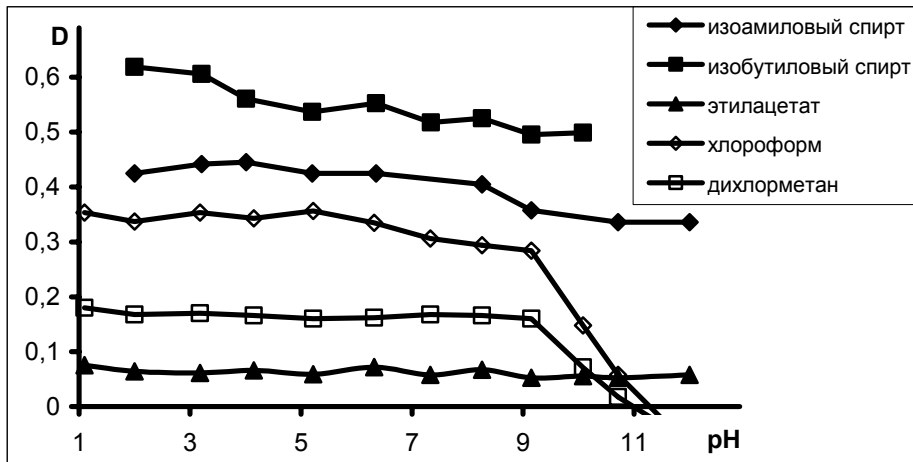


Рис. 2. Влияние pH на экстрагируемость теобромина

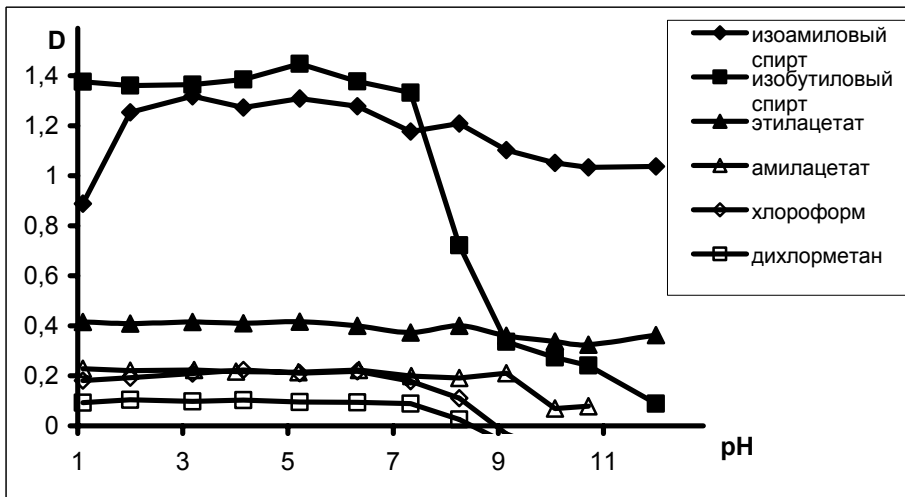


Рис. 3. Влияние pH на экстрагируемость теофиллина

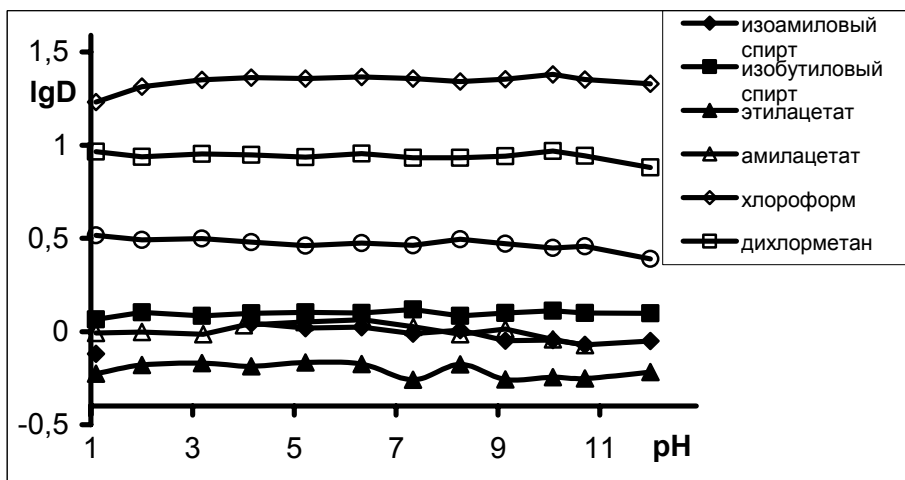


Рис. 4. Влияние pH на экстрагируемость кофеина

При экстракции теofilлина хлороформом, дихлорметаном и изобутиловым спиртом в диапазоне рН от 1 до 7 значимых различий не наблюдается (рисунок 4). При рН более 7 наблюдается резкое уменьшение экстрагирующей способности растворителей, что, очевидно, связано с ионизацией молекулы теofilлина в данном диапазоне рН.

При экстракции теofilлина изоамиловым спиртом при рН менее 2 отмечается уменьшение коэффициентов распределения по причине, аналогичной описанной для теобромина. В остальном диапазоне изученных значений рН снижения коэффициентов распределения не происходит.

При экстракции теofilлина этилацетатом значительных различий в экстрагирующей способности растворителей во всем исследуемом диапазоне рН не наблюдается. Как видно из диаграммы на рисунке 5, кофеин без изменений экстрагируется в диапазоне рН=1-12 всеми изучен-

ными растворителями, кроме хлороформа. Уменьшение экстрагируемости кофеина хлороформом при рН меньше 3 является трудно объяснимым, т.к. подобного эффекта не наблюдается при экстракции дихлорметаном и 1,2-дихлорэтаном.

В связи с малыми коэффициентами распределения при экстракции теобромина и теofilлина дихлорэтаном затруднительно установить в ходе данного эксперимента зависимости экстрагирующей способности от рН водной фазы.

**Изотермы экстракции и коэффициенты распределения исследуемых веществ.** Изотермы экстракции теобромина представлены на рис. 5. Изотермы экстракции теofilлина и кофеина выглядят аналогичным образом и поэтому в данной статье не приводятся.

Коэффициенты распределения исследуемых веществ определены при ионной силе раствора 0,1М, температура  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  (таблица 3).

