

Е.С. Мельников,
аспирант кафедры фармацевтической и
токсикологической химии Первого МГМУ
им. И.М. Сеченова

М.В. Белова,
к.фарм.н., доцент кафедры фармацевтической
и токсикологической химии Первого МГМУ
им. И.М. Сеченова

E.S. Melnikov,
post-graduate student of the chair of pharmaceutical
and toxicological chemistry of the First MSMU
named after I.M. Sechenov

M.V. Belova,
PhD, associate professor of the chair of pharmaceutical
and toxicological chemistry of the First MSMU
named after I.M. Sechenov

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОСТРЫХ ОТРАВЛЕНИЙ ГИПОТЕНЗИВНЫМИ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ СРЕДСТВАМИ

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR LABORATORY DIAGNOSTICS OF ACUTE HYPOTENSIVE DRUGS POISONING

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

Мария Владимировна Белова, доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии

Адрес: 119019, г. Москва, ул. Никитский бульвар, д. 13

Телефон: 8 (495) 691–13–92

E-mail: pharma@bk.ru

Статья принята к печати: 28.11.2012

Аннотация. Разработана методика экспрессного определения гипотензивных лекарственных средств (атенолол, пропранолол, нифедипин, эналаприл, верапамил) в образцах мочи больных с острыми отравлениями. Подобраны условия для групповой идентификации гипотензивных лекарственных средств методом ТСХ. Анализ с помощью ГХ-МС позволяет обнаружить как нативные вещества, так и их метаболиты. Разработанная методика анализа гипотензивных лекарственных веществ может быть использована для диагностики острых отравлений ими.

Annotation. The method of express detection of hypotensive drugs (atenolol, propranolol, nifedipine, enalapril and verapamil) in urine samples of patients with acute poisonings was developed. The optimum conditions of group identification of hypotensive drugs using TLC were found. Analysis by GC-MS allows to detect both the native substances and their metabolites. The developed method of analysis of antihypertensive drugs can be used for the diagnosis of acute poisoning.

Ключевые слова. Лекарственные средства, острые отравления, лабораторная диагностика.

Key words. Drugs, acute poisoning, laboratory diagnostics.

ВВЕДЕНИЕ

По статистике отравления гипотензивными препаратами составляют 5% от всех острых отравлений и 11% от отравлений лекарственными средствами [1]. При этом наибольшее токсикологическое значение имеют атенолол, пропранолол, бисопролол, метопролол, нифедипин, эналаприл и верапамил.

Острые отравления указанными препаратами имеют сходные симптомы, но требуют разных подходов к лечению, поэтому необходима методика точного и экспрессного обнаружения токсикантов в моче больных. Исследуемые вещества сильно различаются по своим физико-химическим свойствам, что вызывает трудности при аналитическом скрининге [2]. Среди современных методов обнаружения

большинство исследователей отдает предпочтение хроматографическим методам (ТСХ, ГХ, ВЭЖХ) [3–11]. В практике химико-токсикологических лабораторий широко используется ТСХ как скрининговый метод. Достоинствами ТСХ являются доступность, экспрессность, однако метод не всегда обладает достаточной селективностью. ГХ-МС используется как подтверждающий метод анализа благодаря высокой чувствительности и селективности. Целью исследования было создание методики аналитического обнаружения гипотензивных лекарственных средств для диагностики острых отравлений.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Анализ методом ТСХ проводили на пластинах Macherey–Nagel POLYGRAM® SIL G/UV₂₅₄ (Германия) со слоем сорбента silica gel UV₂₅₄ 0,25 mm в качестве неподвижной фазы. Для приготовления подвижных фаз использовали толуол (хч), изопропанол (чда), хлороформ (хч), этанол 96%, этилацетат (хч), ацетон (хч), концентрированный раствор аммиака (осч), ледяную уксусную кислоту (хч). Проявление пластин проводили с помощью реактива Драгендорфа (модифицированный) [12], реактива Либермана [13] и смесью концентрированных серной и азотной (хч) кислот в соотношении 1:1. Анализ методом ГХ-МС проводили на приборе Thermo Trace GC Ultra с масс-спектрометрическим детектором DSQ II (США). Колонка TR-5MS, длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина пленки неподвижной жидкой фазы 0,25 мкм. Газ-носитель — гелий. Использовалась скрининговая температурная программа от 50 до 280°C. Детектирование проводилось по полному ионному току в диапазоне m/z 45–650, ионизация электронным ударом с энергией 70 эВ. Для идентификации веществ использовалась компьютерная библиотека масс-спектров Pflieger, Maurer & Weber Library for Drugs and Pesticides. Стандартные растворы лекарственных веществ в этилацетате готовили из субстанций методом серийных разведений. Пробоподготовка образцов мочи про-

