сида калия и высушивание при 100°С в течение 30 минут;

- однократное элюирование в метаноле, обработка 500 мМ боратным буферным раствором с pH 9,6 и высушивание при 100°С в течение 30 минут.

Для пластин, модифицированных по первому и второму типу, дериватизацию проводили двумя способами: 1) в точку на линии старта вводили пробу амина (от 1 до 10 мкг) и высушивали, затем вводили 2 мкл 500 мМ боратного буферного раствора с pH 9,6 и 5 мкл раствор дансилхлорида с концентрацией 0,75 мг/мл в ацетоне; 2) в точку на линии старта вводили пробу амина (от 1 до 10 мкг) и высушивали, затем вводили 5 мкл раствор дансилхлорида с концентрацией 0,75 мг/мл в ацетоне и 2 мкл 500 мМ боратного буферного раствора с pH 9,6.

Для пластин, модифицированных по третьему и четвертому типу, дериватизацию проводили следующим способом: в точку на линии старта вводили пробу амина (от 1 до 10 мкг) и высушивали, затем вводили 5 мкл раствор дансилхлорида с концентрацией 0,75 мг/мл в ацетоне.

После проведения дериватизации пластины элюировали в системе растворителей хлороформ — метанол (9:1) в присутствии свидетелей — дансилкислоты (получали путем обработки дансилхлорида раствором калия гидроксида) и дансиламида (получали путем обработки дансилхлорида концентрированным раствором аммиака), высушивали и просматривали в УФ-свете (λ= 366 нм) — пятна дансилпроизводных изучаемых аминов светятся ярким желтым светом, дансиламида — бирюзовым, дансилкислоты — голубым, избыток дансилхлорида в УФ-свете не имеет окрашивания.

Необходимо отметить, что для пластин первого и второго типа использование второй методики не имело положительного результата, так же как и использование пластин четвертого типа. Во всех остальных случаях дериватизация прошла успешно, при этом наблюдалась значительное уменьшение времени протекания реакции — с 30-60 до 1-2 минут.

ФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КЕТОТИФЕНУ

Болотов В.В., Мирошниченко Ю.О.,
Клименко Л.Ю., Ахмедов Е.Ю.
Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна
Донецький національний медичний університет ім. М. Горького, м. Донецьк, Україна

Для кількісного визначення кетотифену в біологічних рідинах та витягах з біологічного матеріалу здебільшого застосовуються методи газорідинної та високоефективної рідинної хроматографії. Проте, в хіміко-токсикологічному аналізі дуже добре себе зарекомендували прості та експресні методики кількісного визначення з використанням оптичних методів аналізу, таких як спектрофотометрія та екстракційна фотометрія.

Для кількісного визначення кетотифену фумарату описано різноманітні спектрофотометричні та екстракційно-фотометричні методики, проте їх застосування обмежується лише аналізом лікарських форм. Мінімальна концентрація препарату, що може бути визначена за зазначеними методиками, не перевищує 20 мкг/мл.

У зв'язку з цим нами розроблено методики УФ-спектрофотометричного та екстракційно-фотометричного визначення кетотифену фумарату (з використанням кислотно-основного індикатора метилового оранжевого), що можуть бути застосовані для цілей хіміко-токсикологічного аналізу.

Для розробки методики спектрофотометричного визначення кетотифену фумарату нами було знято УФ-спектр абсорбції кетотифену фумарату та кетотифену у 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої. Паралельно було отримано УФ-спектр фумарової кислоти у 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої, молярна концентрація якого дорівнювала молярній концентрації досліджуваного розчину кетотифену фумарату.

Визначення проводили на спектрофотометрі СФ-46 у діапазоні довжин хвиль 220 — 350 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм; як розчин порівняння використовували 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої.

Максимум абсорбції для кетотифену та кетотифену фумарату спостерігали за однакової довжини хвилі 301 нм; для розчину фумарової кислоти поглинання за цієї довжини хвилі практично відсутнє (не перевищує фонових показників), тому зазначену довжину хвилі використовували для спектрофотометричного визначення кетотифену.

Світлопоглинання розчинів підлягає закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 2 мкг до 28 мкг в 1 мл розчину. Результати кількісного визначення кетотифену в розчинах за допомогою розробленої методики свідчать, що відносна невизначеність середнього результату становить ±1,71%.

Для розробки методики екстракційно-фотометричного визначення кетотифену використовували водні розчини кетотифену фумарату. Визначення проводили на фотоелектроколориметрі КФК-2 (світлофільтр з $\lambda_{еф}$ = 540 ± 10 мм). Як розчин порівняння використовували хлороформ.

Нами встановлено, що 0,02% розчин метилового оранжевого утворює з кетотифеном у кислому середовищі ацетатного буферного розчину іонні асоціати, що екстрагуються хлороформом.

