

СОВМЕСТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ β - АДРЕНОБЛОКАТОРОВ ПРИ ПОМОЩИ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Будевич В. А.¹, Пасько Т. Н.¹, Тетюев А. М.¹, Синькевич Ю. В.²

¹ГУ «Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь»,

²Государственный комитет судебных экспертиз Республики Беларусь,
г. Минск

Ключевые слова: β -адреноблокаторы, тонкослойная хроматография, реактив Либермана, реактив Манделлина.

Резюме: В рамках работы проводился подбор наиболее оптимальных систем для тонкослойной хроматографии, а также подбор проявителей, позволяющих совместно идентифицировать выбранные для исследования образцы β -адреноблокаторов.

Resume: This work was devoted to development suitable thin-chromatographic systems and selection of revealing reagents for simultaneous identification of the β -blockers selected for the study.

Актуальность. β -Адреноблокаторы представляют собой лекарственные средства, действующие на периферические адренергические процессы, и, в частности, относятся к антиадренергическим препаратам. Механизм их действия основан на блокировании адренорецепторов, т.е. нарушении взаимодействия медиатора с адренореактивными системами без изменения процессов образования медиатора и выделения его из нервных окончаний [1]. Внедрение β -адреноблокаторов в медицину явилось одним из основных достижений фармакологии сердечно-сосудистой системы. Вначале эти препараты использовались только при лечении эссенциальной гипертензии, но в настоящее время их применяют и при стенокардии, аритмиях, мигрени, инфаркте миокарда, глаукоме [2].

Как и любой лекарственный препарат, β -адреноблокаторы, кроме целевых эффектов, имеют также и побочные. Так, к примеру, к ним относится угнетающее влияние на центральную нервную систему [1]. В результате неконтролируемый их прием может привести к серьезным отравлениям, вплоть до летальных. По данным Американской ассоциации центров контроля отравлений (ААРСС) в 2015 году в США было зарегистрировано 10577 случаев отравления β -адреноблокаторами, из которых 9,6% (1022) были средней и тяжелой степени; 82% (8706) отравлений были случайными. Чаще всего причиной отравления β -адреноблокаторами становился пропранолол [3].

В качестве одного из скрининговых методов в рамках проведения судебно-токсикологических экспертиз широко распространена тонкослойная хроматография (ТСХ) [4, 5], даже не смотря на наличие более чувствительных методов анализа, таких как газовая хроматография (ГХ) [6] или высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [7, 8]. Обусловлено это в первую очередь простотой данного метода, относительной универсальностью, быстротой исследования, способностью работы с образцами, содержащими значительное количество жирных соэкстрактивных веществ, а также низкой стоимостью. Использование ТСХ

позволяет за короткий промежуток времени сузить круг ксенобиотиков, которые могли стать причиной отравления.

Цель: Разработать системы для тонкослойной хроматографии, которые смогли бы стать универсальными и позволили бы проводить одновременное определение выбранных нами β -адреноблокаторов при их совместном нахождении в исследуемом образце.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использовались образцы субстанций β -адреноблокаторов: пропранолола гидрохлорид (CHANGZHOU YABANG Pharmaceutical Co., LTD, Китай), атенолол (Korpan, Индия), бисопролола фумарат (UNICHEM Laboratories LTD., Индия), карведилол (SUN Pharma, Индия), талинолол (Merck, Германия), а также образцы β -адреноблокаторов в лекарственной форме: метопролол (Метопролол таблетки 100 мг, Лекфарм, Беларусь), бетаксол (Бетаксол таблетки 20 мг, Белмедпрепараты, Беларусь), соталол (Соритмик таблетки 160 мг, Киевский витаминный завод, Украина) и небиволол (Небивомед таблетки 5 мг, Мед-интерпласт, Беларусь). ТСХ проводили с использованием пластины Merck Merck 25 DC-Alufolien 20x20 cm Kieselgel 60. Для активации пластин их выдерживали при 120°C в течение 60 мин в сушильном шкафу. В качестве проявителей были опробованы реактивы Драгендорфа по Мунье, Либермана, Манделина, Марки, Фреде, $\text{CuSO}_4 + \text{KI}$ и спиртовой раствор $\text{I}_2 + 10\% \text{HCl}$. Используемые в работе растворители были не хуже марки «ч.д.а.» и использовались без предварительной очистки.

Для пробоподготовки лекарственные субстанции растворяли в метиловом спирте для получения растворов с конечной концентрацией 1 мг/мл. Для подготовки к исследованию β -адреноблокаторов, находящихся в лекарственных формах, их таблетки предварительно измельчали и добавляли метиловый спирт (в расчете для получения конечной концентрации β -адреноблокатора 1 мг/мл), перемешивали и давали настояться в течение 30 мин. Затем центрифугировали, надосадочную жидкость отбирали и использовали в работе.

ТСХ проводили при комнатной температуре. Выбранные системы растворителей, перед тем как поместить их в хроматографические камеры, встряхивали в течение 15 мин, а после их добавления камеры выдерживали в течение 30 мин и только после этого проводили ТСХ. Для проведения ТСХ β -адреноблокаторы наносили в количестве 5 мкг на одно пятно. Для каждого β -адреноблокатора ТСХ проводили 3 раза.

Результаты и обсуждение.

В рамках этапа при проведении работы по разработке условий тонкослойной хроматографии были опробованы 8 систем растворителей, а также для исследуемых образцов β -адреноблокаторов были определены величины фактора удерживания (R_f) в каждой из систем (таблица 1).

