

М.Л. Пивовар, А.И. Жебентяев

ЭКСТРАКЦИЯ АЦИКЛОВИРА И АЛЛОПУРИНОЛА ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ

Витебский государственный медицинский университет

Определены оптимальные условия экстракции ацикловира и аллопуринола индивидуальными органическими растворителями и их смесями. Исследована зависимость распределения ацикловира и аллопуринола от содержания полярных органических растворителей в экстракционной смеси. Рассчитаны коэффициенты распределения ацикловира и аллопуринола при экстракции 9 индивидуальными органическими растворителями и 2 смесями типа алкилгалогенид-спирт. Основу смесей составляли хлороформ и дихлорметан. В качестве добавок использовались полярные органические растворители (изопропанол, н-бутанол или изобутанол). Установлено, что смеси хлороформа и дихлорметана с н-бутанолом или изобутанолом неэффективны для экстракции ацикловира и аллопуринола. Лучшими экстрагентами для ацикловира являются смеси дихлорметан: изопропанол (50 % об.) и хлороформ: изопропанол (50 % об.). Аллопуринол лучше экстрагируется н-бутанолом, изобутанолом и смесями дихлорметан: изопропанол (50 % об.), хлороформ: изопропанол (50 % об.).

Ключевые слова: ацикловир, аллопуринол, экстракция, смеси органических растворителей.

ВВЕДЕНИЕ

Ацикловир и аллопуринол относятся к лекарственным веществам группы производных пурина. Ацикловир является противовирусным лекарственным средством. Аллопуринол ингибирует фермент ксантиноксидазу, применяется как противовоспалительное средство [1]. Использование данных лекарственных средств в ме-

дицинской практике обуславливает необходимость определять их содержание в биожидкостях или пробах тканей при проведении фармакокинетических исследований или в случае отравления.

Одним из простых и доступных методов разделения и концентрирования является жидкость-жидкостная экстракция. В статьях [2-4] описаны методики определения ацикловира в плазме крови методом ВЭЖХ. Выделение ацикловира проводилось смесью дихлорметан: изопропанол. Примеров применения других экстрагентов для извлечения ацикловира в литературе не найдено. Извлечение аллопуринола из биологических жидкостей проводят этилацетатом [5].

Следует отметить, что в литературных источниках отсутствует обоснование выбора экстрагента для пробоподготовки. Кроме того, нами не обнаружены данные по коэффициентам распределения ацикловира и аллопуринола при экстракции индивидуальными органическими растворителями и их смесями, которые позволяли бы сделать вывод об их эффективности.

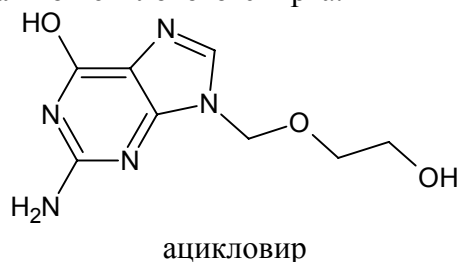
Данная работа имеет целью определить оптимальные условия экстракции ацикловира и аллопуринола индивидуальными органическими растворителями и смесями типа алкилгалогенид-спирт из водной фазы для проведения пробоподготовки при химико-токсикологическом исследовании биоматериала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали образцы ацикловира и аллопуринола фармакопейной чистоты.

В качестве экстрагентов были использованы хлороформ (х.ч.), дихлорметан (х.ч.), дихлорэтан (х.ч.), этилацетат (ч.д.а.), бутилацетат (х.ч.), амилацетат (х.ч.), н-бутанол (ч.д.а.), изобутанол (ч.д.а.), изопропанол (х.ч.), гексан (х.ч.), гептан (х.ч.), толуол (х.ч.), диэтиловый эфир (х.ч.). Также использовали смеси хлороформа или дихлорметана с различной мольной долей или объемной долей н-бутанола, изобутанола или изопропанола. Расчет изомольной серии для смесей растворителей вы-

числяли по уравнениям [6]. Перед проведением эксперимента и приготовлением экстракционных смесей хлороформ предварительно очищали от этилового спирта.



