



УДК 615. 099. 07 – 071 (476)

ИЗУЧЕНИЕ УСЛОВИЙ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ РИВАРОКСАБАНА ПРИ КЛИНИЧЕСКОЙ И СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ ОТРАВЛЕНИЙ

Борисевич С.Н., Курака А.А.

УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

Реферат. Лекарственный препарат ривароксабан применяется как антикоагулянт и может стать причиной острого отравления. Нами изучены условия тонкослойнохроматографического (ТСХ) определения ривароксабана в субстанции и биологической жидкости. Установлено, что оптимальные условия ТСХ-определения ривароксабана – использование подвижной фазы толуол-метанол-ацетонитрил (50 : 20 : 30) и УФ 254 нм в качестве способа проявления.

Ключевые слова: химико-токсикологический анализ; ривароксабан; хроматография; биожидкость.

Введение. В Республике Беларусь в настоящее время около 500 различных токсикантов вызывают наибольшее число острых отравлений. Сведения о структуре смертельных отравлений химической этиологии в нашей стране [1] показывают, что наиболее широкодоступным отравляющим веществом является этиловый спирт, на протяжении многих лет лидер по числу причин отравления не только в Беларуси, но и в других странах. Второе место в структуре острых экзогенных отравлений с летальным исходом принадлежит угарному газу. Отравления лекарственными средствами на третьем месте. Из общего числа – 0,6 % составляют отравления детей и подростков. В структуре смерти детей от отравлений ведущее место принадлежит отравлению окисью углерода, на втором месте – отравления этиловым спиртом и третью позицию также занимают лекарственные средства.

Исследования на наличие токсинов в биологических объектах живых лиц проводятся химико-токсикологическими лабораториями (ХТЛ), они составная часть клинической лабораторной службы Республики Беларусь. ХТЛ организаций здравоохранения осуществляют свою деятельность в составе специализированных (психиатрических, наркологических) диспансеров, а также при больницах скорой медицинской помощи. В регионах республики химико-токсикологические исследования выполняются централизованно в ХТЛ областных и некоторых районных центров. Часть исследований (в том числе исследования на тяжелые металлы и микроэлементы) проводится в Национальной антидопинговой лаборатории.

В ХТЛ производятся лабораторные исследования в целях обнаружения и количествен-

ного определения широкого спектра химических соединений (спиртов, наркотических, психотропных, лекарственных и других токсических веществ), причин острого отравления. Идентификация токсикантов осуществляется с помощью лабораторных методов химико-токсикологического анализа с применением современного аналитического оборудования. Поскольку анамнез не всегда объективен, а для большинства лекарственных средств и других токсинов картина отравления недостаточно специфична, для диагностики экзогенной интоксикации первостепенное значение имеют результаты химико-токсикологического исследования. Только с помощью химических методов можно определить токсиканты в различных, в том числе биологических, объектах и поставить окончательный диагноз отравления. Для обнаружения токсических соединений применяют методы, дающие достоверные результаты в течение не более 2–3 часов. Таким требованиям удовлетворяют экспрессные, высокочувствительные и специфичные, требующие малых количеств биоматериала методы тонкослойной и инструментальной хроматографии, иммуноферментного анализа, масс-спектрометрии, некоторые хромогенные и микрокристаллоскопические реакции. Методологические подходы к лабораторному выявлению различных групп токсических соединений регламентированы методиками и инструкциями по применению, утвержденными Министерством здравоохранения.

Диагностика отравлений, закончившихся смертельным исходом, ответственная и непростая задача, при ее решении судебно-медицинский эксперт тщательно анализирует следственные данные об обстоятельствах смерти,

историю болезни, результаты судебно-медицинского исследования трупа и лабораторных исследований.

Приоритетная роль в судебно-медицинской диагностике конкретного вида смертельного отравления принадлежит результатам судебно-химического исследования, направленного на выделение, обнаружение и количественное определение токсикологически значимого вещества, которое могло явиться причиной смерти. Только с помощью современных высокоспецифичных и чувствительных судебно-химических методов можно произвести определение токсикантов в биообъекте или вещественных доказательствах и сделать заключение о причине смерти [2; 3].