Таблица 1. Установленные в результате ТСХ величины факторов удерживания (R_f)

№	Система	Образец
---	---------	---------

		Пропранолол	Атенолол	Бисопролол	Метопролол	Карведилол	Соталол	Бетаксолол	Небиволол	Талинолол
1	Толуол:ацетон:этиловый спирт:25% р-р аммиака (45:45:7,5:2,5)	0,51	0,09	0,42	0,39	0,72	0,24	0,44	0,73	0,31
2	Диоксан:хлороформ:ацетон:25% р-р аммиака (47,5:45:5:2,5)	0,40	0,07	0,37	0,37	0,67	0,13	0,39	0,56	0,13
3	Этилацетат:метиловый спирт:25% р-р аммиака(17:2:1)	0,60	0,19	0,50	0,48	0,70	0,27	0,52	0,44	0,40
4	Бензол:диоксан: 25% р-р аммиака (60:35:5)	0,34	0,00	0,25	0,25	0,38	0,05	0,29	0,16	0,08
5	Толуол:этиловый спирт: 25% р-р аммиака (40:20:1)	0,59	0,14	0,52	0,48	0,62	0,25	0,54	0,57	0,30
6	Хлороформ:метанол: 25% р-р аммиака (90:10:1)	0,17	0,02	0,15	0,13	0,27	0,07	0,17	0,19	0,04
7	н-бутиловый спирт:этиловый спирт:диэтиламин (5:1:1)	0,78	0,59	0,84	0,81	0,79	0,59	0,84	0,52	0,89
8	Этилацетат:ацетон25% р-р аммиака (50:45:5)	0,60	0,13	0,47	0,44	0,83	0,26	0,51	0,63	0,50

Примечание – в качестве проявителей использовали реактивы Либермана и Манделина

В итоге в качестве наиболее подходящих были выбраны системы № 1, 3, 5, 8, поскольку именно в данных системах пятна были компактными, а также в основном располагались в середине пластины.

Результаты определения чувствительности реактивов Драгендорфа по Мунье, Либермана, Манделина, Марки, Фреде, $\text{CuSO}_4 + \text{KI}$ и спиртовой раствор $\text{I}_2 + 10\% \text{HCl}$ представлены в таблице 2.

Таблица 2. Чувствительность реактивов

№	Название реактива	Минимальное количество субстанции, мкг на пятно								
		пропранолол	атенолол	бисопролол	метопролол	карведилол	соталол	бетаксолол	небиволол	талинолол
1	Драгендорф а по Мунье	1	20	10	5	0,5	5	1	0,05	3
2	Либермана	0,5	3	1	2	0,5	2	0,5	0,5	5
3	Манделина	0,5	3	1	1	0,5	1	2	1	5

4	Марки	2	>20	1	3	0,5	>20	1	1	>20
5	Фреде	1	20	>20	5	1	15	3	5	15
6	CuSO ₄ +KI	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
7	I ₂ + 10% HCl	0,5	0,5	5	5	5	5	0,5	0,5	1

Наиболее подходящими оказались реактивы Либермана и Манделина, а также реактив CuSO₄+KI, поскольку они имели наибольшую чувствительность по отношению к исследуемым соединениям, а также, в случае первых двух проявителей, пятна окрашивались в различные цвета (пропранолол – зеленый, атенолол, метопролол, бетаксолол и небиволол – коричневый, бисопролол – малиновый, карведилол – оливковый, соталол – желтый, талинолол – фиолетовый). В результате использование именно этих реактивов позволит упростить дальнейшую идентификацию, поскольку в таком случае будет учитываться не только величина фактора удерживания, а также и окраска пятен.

Работа выполнялась в Государственном комитете судебных экспертиз в рамках НИР на 2018–2019 гг. «Разработка методических рекомендаций по определению β-адреноблокаторов в биологических объектах».

Заключение. В результате с использованием разработанной методики становится возможным совместное определение выбранных образцов β-адреноблокаторов, а внедрение данной методики в практику Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь позволит увеличить скорость, повысить качество и надежность проводимых экспертиз.

Литература

1. Машковский, М.Д. β-Адреноблокаторы / М.Д. Машковский // Лекарственные средства / под ред. С.А. Машковского. – 16-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая волна, 2012. – С. 266–278.
2. Вартамян, Р.С. Адреноблокирующие препараты / Р.С. Вартамян // Синтез основных лекарственных средств / Р.С. Вартамян. – М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – Гл. 12. – С. 228–249.
3. Beta-Blocker Toxicity / M.M. Khalid, R.J. Hamilton [Electronic resource] : National Center for Biotechnology Information (NCBI). – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448097/>. – Date of access: 08.10.2018.
4. Бёккер, Ю. Тонкослойная хроматография / Ю. Бёккер // Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза : пер. с нем. / Ю. Бёккер ; под ред. В.С. Куровой, А.А. Курганова. – М.: ТЕХНОСФЕРА, 2009. – Гл. 5. – С. 263–317.
5. Poole, C.F. Thin-layer Chromatography / C.F. Poole // Clarke's Analysis of Drugs and Poisons / ed.: A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop. – 4th ed. – London: Pharmaceutical Press, 2011. – Ch. 39. – P. 600–635.
6. GC–MS method for the simultaneous determination of β-blockers, flavonoids, isoflavones and their metabolites in human urine / S. Magiera [et al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2011. – Vol. 56, No. 1. – P. 93–102.
7. Simultaneous determination of thirteen b-blockers and one metabolite by gradient high-performance liquid chromatography with photodiode-array UV detection / M. Delamoye [et al.] // Forensic Sci. Int. – 2004. – Vol. 141, No. 1. – P. 23–31.
8. Development of an LC–MS/MS method for the quantitation of 55 compounds prescribed in combined cardiovascular therapy / O. Gonzalez [et al.] // J. Chromatogr. B. – 2011. – Vol. 879, No. 3–4. –

Р. 243–252.

РЕПОЗИТОРИЙ БГМУ