

фологічної структури внутрішніх органів.

2. Лікування ураженої печінки за допомогою фітозасобів сприяє послабленню токсичної дії ксенобіотика та запобігає розвитку дистрофічних і деструктивних процесів у цьому органі.

3. Отримані результати підтверджують попередні дослідження стосовно доцільності застосування лікарських рослин у комплексній терапії цукрового діабету II типу, ускладненого стеатогепатитом [4].

#### ЛІТЕРАТУРА

1. *Бабак О. Я., Колесникова Е. В.* Решенные и нерешенные вопросы терапии неалкогольной жировой болезни печени в рамках метаболического синдрома // Укр. терапевт. журнал. — 2006. — № 3. — С. 4-8.  
2. *Бабак О. Я., Колесникова Е. В.* Участие печени в формировании метаболического синдрома и инсулинорезистентности. Состояние проблемы // Сучасна гастроентерологія. — 2006. — № 4. — С. 8-12.  
3. *Волков В. И., Строна В. И.* Лечение ожирения — путь к снижению риска развития сердечно-сосудистых заболеваний // Здоров'я України. — 2006. — № 7. — С. 58-59.

4. *Гарник Т. П., Білоусова І. В.* Вивчення дії фітозасобів на моделі дексаметазонового діабету та токсичного гепатиту // Сучасна гастроентерологія. — 2007. — № 1 (33). — С. 40-45.

5. *Дороднева Е. Ф., Пугачева Т. А., Медведева И. В.* Метаболический синдром // Терапевт. архив. — 2002. — № 10. — С. 7-12.

6. *Каминский А. В.* Избыточная масса тела, ожирение, метаболический синдром и их лечение // Укр. мед. газета. — 2007. — № 1. — С. 16-18.

7. *Кравчун Н. О.* Стан ліпідного метаболізму та перекисне окислення ліпідів у хворих з різними виявами метаболічного синдрому // Укр. терапевт. журнал. — 2006. — № 2. — С. 39-42.

8. *Маньковский Б. Н.* Сегодня и завтра в лечении и профилактике сахарного диабета // Здоров'я України. — 2006. — № 14/1. — С. 18.

9. *Митченко Е. И.* Гендерные особенности метаболического синдрома и многофакторный подход к его лечению // Там же. — С. 38-39.

10. *Паньків В. І.* Стан ендокринологічної служби України та перспективи розвитку медичної допомоги хворим з ендокринною патологією // Там же. — С. 10.

11. *Варианты поражения гепатобилиарной системы у больных сахарным диабетом / Л. М. Пасиешвили, Л. Н. Бобро, Е. В. Шапкин и др.* // Врач. практика. — 2002. — № 1. — С. 36-38.

12. *Стефанов О. В.* Доклінічні дослідження лікарських засобів: Ме-

тодичні рекомендації. — К.: Видавничий дім «Авіценна», 2001. — 528 с.

13. *Ушкалова Е. Л.* Метформин: ренессанс при сахарном диабете 2 типа и перспективы при других заболеваниях, сопровождающихся инсулинорезистентностью // Здоров'я України. — 2006. — № 14/1. — С. 43-44.

14. *Фадеев Г. Д.* «Жировая печень»: этиопатогенез, диагностика, лечение // Сучасна гастроентерологія. — 2003. — № 3. — С. 9-17.

15. *Харченко Н. В., Анохіна С. В., Бойко С. В.* Нові підходи до корекції порушень ліпідного обміну у хворих з метаболічним синдромом // Там же. — 2006. — № 1. — С. 36-39.

16. *Хворостіна В. М., Моїсеєнко Т. А., Москаленко О. І.* Лікування жирової дистрофії печінки у хворих на цукровий діабет 1-го типу // Врач. практика. — 2002. — № 1. — С. 43-46.

17. *Шерлок Ш., Дули Дж.* Заболевания печени и желчных путей: Практическое руководство / Пер. с англ.; Под ред. З. Г. Апросиной, Н. А. Мухина. — М.: ГЭОТАР Медицина, 1999. — 864 с.