изводилась путем жидкость-жидкостной экстракции с использованием готовых экстракционных систем Toxi-tube A и Toxi-tube B (Varian, США).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для анализа методом ТСХ для веществ нейтрального и основного характера (атенолол, пропранолол, верапамил, нифедипин) были выбраны следующие подвижные фазы: толуол — изопропанол — конц. раствор аммиака (5:4:1), хлороформ — этанол (9:1), этилацетат — этанол — конц. раствор аммиака (10:30:1). Для эналаприла как вещества слабощелочного характера были выбраны следующие подвижные фазы: ацетон — ледяная уксусная кислота (20:1), хлороформ — ацетон — ледяная уксусная кислота (10:2:2). Перед проведением анализа хроматографическая камера насыщалась парами подвижной фазы в течение 15 мин. На линию старта пластинки наносили по 5 мкл стандартных растворов лекарственных веществ в концентрации 500 мкг/мл. Пластинки помещались в хроматографическую камеру, и проводилось разделение методом восходящего хроматографирования. Детектирование веществ осуществляли по гашению флюоресценции в УФ-свете; окрашиванию после обработки модифицированным реактивом Драгендорфа, реактивом Либермана, смесью концентрированных серной и азотной кислот (1:1). При пробоподготовке в Toxi-tube помещали 3 мл мочи больного. Проводили экстракцию на шейкере с частотой 100 об./мин в течение 3 мин. Далее фазы разделяли центрифугирование в течение 5 мин со скоростью 3200 об./мин. Отбирали органическую фазу (верхний слой), упаривали досуха. Сухой остаток перерастворяли в 200 мкл этилацетата.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Значения коэффициентов подвижности (R_f) для гипотензивных лекарственных веществ в различных системах растворителей, установленные в ходе эксперимента с использованием ТСХ, приведены в табл. 1.

Таблица 1.

R_f исследуемых гипотензивных веществ в различных системах растворителей

Подвижная фаза	Атенолол	Пропранолол	Верапамил	Нифедипин	Эналаприл
толуол — изопропанол — конц. раствор аммиака (5:4:1)	0,30	0,51	1	1	—
хлороформ — этанол (9:1)	0,02	0,23	0,51	0,83	—
этилацетат — этанол — конц. раствор аммиака (10:30:1)	0,27	0,43	0,61	0,94	—
ацетон — ледяная уксусная кислота (20:1)	—	—	—	—	0,79
хлороформ — ацетон — ледяная уксусная кислота (10:2:2)	—	—	—	—	0,54

Таблица 2.

Окрашивание пятен гипотензивных лекарственных веществ с различными проявляющими реактивами

Вещество \ Реактив	Реактив Драгендорфа	Реактив Либермана	H ₂ SO ₄ – HNO ₃ (1:1)
Атенолол	Оранжевый	Светло-кирпичный, переходящий в бесцветный	Серо-коричневый, слабый
Пропранолол	Оранжевый	Сине-зеленый, переходящий в зеленый	Светло-оранжевый, переходящий в желто-зеленый
Верапамил	Желто-оранжевый	Серо-коричневый, кирпично-красная кайма при нагревании	Малиновый, переходящий в серо-коричневый
Нифедипин	Желтый	Желтый с коричневатой каймой	Ярко-желтый
Эналаприл	Желто-оранжевый	Оранжевый, переходящий в бурый	Коричневато-желтый

Среди опробованных подвижных фаз наиболее полного разделения веществ удается добиться в системе хлороформ — этанол (9:1). Однако, эта система не подходит для элюирования эналаприла. Поскольку пятна близких по физико-химическим свойствам гипотензивных лекарственных веществ находятся в одной зоне, для их разделения необходимо элюирование и повторное разделение в частной системе растворителей или использование более селективного аналитического метода (ГХ, ВЭЖХ). При рассмотрении пластины в УФ-свете пятна всех веществ выглядят как зоны гашения флуоресценции. В табл. 2 указаны результаты проведения цветных реакций исследуемых лекарственных веществ с проявляющими реактивами.