Судебно-химическая служба нашей страны является подразделением Главного управления судебно-медицинских экспертиз Государственного комитета судебных экспертиз (ГКСЭ) Республики Беларусь. В ходе судебно-химического исследования используются различные методы изолирования, очистки, идентификации и количественного определения токсических веществ. Государственный медицинский судебный эксперт-химик имеет право самостоятельно выбирать методы проведения экспертизы из числа рекомендованных. Методики обнаружения и количественного определения утверждаются Межведомственным научно-методическим советом ГКСЭ, методики в обязательном порядке содержат информацию о чувствительности методов: о пределе обнаружения и пределе количественного определения токсикантов. Методики количественного определения валидированы.

Резерв в снижении смертности населения от острого экзогенного отравления заключается в своевременной его диагностике, эффективном лечении, в целенаправленном воздействии на предотвратимые причины.

Таким образом, разработка экспрессных, чувствительных и специфичных методов исследования ксенобиотиков, в том числе лекарственных веществ, актуальная задача токсикологической химии. Метод хроматографии в тонких слоях сорбента широко используется в химико-токсикологическом анализе, так как является экспрессным, селективным, чувствительным, доступным и экономически выгодным.

Особенность токсикологического анализа лекарств в чрезвычайно большом количестве соединений, которые могут быть причиной

отравления, и число которых из года в год увеличивается. Наиболее значимы с позиций токсикологии лекарственные средства, действующие на ЦНС, препараты, влияющие на сердечно-сосудистую и дыхательную системы.

Лекарственный препарат ривароксабан применяется как пероральный антикоагулянт из группы прямых ингибиторов фактора Xa. Он используется для лечения тромбоза глубоких вен и легочной эмболии, для предотвращения образования тромбов при фибрилляции предсердий и после операций на бедре или колене. Общие побочные эффекты включают кровотечение, к другим побочным эффектам относят гематому позвоночника и анафилаксию. Неясно, безопасно ли использование ривароксабана во время беременности и кормления грудью. Препарат может стать причиной острого отравления. Разработан и выпускается немецкой фармацевтической компанией Bayer под торговым названием «Касарлто» [4].

Исследования последних лет *in silico* показывают возможность взаимодействия ривароксабана с глюкокиназой, которая участвует в фосфорилировании глюкозы клеток печени и поджелудочной железы. Эти результаты открывают перспективу ривароксабану для разработки лекарственных средств на его основе для лечения диабета 2-го типа и расширению его использования в медицинской практике [5].

Цель работы – поиск оптимальных условий тонкослойнохроматографического определения ривароксабана и разработка методики его определения в моче.

Материалы и методы. Были испытаны разные подвижные фазы для хроматографического разделения ривароксабана, изучены различные способы проявления хроматограмм и возможность определения ривароксабана в субстанции в модельной биожидкости и в моче (в качестве метода пробоподготовки биообъекта к исследованию использовалась жидкость-жидкостная экстракция). В результате получена методика ТСХ-определения ривароксабана в биожидкости.

Ривароксабан (ИЮПАК (S)-5-хлоро-N-тиофен-2-карбоксамид) содержит ряд азот- и кислородсодержащих гетероциклов (рис. 1), за счет чего проявляет слабые основные свойства. Это учитывалось при определении условий жидкость-жидкостной экстракции и подборе хроматографических систем и методов проявления хроматограмм.