18. *Groop L.* Pathogenesis of Type 2 Diabetes: the relative contribution of insulin resistance and impaired insulin secretion // Intern. J. of Clin. Pract. — 2000. — Suppl. 113. — P. 3-13.

19. *Orth S.* Hyperglycemia and Dyslipidemia // The Metabolic Syndrome: Improving Treatment and prognosis: Abbot Laboratories Symposium Held on the occasion of 38 th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, 1 September, 2002. — Hungary, 2002. — P. 18-22.

УДК 615.033.07

Н. Л. Карпинчик<sup>1</sup>, О. В. Жук<sup>2</sup>

## РОЗРОБКА МЕТОДІВ ЕКСТРАКЦІЇ З БІОЛОГІЧНИХ СЕРЕДОВИЩ І ВИВЧЕННЯ МЕТАБОЛІЗМУ В ОРГАНІЗМІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН ПОХІДНИХ ТІОБАРБИТУРОВОЇ КИСЛОТИ

<sup>1</sup>Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,

<sup>2</sup>Опольський університет, Польща

### Вступ

Серед великої кількості психотропних лікарських засобів широкої популярності набули барбітурати [1; 2]. Заміна кисню на сірку при атомі вуглецю в положенні 2 молекули барбітуратів приводить до утворення похідних тіобарбітурової кислоти. Активність і ефективність дії цієї групи ліків багато в чому зале-

жить від таких факторів, як їхній метаболізм і фармакокінетика в організмі. Шляхи біотрансформації та розподілу в організмі похідних барбітурової кислоти достатньо вивчені [1; 3], однак практично відсутні подібні дослідження для тіобарбітурової кислоти та її похідних. Для кількісної оцінки процесів розподілу та метаболізму ліків в організмі першим кроком є виділення й іден-

тифікація фізіологічно активних сполук і продуктів їх біотрансформації з біосубстратів. Двофазна рідинно-рідинна екстракція є найбільш розповсюдженим методом екстракції з біологічних зразків лікарських засобів, що дозволяє виділити вихідні сполуки та їхні вільні метаболіти [4]. Для створення оптимальних умов екстракції лікарських речовин із біологічних середовищ



найчастіше використовуються модельні досліді (*in vitro*) з подальшим розрахунком метрологічних характеристик [4].

**Метою** даної роботи були розробка й оптимізація методів екстракції з біологічних середовищ аналогів мічених радіоактивним ізотопом [<sup>14</sup>C] похідних тіобарбітуратів і вивчення процесів їх метаболізму в організмі щурів.

### Матеріали та методи дослідження

Досліджувані сполуки <sup>14</sup>C-2-(β-діетиламіно)-етилмеркапто-5-ізопропіл-3,4-дигідропіримідино-6-он-4 гідрохлорид (I) і <sup>14</sup>C-5-ізопропіл-2-тіобарбітурова кислота (II) були синтезовані в ПНДЛ-5 ОНУ ім І. І. Мечникова. Питома активність I і II дорівнювала 0,77 і 1 Кі/моль відповідно. У модельних експериментах (*in vitro*) дані сполуки додавали до 1 мл нативної сечі щурів лінії Вістар, у досліді *in vivo* щурам вводили внутрішньочеревинно сполуки дозою 50 мг/кг. Зразки сечі збирали протягом 2 діб. Додаванням ацетатного (рН 2–3), фосфатного (рН 5–6) і бікарбонатного (рН 10) буферів змінювали рН проб. Екстракцію вільних метаболітів здійснювали хлороформом при співвідношенні зразка та розчинника 1 : 3. Вимірювання загального радіоактивного матеріалу в досліджуваних пробах проводили методом рідинної сцинтиляційної фотометрії на сцинтиляційному фотометрі Cambera Pakard Tri Carb 2700 TR (США).