Для приготовления буферных растворов использовали соли квалификации ч.д.а.

Ввиду частичной растворимости изобутанола, бутанола, этилацетата, бутилацетата и амилацетата в воде, водная фаза предварительно насыщалась одним из них. В данном случае расчет коэффициентов распределения можно осуществить по классической формуле (1):

$$D = \frac{C_f}{C_a} \quad (1),$$

где: C_o – концентрация вещества в органической фазе; C_e – концентрация вещества в водной фазе.

Вследствие того, что определяемые коэффициенты распределения малы, для уменьшения влияния погрешностей, связанных с приготовлением растворов, и для уменьшения количества промежуточных расчетов формула (1) была преобразована в формулу (2):

$$D = \frac{A_{нач} - A_e}{A_e} \quad (2),$$

где: $A_{нач}$ – оптическая плотность водной фазы до экстракции; A_e – оптическая плотность водной фазы после экстракции.

Изопропанол неограниченно смешивается с водой и при экстракции в составе смеси органических растворителей частично переходит в водный раствор, распределяясь между водной и органической фазами. Данное явление приводит к значительному изменению соотношения объемов фаз после экстракции. Для его компенсации предварительно были установлены объемы водной и органической фаз после экстракции смесями органических растворителей с различным содержа-

Остальные растворители дополнительной очистке не подвергали.

нием изопропанола. При расчетах коэффициентов распределения в формулу (2) вводили коэффициент r , и она приобретала вид (3):

$$D = \frac{A_{нач} - A_e}{A_e} \cdot r \quad (3),$$

где: $r = \frac{V_b}{V_o}$; V_b – объем водной фазы;

V_o – объем органической фазы.

Равновесную экстракцию при равных объемах водной и органической фаз (по 4 мл) изучали в экстракционных флаконах объемом 10 мл. Температура при изучении экстракционных характеристик составляла 20 ± 1 °С. В каждый флакон помещали рассчитанные объемы растворов ацикловира или аллопуринола и буферных растворов. Экстракцию проводили 4 мл смеси органических растворителей на шейкере в течение 5 мин. По окончании экстракции флаконы центрифугировали при 3000 об/мин 5 мин для ускорения разделения фаз и предотвращения образования микроэмульсии в водной фазе. Анализ водной фазы осуществляли УФ-спектрофотометрическим методом на регистрирующем спектрофотометре Specord 250.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ацикловир и аллопуринол являются амфолитами. В водных растворах эти вещества могут находиться в ионизированном и неионизированном состояниях, что будет влиять на коэффициенты распределения при экстракции. На рисунке 1 представлена зависимость влияния рН на коэффициенты распределения ацикловира.