Забарвлення розчинів іонних асоціатів виявилося мало інтенсивним, тому для підсилення чутливості методу утворені іонні асоціати руйнували додаванням до їх хлороформних розчинів 1% розчину кислоти сірчаної в абсолютному етанолі. При цьому одержували розчини, що мали значно вищу оптичну густину.

У процесі розробки найефективніших умов визначення було підібрано оптимальні об'єми розчину метилового оранжевого та хлороформу. Встановлено, що оптимальне значення кількості 0,02% розчину метилового оранжевого становить 5 мл, а іонні асоціати практично повністю екстрагуються в процесі одноразової екстракції 20 мл хлороформу. Також було підібрано оптимальне значення pH — 4,6 — та довжина кювети — 20 мм.

Світлопоглинання розчинів підлягає закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 10 мкг до 100 мкг кетотифену в пробі. Результати кількісного визначення кетотифену в розчинах за допомогою розробленої методики свідчать, що відносна невизначеність середнього результату становить ±1,69%.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ В ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ В КЛИНИЧЕСКОЙ ТОКСИКОЛОГИИ

Пыхтеева Е.Г.
Украинский НИИ медицины транспорта, Одесса

Металлотионеины (МТН) — семейство многофункциональных низкомолекулярных белков (≈7 кДа), которые играют центральную роль в обеспечении гомеостаза эссенциальных, детоксикации токсичных металлов (ТМ), а также в защите организма от различных стрессоров. Они синтезируются во всех организмах, начиная от дрожжей и заканчивая млекопитающими и человеком. Структурные особенности МТН определяются высоким содержанием остатков цистеина (21 аминокислота в наиболее распространенных изоформах МТН-1 и МТН-2), отсутствием в пептидной цепи ароматических аминокислот, высокой динамичностью вторичной структуры (двойная складчатость), двукластерной организацией третичной структуры, включающей в физиологических условиях 7 атомов Cu и Zn со значительной вариабельностью энергии координационных связей. Пул цинка в МТН является высокообмениваемым. Общепризнано, что именно МТН селективно доставляет цинк к местам синтеза цинксодержащих белков и обеспечивает передачу им ионов цинка. Именно биодоступность цинка в МТН отличает его от десятков других известных белков, осуществляющих транспорт цинка в клетке и межклеточном пространстве.

Уникальные свойства МТН, признание за ним защитных и регуляторных функций в патогенезе инфекционных, других воспалительных и дегенеративных патологических процессах и заболеваниях, в т.ч. нейродегенеративных и онкологических, привели к интенсивному поиску путей и способов применения данного белка в диагностических, терапевтических и профилактических целях. Исследования в этом направлении проводятся разными коллективами, в т.ч. и нашей лаборатории. Эти работы, как правило, пока имеют характер экспериментальных исследований. Позиция облегчается рядом специфических особенностей МТН, которые позволяют относительно легко индуцировать его синтез, осуществлять выделение и минимизировать действие других белковых молекул, которые могут обладать антигенными свойствами. К числу таких особенностей относятся такие, как: высокая термостабильность, минимальные видовые различия в последовательности аминокислот, числе аминокислотных остатков и относительно высокой устойчивости в металлизированном состоянии (Zn_7-МТН).

В экспериментах на белых мышах, крысах, кроликах стимулируемая введением ионов металлов, липополисахаридов, индукция синтеза МТН достигает одного порядка и более. При этом различные индукторы оказывают действие на различные звенья этого процесса. Они могут действовать путем экспрессии соответствующих генов, мРНК, либо индуцировать синтез на посттранскрипционном уровне. В ранние сроки воздействия (до 3 суток) в первую очередь имеет место мобилизация существующего пула МТН в клетках и внеклеточных биосубстратах. При использовании для этих целей ионов металлов на пороговом уровне происходит перераспределение компонентов в системе апо-МТН/МТН.

Активация биосинтеза МТН служит важным диагностическим маркером, характеризующим уровень подавления системы МТН патологическими процессами (например, при металлопатиях). Нами, в частности, обнаружено стойкое снижение содержания МТН в печени и почках при экспериментальном воздействии высокими дозами Cd, Hg, Pb, тогда как при малых дозах и концентрациях наблюдается имеет место стимуляция синтеза. Подобный эффект наблюдается при интоксикации гепатотропными ядами (CCl_4). Органические соединения ртути и другие нейротоксиканты (акриламид) вызывают усиление синтеза МТН в нервных клетках, который носит дозозависимый характер. Применение с терапевтической целью препаратов цинка, а также предварительное введение раствора МТН снижает токсические проявления при экспозиции ТМ и провоспалительными агентами (продукты термоокислительной деструкции ПВХ). В то же время вопросы терапевтического использования МТН должны решаться дифференциро-