Для вивчення метаболізму дані сполуки вводили щурам лінії Вістар масою 180–200 г внутрішньочеревинно дозою 200 мг/кг. Сечу збирали протягом 24 год досліді, сполуки екстрагували хлороформом при оптимальних рН і наносили на хроматографічні пластини “Silufol U-254”. Після попереднього очищення проб від коекстрактивних речовин у СС<sub>4</sub> хроматографуванням до нижнього краю пластинки, здійснювали зонну радіохроматографію в протилежному напрямку в системі хлороформ — спирт при

співвідношенні 9 : 4. Екстракцію з хроматографічної пластинки розділених сполук виконували ацетоном і визначали структуру вихідних сполук і їхніх метаболітів на мас-спектрометрі “Varian Mat 112” (США) при енергії іонізуючих електронів 50 еВ, max емісії 1,5 мА.

### Результати дослідження та їх обговорення

Для вивчення кінетики розподілу досліджуваних сполук I і II у досліді *in vitro* між органічною та водною фазами до зразків сечі експериментальних тварин, що містять радіоактивні зразки, додавали буфер, змінюючи тим самим рН розчину, і здійснювали п'ятикратну екстракцію хлороформом. Дані дослідження дозволяють визначити оптимум рН, при якому відбувається найбільш повна (за кількісними характеристиками) екстракція вільних метаболітів і відділення їх від водорозчинних і зв'язаних із білком. Результати проведеного дослідження подано в табл. 1 і на рис. 1.

Як видно з наведених результатів, кінетика загального радіоактивного матеріалу в хлороформних екстрактах сечі щурів при кислотній і нейтральній реакції є моноекспоненціальною, процес характеризується досить високою ефективністю перехо-

ду речовин в органічну фазу. Кінетика екстракції сполук органічним розчинником при рН 10 була нелінійною та характеризувалася найменшим їх вмістом в органічній фазі.

Регресійний аналіз залежності між значенням величин вмісту препарату і кількістю екстракцій (n) визначали методом найменших квадратів зважених величин логарифмів вмісту <sup>14</sup>C-продуктів. Формальний апарат розрахунків метрологічних параметрів двофазної рідинно-рідинної екстракції наведено у роботі [4]. Цей алгоритм дозволяє визначити константу розподілу речовини між фазами (K) і кількість необхідних екстракцій (n) для 95–99%-ї екстракції сполук із водної фази при заданому співвідношенні об'ємів фаз (П). Дані аналізу подано в табл. 2.

Результати модельних експериментів показали (див. табл. 2), що оптимум рН для екстракції досліджуваних сполук лежить у межах рН 3–6. Можна виділити з водного розчину двократною екстракцією хлороформом 95 % екстрагованих сполук органічним розчинником при співвідношенні водної й органічної фази 1 : (9–15).

Модельні експерименти з одержання метрологічних характеристик процесу екстракції вихідних сполук є лише початко-

Таблиця 1

**Вміст радіоактивного матеріалу у хлороформних екстрактах сечі щурів (досліді *in vitro*), С, імп·10<sup>3</sup>/(хв·мл)**

n	рН 2–3	рН 5–6	рН 10
	С	С	С
	I		
1	242,80±7,57	166,00±14,94	44,35±1,99
2	112,40±5,17	91,10±2,73	40,13±1,92
3	60,50±5,44	55,80±4,47	26,90±2,47
4	37,80±1,89	30,60±2,81	44,35±6,20
5	22,20±2,16	24,60±1,84	26,90±2,28
	II		
1	463,70±19,47	140,60±14,20	29,70±1,49
2	175,80±101,95	82,70±3,97	18,00±0,68
3	95,80±9,67	53,60±4,88	16,30±1,34
4	41,80±5,22	29,50±2,74	46,60±7,46
5	24,80±3,37	14,60±1,39	12,10±1,03