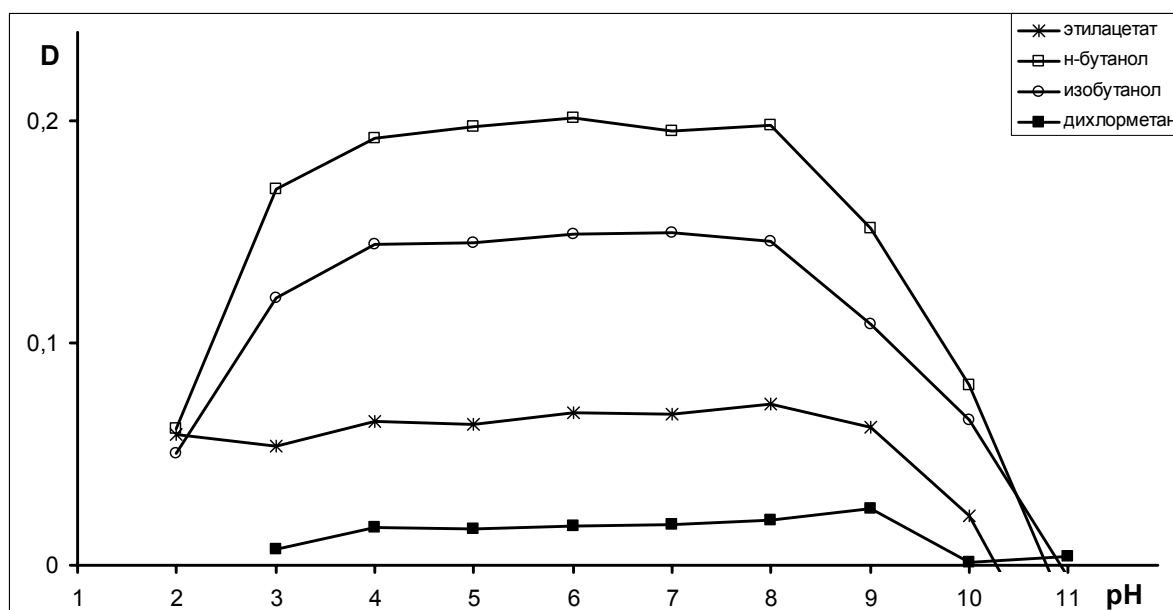


Рисунок 1 – Зависимость коэффициентов распределения ацикловира от pH при экстракции различными органическими растворителями

Как видно из приведенной графической зависимости, максимальное извлечение ацикловира из водных растворов наблюдается при pH=4-8. Согласно литературным данным [7], значения pK_{BH^+} и pK_a ацикловира соответственно равны 2,3 и 9,2. Поэтому такое поведение ацикловира при экстракции можно объяснить тем, что в данном диапазоне значений pH ацикловир находится в виде молекул. При pH менее 4 и более 8 увеличивается доля ионов ацикловира в растворе и коэффициенты распределения уменьшаются.

На рисунке 2 представлена зависимость влияния pH на коэффициенты распределения аллопуринола. В отличие от ацикловира, аллопуринол может ионизироваться только при pH больше 7 ($pK_a=9,4$ [7]). На приведенной графической зависимости видно, что коэффициенты распределения максимальны и не изменяются до pH=7. При дальнейшем увеличении pH наблюдается уменьшение коэффициентов распределения, очевидно, вызванное ионизацией молекул аллопуринола.