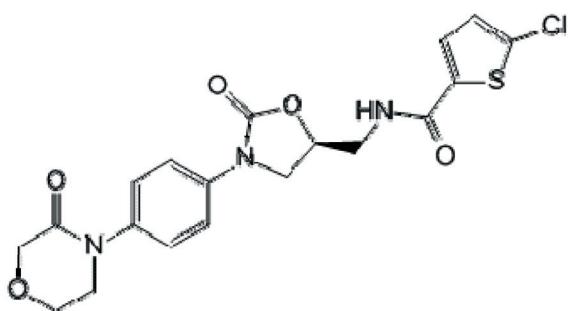


Рис. 1. Структурная формула ривароксабана

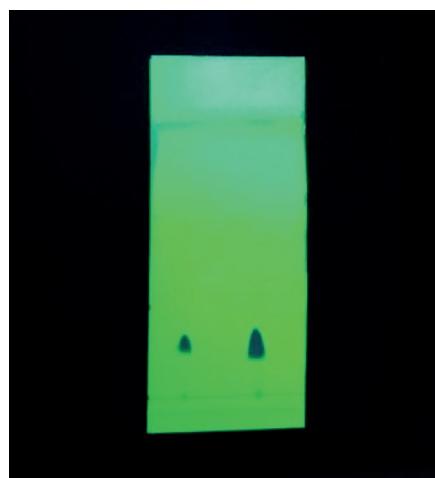


Рис. 2. Результат хроматографического разделения в системе 1 и проявления путем облучения в УФ-свете при 254 нм



Рис. 3. Результат хроматографического разделения в системе 4 и проявления путем опрыскивания 0,05н. раствором KMnO4

Результаты и их обсуждение. Для поиска оптимальных условий ТСХ-определения ривароксабана в модельной биологической жидкости (раствор ривароксабана в воде 0,2 мг/мл) использована следующая методика: 10 мл биожидкости помещают в делительную воронку,

добавляют 25 %-й раствор аммиака до pH 10 по универсальному индикатору и экстрагируют 15 мл хлороформа. Хлороформный слой отделяют с помощью делительной воронки, хлороформ отгоняют, остаток в выпарительной чашке растворяют в нескольких каплях хлороформа. Полученный раствор наносят на стартовую линию хроматографической пластиинки «Merck».

На стартовую линию также наносят 2–3 капли стандартного раствора ривароксабана в хлороформе (2 мг/мл). Проводят хроматографирование в теоретически подобранных системах растворителей и проявление хроматограммы путем облучения в УФ-свете при 254 нм и опрыскивания 0,05 н. раствором KMnO4.

После хроматографирования модельной биожидкости в различных подвижных фазах получены следующие результаты (табл. 1).

Таблица 1 – Результаты хроматографирования ривароксабана в разных системах растворителей (проявители – 0,05н. раствор KMnO4 и УФ-облучение 254 нм)

№ п/п	Подвижная фаза	Скорость движения подвижной фазы	Значение Rf
1.	Хлороформ-этанол (97 : 3)	0,3 см/мин	0,2 (рис. 2)
2.	Хлороформ-бензол-муравьиная кислота-ацетилацетон (49 : 48 : 2 : 1)	0,3 см/мин	0,7
3.	Толуол-метанол-ацетонитрил (50 : 20 : 30)	0,3 см/мин	0,66
4.	Хлороформ-этанол-вода (2 : 0,5 : 3)	0,15 см/мин	0,15 (рис. 3)
5.	Толуол-этилацетат-метанол (60 : 30 : 10)	0,3 см/мин	0,81

Как видно из табл. 1, наибольшую скорость хроматографирования обеспечивают системы 1, 2, 3, 5. Эффективность разделения наибольшая в системе 3 ($R_f = 0,66$). Для работы выбрана система толуол-метанол-ацетонитрил (50 : 20 : 30).

В ходе исследования были испытаны различные проявители (табл. 2).

толуол-метанол-ацетонитрил (50 : 20 : 30) и проявление хроматограммы путем облучения в УФ-свете при 254 нм

Заключение. Оптимальными условиями проведения ТСХ-определения ривароксабана в модельной биологической жидкости является использование подвижной фазы «толу-

Таблица 2 – Результаты проявления хроматограмм различными способами
(подвижная фаза – толуол-метанол-ацетонитрил (50 : 20 : 30))

№ п/п	Реактив-проявитель (способ обработки хроматографической пластинки)	Результаты проявления хроматограмм
1.	5 % раствор хлорида железа (III) FeCl_3 (опрыскивание с последующим нагреванием 20 мин при 100 °C)	Белое пятно на желтом фоне
2.	Облучение в УФ-свете при 254 нм	Ярко-малиновое пятно на зеленом фоне
3.	Раствор Бушарда-Вагнера (I_2 в растворе КІ) (опрыскивание)	Коричневое пятно (быстро исчезающее)
4.	0,05 н. раствор перманганата калия (KMnO_4) (опрыскивание)	Белое пятно на розовом фоне
5.	Облучение в УФ-свете при 365 нм	Нет эффекта

Наиболее эффективными проявителями явились облучение в УФ-свете при 254 нм (рис. 4) и опрыскивание 5% раствором хлорида железа (III) с последующим нагреванием.