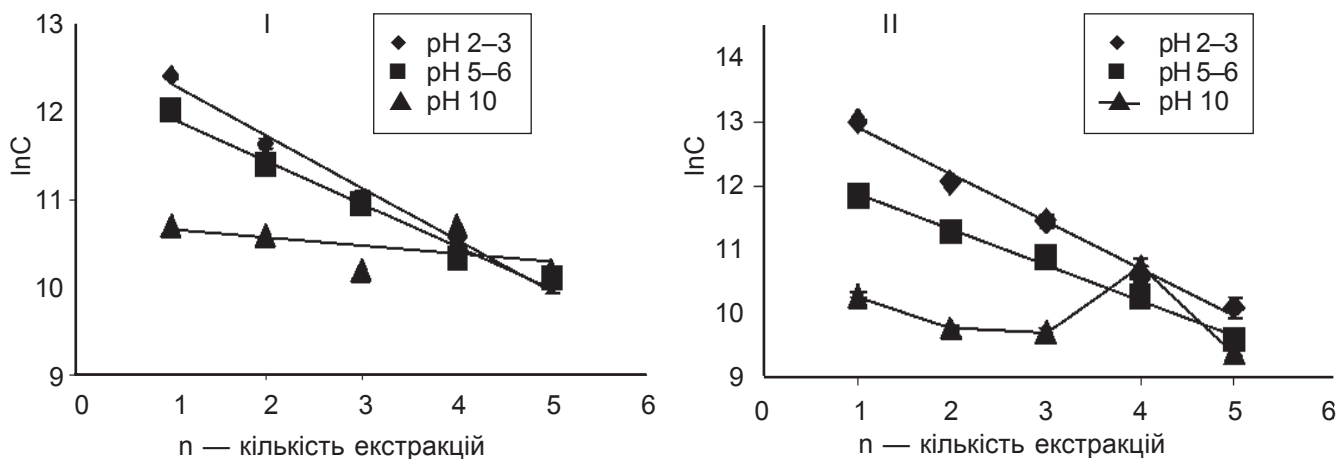


Рис. 1. Кінетика екстракції хлороформом сполук I і II залежно від рН розчину в модельних експериментах *in vitro*

Таблиця 2  
Кінетичні параметри двофазної екстракції сполук I і II залежно від рН розчину в модельних експериментах *in vitro*

Кінетичні параметри	I		II	
	рН 2-3	рН 5-6	рН 2-3	рН 5-6
$\ln C_0$	12,88±0,22	12,43±0,01	13,76±0,06	12,44±0,02
$\text{tg}\alpha$	0,590±0,006	0,490±0,004	0,77±0,03	0,550±0,007
K	0,280	0,230	0,386	0,246
$n_{0,95}$ при $\Gamma=3$	4,91	5,76	3,88	5,42
$\Gamma$ при $n=2$	12,4	15,09	8,99	14,11

вим етапом методичних розробок у фармакокінетиці. Найістотнішим фактором, що змінює фізико-хімічні характеристики вихідних сполук, є їх біотрансформація в організмі експериментальних тварин [5]. Крім того, у біологічних субстратах фазовий стан не ідентичний такому в модельних експериментах, тому наступним кроком у розробці ме-

тодів були дослідження кінетики екстракції загального радіоактивного матеріалу з добової сечі щурів після введення їм досліджуваних сполук. У зв'язку з неефективністю екстракції органічним розчинником сполук при рН 10 (див. табл. 1 і рис. 1), у подальшому вивчалася кінетика процесу екстракції тільки в кислотному та нейтральному се-

редовищі. Кінетика вмісту вихідних сполук та їхніх метаболітів у хлороформних екстрактах подана на рис. 2.

Як видно з наведених результатів на рис. 2, залежність логарифма вмісту загального радіоактивного матеріалу в хлороформних екстрактах від їхньої кількості лінійна, що дає можливість здійснити регресійний аналіз. Отримані параметри аналізу були використані для розрахунку метрологічних характеристик і здійснення оптимізації процесу екстракції. Результати розрахунків наведені в табл. 3.