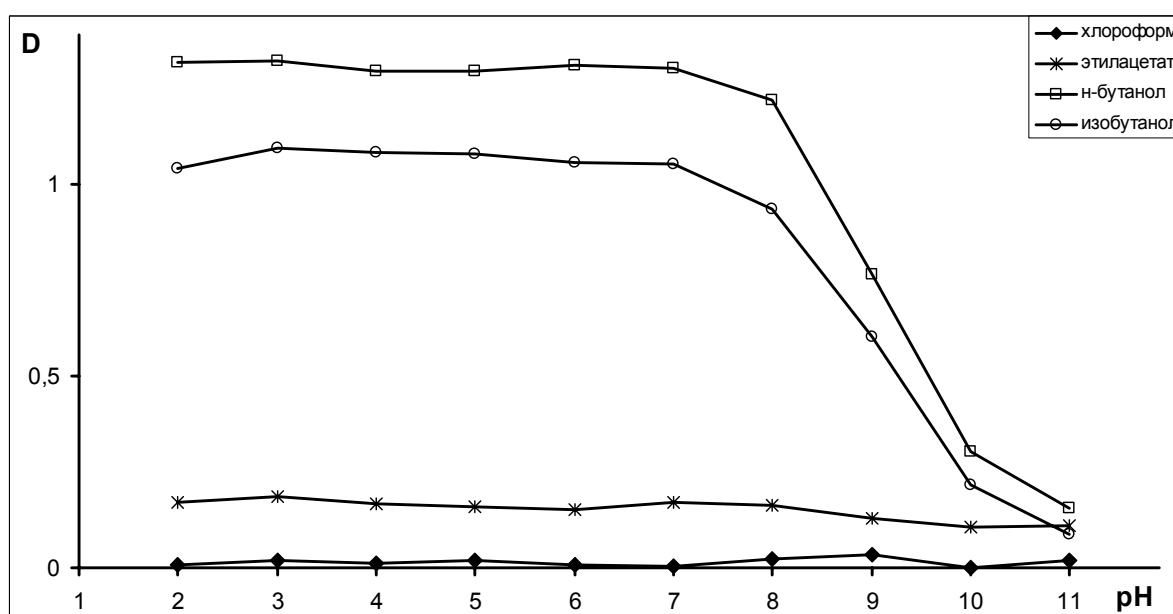


Рисунок 2 – Зависимость коэффициентов распределения аллопуринола от pH при экстракции различными органическими растворителями

Следует отметить, что для остальных изученных органических растворителей прослеживаются аналогичные зависимости влияния рН на экстракцию ацикловира и аллопуринола. Таким образом, можно сделать вывод, что оптимальным

для извлечения ацикловира является рН=4-8, а для аллопуринола - рН=2-7.

Коэффициенты распределения при экстракции различными органическими растворителями изучаемых веществ определены при рН=5,0 и приведены в табл. 1.

Таблица 1 – Коэффициенты распределения ацикловира и аллопуринола при экстракции различными органическими растворителями (n=5; $\alpha=0,05$)

Экстрагент:	Вещество:	
	Ацикловир	Аллопуринол
хлороформ	0,03	0,01
дихлорметан	0,02	0,02
дихлорэтан	-	0,02
этилацетат	0,05	0,17±0,02
бутилацетат	0,01	0,06
амилацетат	-	0,02
n-бутанол	0,18±0,02	1,24±0,01
изобутанол	0,14±0,01	1,04±0,01
диэтиловый эфир	0,08	0,09

Примечание: для коэффициентов распределения менее 0,1 доверительный интервал не приводится, т.к. рассчитанные значения коэффициентов распределения имеют оценочный характер.

Как видно из приведенных данных, ацикловир незначительно экстрагируется n-бутанолом и изобутанолом. Аллопуринол удовлетворительно экстрагируются n-бутанолом и изобутанолом, незначительно – этилацетатом. Кроме приведенных в таблице растворителей, в эксперименте использовали гексан, гептан и толуол, но было установлено, что эти растворители практически не экстрагируют изучаемые вещества из водных растворов.

На практике, если вещество плохо экстрагируется, подбирают смесь органических растворителей. Обычно используются смеси алкилгалогенидов (хлороформа, дихлорметана) со спиртами. При экстракции такими органическими смесями обычно наблюдаются более высокие коэффициенты распределения, чем при экстракции индивидуальными органическими растворителями. Это можно объяснить тем, что спирты принимают участие в процессе сольватации молекул извлекаемых веществ, а образующиеся сольваты легче переходят в органическую фазу.

Нами были проведены исследования влияния состава смеси растворителей типа алкилгалогенид-спирт на коэффициенты распределения ацикловира и аллопу-

ринола. В качестве экстрагентов применялись часто используемые смеси хлороформа и дихлорметана с изопропанолом, а также смеси хлороформа и дихлорметана с n- и изобутанолом, показавшие хорошие результаты при извлечении метилксантинов в наших предыдущих исследованиях [8].

На рисунке 3 приведена зависимость влияния мольной доли изобутанола в экстракционных смесях на коэффициенты распределения аллопуринола.

Как видно из приведенной графической зависимости, при экстракции смесями с изобутанолом наблюдается незначительный синергетный эффект, который проявляется при высоком содержании спирта в смеси. При использовании смесей с дихлорметаном он выражен в большей степени, чем при использовании смесей с хлороформом. Аналогичные зависимости наблюдаются при использовании смесей с n-бутанолом и при экстракции ацикловира. Из приведенных данных также можно сделать вывод о нецелесообразности использования данных смесей для экстракции ацикловира и аллопуринола.