Реактив Драгендорфа селективен в отношении азотистых оснований. Все исследуемые вещества имеют основной атом азота, поэтому реактив Драгендорфа не специфичен по отношению ни к какому из веществ. Реактив Либермана достаточно специфичен в отношении пропранолола, однако с остальными веществами он дает окраски, которые похожи между собой. Смесь концентрированных серной и азотной кислот также дает с разными веществами во многом схожие окрашивания. В целом, идентификация гипотензивных лекарственных веществ по реакциям окрашивания носит субъективный характер.

Разработанная методика ТСХ была применена для обнаружения гипотензивных лекарственных средств в моче больных с острыми отравлениями этими препаратами. В зонах, соответствующих гипотензивным лекарственным веществам, наблюдалось перекрытие пятен, поэтому было произведено элюирование этих зон этилацетатом для последующего анализа методом ГХ-МС. Времена удерживания и важнейшие ионы масс-спектров приведены в табл. 3. Также были идентифицированы некоторые метаболиты исследуемых лекарственных веществ, которые, вероятно, создавали помехи при идентификации методом ТСХ.

Таблица 3.

Времена удерживания, характеристические ионы гипотензивных лекарственных веществ

tR, мин.	Вещество	m/z
10,65	Пропранолол	72; 115; 144
13,92	Атенолол	72; 107; 222
14,56	Нифедипин	329; 284; 224
16,37	Эналаприл	254; 208; 358
24,88	Верапамил	303; 304; 150

Таким образом, предложенная методика ТСХ может быть использована как экспрессный предварительный метод групповой идентификации гипотензивных лекарственных веществ для целей клинической токсикологии. Для достижения большей селективности необходимо сочетание ТСХ с ГХ-МС. ТСХ может служить методом дополнительной пробоподготовки образца перед ГХ-МС исследованием, поскольку обеспечивает очистку экстракта биологической пробы от соэкстрактивных веществ.

Список литературы

1. Медицинская токсикология: национальное руководство / Под ред. Лужникова Е.А. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. — 928 с.
2. Фланаган Р.Дж. и др. Основы аналитической токсикологии. — Женева, 1997. — 363 с.
3. Sathe S.R., Bari S.B. Acta chromatographica. — 2007. — Vol. 19. — P. 270–278.
4. Vandana B.P., Vinod B.N., Subhash P.G. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. — 2000. — Vol. 23(4). — P. 623–627.
5. Pujos E., Cren-Olivé C., Paisse O. et al. // Journal of Chromatography B. — 2009. — Vol. 877. — P. 4007–4014.

6. *Czerwińska K., Wyszomirska E., Kaniewska T.* Acta Poloniae Pharmaceutica: Drug Research. — 2001. — Vol. 58(5). — P. 331–338.
7. *Gonzalez O., Iriarte G., Ricoa E.* et al. Journal of Chromatography B. — 2010. — Vol. 878. — P. 2685–2692.
8. *Kristoffersen L., Øiestad E.L., Opdal M.S.* et al. Journal of Chromatography B. — 2007. — Vol. 850. — P. 147–160.
9. *Gonzalez O., Alonso R.M., Ferreiros N.* et al. Journal of Chromatography B. — 2011. — Vol. 879. P. 243–252.
10. *Gu Q., Chena X., Zhong D.* et al. Journal of Chromatography B. — 2004. — Vol. 813. — P. 337–342.
11. *Wang D., Jiang K., Yang S.* et al. Journal of Chromatography B. — 2011. — Vol. 879. — P. 1827–1832.
12. Государственная фармакопея Российской Федерации. Научный центр экспертизы средств медицинского применения. — М., 2008. — Ч. 1. — 359 с.
13. *Brittain H.G., McLeish M.J.* Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients. — 1998. — Vol. 25. — P. 106.