На підставі метрологічних характеристик процесу екстракції було зроблено висновок про те, що оптимальними умовами для екстракції сполуки I і її метаболітів є кислотне середовище (рН 2-3) і дворазова екстракція при співвідношенні 1 : 18 біопроби й ор-

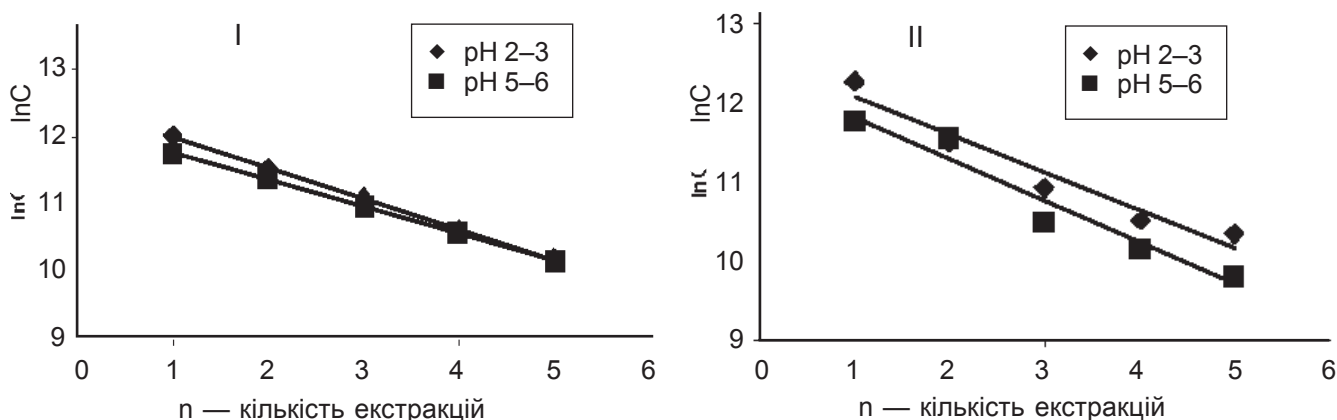


Рис. 2. Кінетика екстракції хлороформом сполук I і II залежно від рН розчину в дослідях *in vivo*

Метрологічні характеристики методу двофазної екстракції хлороформом похідних тіобарбітуратів зі зразків екстрактів сечі щурів

Кінетичні параметри	I		II	
	pH 2–3	pH 5–6	pH 2–3	pH 5–6
In C <sub>0</sub>	12,45±0,04	12,16±0,01	12,56±0,01	12,37±0,02
tgα	0,45±0,02	0,390±0,005	0,48±0,02	0,530±0,006
K	0,165	0,205	0,194	0,135
n <sub>0,95</sub> при П=3	7,43	6,24	6,51	7,50
П при n=2	21,04	16,93	18,27	26,71

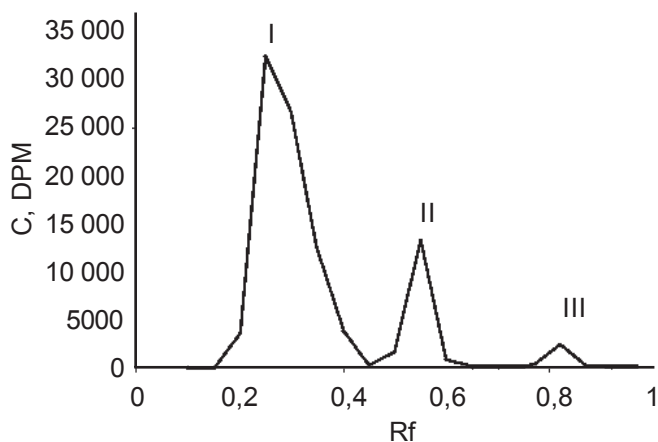


Рис. 3. Радіохроматограма хлороформних екстрактів сечі щурів у системі хлороформ — етанол (9 : 4) при введенні експериментальним тваринам <sup>14</sup>C-I