Таблица 3 - Коэффициенты распределения теобромина, теofilлина, кофеина ( $\alpha=0,05$ )

Растворитель:	Теобромин		Теofilлин		Кофеин	
	n	$D \pm \Delta D$	n	$D \pm \Delta D$	n	$D \pm \Delta D$
и-амиловый спирт	6	$0,37 \pm 0,01$	6	$1,46 \pm 0,07$	7	$1,11 \pm 0,02$
и-бутиловый спирт	6	$0,57 \pm 0,02$	6	$1,42 \pm 0,02$	7	$1,10 \pm 0,10$
этилацетат	6	$0,16 \pm 0,02$	7	$0,48 \pm 0,04$	7	$0,62 \pm 0,02$
амилацетат	-	-	7	$0,14 \pm 0,01$	7	$0,98 \pm 0,02$
хлороформ	6	$0,36 \pm 0,01$	6	$0,21 \pm 0,01$	6	$17,76 \pm 1,82$
дихлорметан	6	$0,25 \pm 0,03$	6	$0,09 \pm 0,003$	7	$6,78 \pm 0,61$
1,2-дихлорэтан	-	-	-	-	7	$2,46 \pm 0,67$

где: n – число измерений.

Как видно из таблицы 3, наилучшими экстрагентами для теобромина и теofilлина являются изоамиловый и изобутиловый спирты.

Это можно объяснить, с одной стороны, их высокой полярностью, а с другой стороны, наличием у теобромина и теofilлина кислотных групп, которые в неионизированном состоянии способны образовывать водородные связи с гидроксогруппой молекулы спирта. О важности данного вида взаимодействия также свидетельствует низкая экстрагируемость теобромина и теofilлина дихлорэтаном. Его диэлектрическая проницаемость составляет 10,5, но коэффициенты распределения

теобромина и теofilлина столь малы, что их практически невозможно установить в указанных условиях проведения эксперимента. Стоит отметить уменьшение экстрагирующей способности высших спиртов с увеличением их молекулярной массы. Это можно объяснить, с одной стороны, уменьшением сольватирующей способности высших спиртов с возрастанием величины их алкильного радикала, и относительным уменьшением концентрации гидроксогрупп, способных образовывать водородные связи с функциональными группами экстрагируемых веществ в органической фазе, с другой стороны.