Иная зависимость наблюдается при использовании в качестве экстрагента сме-

сей хлороформа и дихлорметана с изопропанолом. Для примера на рисунке 4 изображена зависимость коэффициентов рас-

пределения ацикловира от содержания изопропанола в экстракционной смеси.

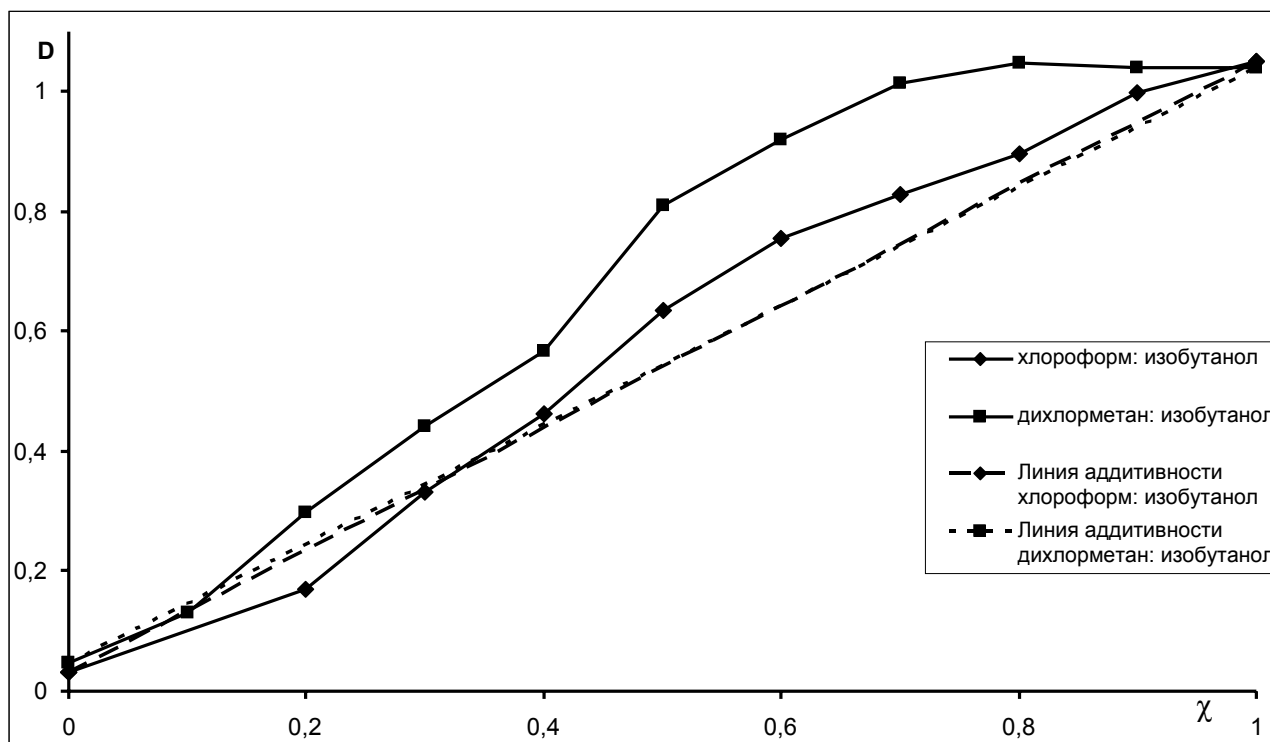


Рисунок 3 – Зависимость коэффициентов распределения аллопуринола от мольной доли (χ) изобутанола в экстракционной смеси