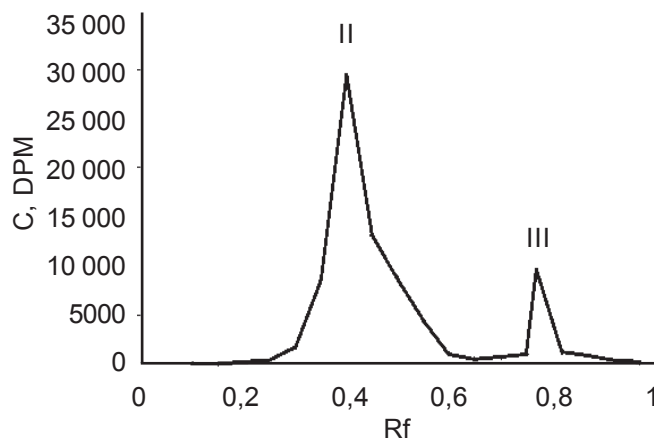


Рис. 4. Радіохроматограма хлороформних екстрактів сечі щурів у системі хлороформ — етанол (9 : 4) при введенні експериментальним тваринам <sup>14</sup>C-II

ганічного розчинника. Для сполуки II і продуктів її біотрансформації — pH 5–6 і співвідношення 1 : 17.

Наведені вище результати використовувалися в подальших дослідженнях фармакокінетики та біотрансформації досліджуваних препаратів. Використання методів екстракції, очищення від коекстрактивних речовин із подальшим розділенням та ідентифікацією структури за допомогою методів тонкошарової зонної радіохроматографії та мас-спектрометрії [6] дозволяє вивчати основні напрямки біотрансформації сполук.

Результати виділення, очищення та радіохроматографічного аналізу сполук I і II подані на рис. 3 і 4.

Радіохроматографічний аналіз (див. рис. 3) показав наявність вихідної сполуки — <sup>14</sup>C-I з Rf 0,25 і двох піків метаболітів із Rf 0,54 і Rf 0,85. Мас-спектрометричний аналіз свідчить, що метаболітами сполуки <sup>14</sup>C-I є

тіобарбітурова кислота (II) і продукт її біотрансформації — 5-ізопропілбарбітурова кислота (III).

Радіохроматограма вільних метаболітів <sup>14</sup>C-II демонструє (див. рис. 4) наявність вихідної сполуки з Rf 0,38 і піка з Rf 0,77, що відповідає ізопропілбарбітуровій кислоті (III). Необхідно відзначити, що процес заміни сірки на кисень є характерною рисою процесів метаболізму похідних тіобарбітурової кислоти і тіобарбітуратів [7].

#### Висновки

1. Оптимальними умовами для екстракції сполуки I та її метаболітів є pH 2–3 і дворазова екстракція хлороформом при співвідношенні 1 : 18 біопробі й органічного розчинника. Для сполуки II і продуктів її біотрансформації — pH 5–6 і співвідношення 1 : 17.

2. Продуктами біотрансформації сполуки I в організмі експериментальних тварин є тіо-

барбітурова кислота і продукт її біотрансформації — 5-ізопропілбарбітурова кислота.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Катцунг Б. Г. Базисная и клиническая фармакология. — М.: Биком; СПб.: Невский диалект, 2000.
2. Brust J. Neurological aspects of substance abuse. — Butterworth Heineemann, 2004. — 496 p.
3. Toxicology secrets. / L. Ling, R. Clark, T. Erickson, J. Trestrail. — Hanley and Belfus Medical, 2000. — 303 p.
4. Зиньковський В. Г., Головенко Н. Я., Жук О. В. Оптимизация экстракции лекарственных веществ из биологических сред // Хим.-фарм. журнал. — 1983. — № 3. — С. 361-364.
5. Головенко Н. Я. Физико-химическая фармакология. — Одесса: Астропринт, 2004.
6. Зиньковський В. Г. Біокінетика і структура нових психотропних препаратів, їх попередників і метаболітів: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. — Одеса, 1994. — 50 с.
7. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) investigation of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) reaction / D. Jardine, M. Antolovich, P. D. Prenzler, K. Roberts // J. Agric. Food Chem. — 2002. — N 6. — P. 1720-1724.