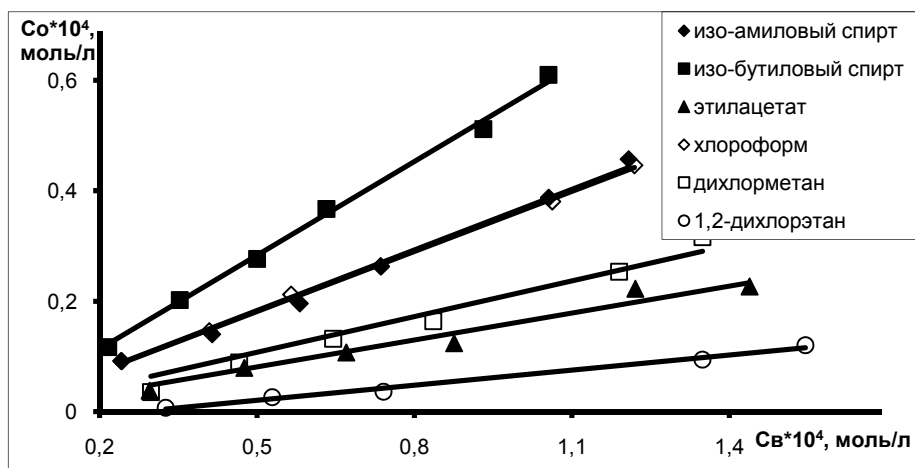


Рис. 5. Изотермы экстракции теобромина

Следует отметить, что коэффициенты распределения теобромина при экстракции этилацетатом столь малы, что высокая погрешность делает невозможным их определение по данной методике. Аналогичная картина наблюдается при экстракции теофиллина и теобромина 1,2-дихлорэтаном.

При экстракции кофеина наблюдается обратная выше описанной зависимость. Наиболее эффективными экстрагентами являются хлороформ, дихлорметан и дихлорэтан (коэффициенты распределения составляют соответственно 17,76, 6,78 и 2,46). Более полярные изоамиловый и изо-бутиловый спирты являются менее эффективными (коэффициенты распределения соответственно 1,11 и 1,10). Данный эффект можно объяснить тем, что в молекуле кофеина нет функциональных групп, способных к ионизации в исследованном диапазоне значений pH.

При экстракции теобромина, теофиллина и кофеина прослеживаются следующие закономерности:

1. При экстракции высшими спиртами при увеличении числа атомов углерода в их молекуле, и, как следствие, уменьшении их полярности, коэффициенты распределения уменьшаются.

2. При экстракции теобромина и теофиллина алкилацетатами прослеживается снижение коэффициентов распределения с увеличением молярной массы и уменьшением полярности органических раствори-

телей. При экстракции кофеина наблюдается противоположный эффект.

3. При экстракции алкилгалогенидами с увеличением диэлектрической проницаемости растворителей коэффициенты распределения уменьшаются.

Следует также отметить, что при проведении экстракции специально были выбраны условия, при которых в водной и органической фазах исследуемые вещества находятся в молекулярной форме, а количество ионизированных форм пренебрежимо мало. Следовательно, можно утверждать, что в данных условиях константы распределения будут равны коэффициентам распределения.

Кроме того, надо отметить, что полученные изотермы экстракции линейны во всем изученном диапазоне концентраций, что свидетельствует об отсутствии процессов ассоциации молекул изучаемых веществ как в водной, так и в органической фазах.

В результате анализа данных о влиянии ионной силы раствора и pH на экстрагируемость и о величине коэффициентов распределения исследуемых веществ был сделан вывод о невозможности количественно экстрагировать теобромин и теофиллин при однократной экстракции изученными растворителями. При ионной силе раствора 4М и pH=3-12 только кофеин будет экстрагироваться на 99% из раствора, из чего можно сделать вывод, что для максимального извлечения изученных веществ

из раствора необходимо применять многокомпонентные экстракционные смеси.

### ВЫВОДЫ

1. Изучено влияние ионной силы раствора, pH раствора и природы растворителя на экстрагируемость теобромина, теофиллина и кофеина.