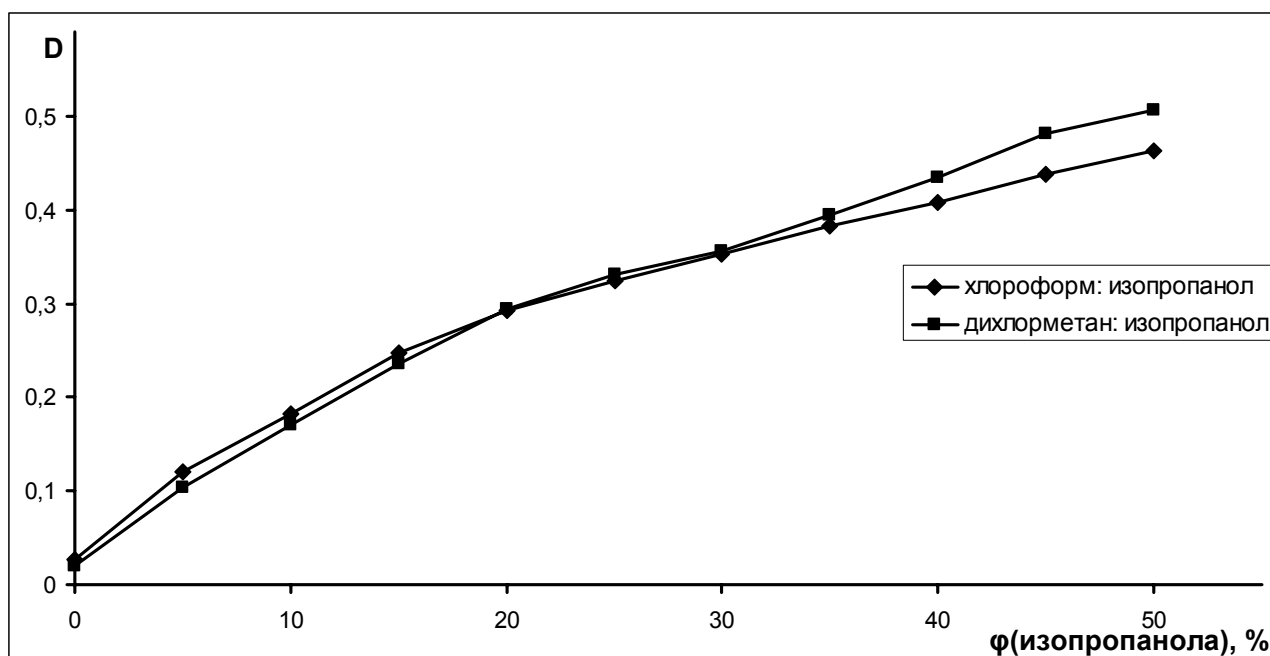


Рисунок 4 – Зависимость коэффициентов распределения ацикловира от содержания изопропанола в экстракционной смеси

При увеличении содержания изопропанола в экстракционной смеси до 20-25 % (об.) коэффициенты распределения

возрастают по параболе, а при дальнейшем увеличении содержания изопропанола наблюдается практически линейный рост ко-

эффициентов распределения, которые достигают максимума при содержании изопропанола 50 % (об.). Аналогичная зависимость наблюдается при экстракции аллопуринола.

Коэффициенты распределения ацикловира и аллопуринола при экстракции смесями хлорформ: изопропанол (50 % об.) и дихлорметан: изопропанол (50 % об.) приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Коэффициенты распределения ацикловира и аллопуринола при экстракции смесями органических растворителей (n=5; $\alpha=0,05$)

Экстрагент:	Вещество:	Ацикловир	Аллопуринол
хлороформ: изопропанол (50 % об.)		0,46±0,01	0,85±0,01
дихлорметан: изопропанол (50 % об.)		0,50±0,01	1,01±0,02

Как видно из полученных данных, смеси, содержащие дихлорметан, лучше экстрагируют изучаемые вещества. Следует отметить, что коэффициенты распределения ацикловира при экстракции данными смесями в 2,5-3,5 раза выше, чем при экстракции n- или изобутанолом. У аллопуринола, напротив, коэффициенты распределения при экстракции как смесями, так и n-бутанолом или изобутанолом получаются соизмеримыми.