Найденные оптимальные условия тонкослойнохроматографического разделения ривароксабана и последующего проявления хроматограммы использованы для определения ривароксабана в моче.

Таким образом, нами разработана методика для ТСХ-определения ривароксабана в моче:

10 мл мочи помещают в делительную воронку, добавляют 25 %-ый раствор аммиака до pH 10 по универсальному индикатору и экстрагируют 15 мл хлороформа. Хлороформный слой отделяют с помощью делительной воронки, хлороформ отгоняют, остаток в выпарительной чашке растворяют в нескольких каплях хлороформа. Полученный раствор наносят на стартовую линию хроматографической пластиинки «Merck».

На стартовую линию также наносят 2–3 капли стандартного раствора ривароксабана в хлороформе (2 мг/мл). Проводят хроматографирование в системе растворителей толу-

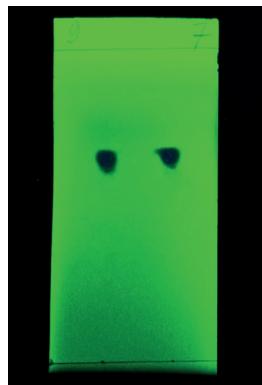


Рис. 4. Результат хроматографического разделения в системе 3 и проявления путем облучения в УФ-свете при 254 нм

толуол-метанол-ацетонитрил» (50 : 20 : 30) и УФ 254 нм в качестве способа проявления хроматограммы. Данная хроматографическая система и способ проявления хроматограммы использованы для определения ривароксабана в моче. Хроматографическая система экономически выгодна и доступна. Результаты значимы как для химико-токсикологического анализа, так и для образовательного процесса.

Список цитируемых источников

1. Борисевич, С.Н. Структура и динамика острых отравлений с летальным исходом в Республике Беларусь в 2016–2018 годах / С.Н. Борисевич, Л.Н. Грищенкова, А.Н. Богдан, Л.Н. Боровикова // Лаб. диагностика. Восточная Европа. – 2020 – № 4. – С. 62–68.



2. Борисевич, С.Н. Методы лабораторной диагностики острых отравлений / С.Н. Борисевич. – Минск : Выш. Школа. – 2022. – 231 с.
3. Боровикова, Л.Н. Современная лабораторная диагностика состояний интоксикации, вызванных злоупотреблением этиловым спиртом / Л.Н. Боровикова // Лаб. диагностика. Восточная Европа. – 2012. – № 1. – С. 119–126.
4. Ксарелто: Инструкция по применению, противопоказания, состав, 3D-упаковка. Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента rlsnet.ru
5. Лахвич, Ф.Ф. Исследование *in silico* аффинности ривароксабана к глюкокиназе / Ф.Ф. Лахвич, О.Н. Ринейская // Медицинский журнал. – 2023. – № 2. – С. 62–66.

**RESEARCH OF CONDITIONS FOR CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF RIVAROXABAN
IN CLINICAL AND FORENSIC CHEMICAL DIAGNOSIS OF POISONING**

Borisevitch S.N., Kuraka A.A.

Belarussian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The drug rivaroxaban is used as an anticoagulant and can cause acute poisoning. We have studied the conditions for thin layer chromatographic (TLC) determination of rivaroxaban in substances and biological fluids. It has been established that the optimal conditions for TLC determination of rivaroxaban are the use of the mobile phase toluene-methanol-acetonitrile (50 : 20 : 30) and UV 254 nm as a demonstration method.

Keywords: chemical and toxicological analysis; rivaroxaban; chromatography; biofluid.