2. Определены коэффициенты распределения производных метилксантина в изученных двухфазных экстракционных системах.

3. Определена максимально возможная полнота извлечения при экстракции различными органическими растворителями.

4. Для наиболее полного извлечения всей группы изученных веществ из водных растворов целесообразно использовать многокомпонентные экстракционные смеси.

### SUMMARY

M.L. Pivovar, A.I. Zhebentyaev

#### DEFINITION OF QUANTITATIVE CHARACTERISTICS OF DERIVATIVE XANTHINE EXTRACTION WITH THE USAGE OF DIFFERENT ORGANIC SOLVENTS

The results of study of quantitative characteristics of caffeine, theobromine and theophylline extraction with different organic solvents so that to select the optimal conditions for extraction for this group of substances are presented in the article. Dependences of distribution coefficients changes from pH and ionic strength of solution have been described, distribution coefficients of studied substances in the systems of water-isobutyl alcohol, water-isoamyl alcohol, water-ethyl acetate, water-amyl acetate, water-chloroform, water-dichloromethane and water - 1,2-dichloroethane have been calculated.

According to the traced study we have established that maximal extraction of caffeine (distributive coefficient 17,76) was detected while the chloroform extraction from weak-acid medium. Maximal extraction of theobromine was detected while the extraction with isobutyl alcohol; theophylline - with isoamyl alcohol (distributive coefficients were 0,57 and 1,46 correspondently) while the extraction in weak-acid medium.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Коренман, И.М. Экстракция в анализе органических веществ / И.М. Коренман. – М.: Химия. - 1977. – 200 с.

2. Shrivastava, K. Rapid determination of caffeine in one drop of beverages and foods using drop-to-drop solvent microextraction with gas chromatography/mass spectrometry / K. Shrivastava, H.F. Wu. // J. Chromatogr. A. – 2007. – Vol. 1170, № 1-2. – P. 9-14.

3. Tši, P. [Caffeine determination by gel-chromatography (author's transl)] / P. Tši, J. Pokorný // Z. Lebensm Unters Forsch. – 1975. – Vol. 159, № 1. – P. 43-46.

4. Cohen, J.L. GLC determination of caffeine in plasma using alkali flame detection / J.L. Cohen, C. Cheng, J.P. Henry, Y.L. Chan. // J. Pharm. Sci. – 1978. – Vol. 67, № 8. – P. 1093-1095.

5. Mizuno, A. The measurement of caffeine concentration in scalp hair as an indicator of liver function / A. Mizuno, T. Uematsu, S. Gotoh, E. Katoh, M. Nakashima. // J. Pharm. Pharmacol. – 1996. – Vol. 48, № 6. – P. 660-664.

6. Teeuwen, H.W. Rapid and sensitive gas-chromatographic determination of caffeine in blood plasma, saliva, and xanthine beverages / H.W. Teeuwen, E.L. Elbers, J.M. van Rossum. // Mol. Biol. Rep. – 1991. – Vol. 15, № 1. – P.1-7.

7. Foenander, T. The simultaneous determination of theophylline, theobromine and caffeine in plasma by high performance liquid chromatography / T. Foenander, D.J. Birkett, J.O. Miners, L.M. Wing. // Clin. Biochem. – 1980. – Vol. 13, № 3. – P. 132-134.

8. Sun, S.R. Rapid determination of theophylline in serum by electron-capture GLC / S.R. Sun. // J. Pharm. Sci. – 1979 – Vol. 68, № 4. – P. 443-445.

9. Harsono, T. Simultaneous determination of some active ingredients in cough and cold preparations by gas chromatography, and method validation / T. Harsono, M. Yuwono, G. Indrayanto. // J. AOAC Int. – 2005. – Vol. 88, № 4. – P. 1093-1098.

10. Лурье, Ю.Ю. Справочник по аналитической химии / Ю.Ю. Лурье. - М.: Химия. - 1971. – 456 с.

11. Moffat, A.C. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals / A.C. Moffat. – Second Edition. – London: The pharmaceutical press, 1986. – 1684 p.

12. Spiller, G.A. Caffeine / G.A. Spiller. – New York: CRC press LCC, 1998. – 366 p.

Поступила 20.08.2008 г.

\*\*\*\*\*