ВЫВОДЫ

1. Определены оптимальные условия экстракции ацикловира и аллопуринола индивидуальными органическими растворителями и их смесями.

2. Рассчитаны коэффициенты распределения ацикловира и аллопуринола при экстракции индивидуальными органическими растворителями и их смесями.

3. Лучшими экстрагентами для экстракции ацикловира являются смеси дихлорметан: изопропанол (50 % об.) и хлороформ: изопропанол (50 % об.). Лучшими экстрагентами для экстракции аллопуринола являются n-бутанол, изобутанол и смеси дихлорметан: изопропанол (50 % об.), хлороформ: изопропанол (50 % об.).

4. В связи с относительно низкими коэффициентами распределения ацикловира и аллопуринола при пробоподготовке биоматериала для увеличения степени извлечения целесообразно использовать 3-5 кратный избыток экстрагента.

SUMMARY

M.L. Pivavar, A.I. Zhebentyaev
EXTRACTION OF ACICLOVIR
AND ALLOPURINOL BY ORGANIC SOLVENTS

The optimum conditions of extraction of aciclovir and allopurinol by individual organic solvents and their mixtures have been studied. Coefficients of distribution of aciclovir and allopurinol have been calculated in the extraction with 9 individual organic solvents and 2 mixtures as alkyl halogenides – alcohol. The basis of the mixture was presented by chloroform and dichloromethane. As additives we used polar organic solvents (isopropanol, n-butanol or isobutanol). It was found that mixtures of chloroform and dichloromethane with n-butanol or isobutanol are inefficient for the extraction of aciclovir and allopurinol. The best extractants for the extraction of aciclovir are mixtures of dichloromethane: isopropanol (50% vol.) and chloroform: isopropanol (50% vol.). The best extractants for the extraction of allopurinol are n-butanol, isobutanol and mixtures of dichloromethane: isopropanol (50% vol.), chloroform: isopropanol (50% vol.).

Key words: aciclovir, allopurinol, extraction, mixtures of organic solvents.

ЛИТЕРАТУРА

- 1.Справочник Видаль. Лекарственные препараты в Беларуси: Справочник. – М.:АстраФармСервис, 2009. – 944с.
- 2.Bahrami, G. Determination of acyclovir in human serum by high-performance liquid chromatography using liquid-liquid extraction

and its application in pharmacokinetic studies / G. Bahrami, Sh. Mirzaeei, A. Kiani // J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. – 2005. – Vol. 816, № 1-2. – P. 327-331.

3. Pharmacokinetics of acyclovir after intravenous infusion of acyclovir and after oral administration of acyclovir and its prodrug valacyclovir in healthy adult horses / B. Garré [et al] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2007. - Vol. 51, № 12. - P. 4308-4314.

4. Determination of acyclovir in horse plasma and body fluids by high-performance liquid chromatography combined with fluorescence detection and heated electrospray ionization tandem mass spectrometry / A. Maes [et al] // Biomed. Chromatogr. – 2009. – Vol. 23, № 2. – P. 132-140.

5. De-Vries, J.X. Simple determination of hydrochlorothiazide in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography / J.X. De-Vries, A. Voss // Biomed. Chromatogr. – 1993. – Vol. 7, № 1. – P. 12-14.

6. Мокшина, Н.Я. Явление синергизма при сорбции и экстракции биологически активных веществ / Н.Я. Мокшина, В.Ф. Селеменев, Г.Ю. Орос // Сорбцион. и хроматогр. проц. – 2002. - Т. 2, вып. 2. – С. 166-175.

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

8. Пивовар, М.Л. Изучение экстракции метилпроизводных ксантина бинарными смесями органических растворителей / М.Л. Пивовар, А.И. Жебентяев // Вестник фармации. – 2010. № 1. – С. 25-33.

Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
Витебский государственный
медицинский университет,
кафедра токсикологической
и аналитической химии,
тел. раб.: 8 (0212) 37-00-06,

Пивовар М.Л.

Поступила 02.09.2010 г.
