

УДК 615.214+615.224].099.074:54.056'06:543.42'54

ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ НА МЕТОПРОЛОЛ И КВЕТИАПИН

© 2012 Т.Х. Вергейчик, В.А. Линникова, Г.Б. Гуськова

Пятигорская государственная фармацевтическая академия

Поступила в редакцию 26.09.2012

Приведены методы изолирования метопролола и кветиапина из мочи, крови, печени, почек для целей химико-токсикологического и судебно-химического анализа. Описаны методы обнаружения метопролола и кветиапина в извлечениях из объектов с помощью ТСХ, ВЭЖХ, УФ-спектрофотометрии (для кветиапина рекомендован расчет 2-ой производной по спектру для уточнения положения максимума поглощения). Для количественного определения использованы методы ВЭЖХ и УФ-спектрофотометрия.

Ключевые слова: *метопролол, кветиапин, химико-токсикологический анализ*

Метопролол и кветиапин находят широкое применение в медицинской практике. Метопролол является избирательным β -адреноблокатором и используется в качестве антигипертензивного и антиаритмического средства. Кветиапин относится к числу антипсихотических нейролептиков и его назначают при шизофрении, острых и хронических психозах. Оба препарата выпускаются в виде таблеток в дозировке от 25 до 100 мг, кветиапин до 300 мг. Они быстро всасываются из ЖКТ, выводятся почками с мочой. При применении метопролола и кветиапина отмечен ряд побочных эффектов [3, 7]. Описаны случаи передозировки и летального исхода при приеме в больших дозах [4, 5].

Цель работы: разработка способов изолирования, обнаружения и определения метопролола и кветиапина для целей химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

В качестве объектов были выбраны кровь, моча (для возможности оценки тяжести отравления и контроля степени выведения из организма в процессе лечения и детоксикации), печень, почки (для анализа в случае смертельного исхода). Предварительно нами было установлено, что метопролол и кветиапин экстрагируются в количестве до 98% из водных растворов хлороформом при значениях pH 8-10 в присутствии электролитов (натрия хлорида, натрия и аммония

сульфата). Разработку каждой методики проводили на 6 модельных смесях. К навеске объекта добавляли определенное количество препарата (кровь 0,64-0,8 мг/мл, моча 0,04-0,24 мг/мл, печень, почки 0,2-0,48 мг/г). По три опыта были контрольными (в них препарат не добавляли).

Изолирование метопролола и кветиапина из крови. К навеске крови (5 мл) добавляли безводный натрий сульфат (для метопролола) или аммония сульфат (для кветиапина) до получения густой однородной массы, подщелачивали 25% раствором аммиака до pH 10. Затем настаивали трижды по 5 минут при перемешивании с хлороформом (для метопролола) или со смесью в равных долях хлороформа и спирта этилового (для кветиапина). Экстракты объединяли, испаряли до сухих остатков, которые растворяли в 3 мл спирта этилового (кветиапин) или в 6 мл смеси (1:1) спирта этилового и воды очищенной (метопролол) и подвергали анализу.

Изолирование метопролола и кветиапина из мочи проводили, используя методику и реагенты, предложенные в системе «Toxi-Lab» [6]. По 2 мл мочи помещали в экстракционные пробирки, содержащие электролит и экстрагент фирмы производителя. Смесь перемешивали в течение 2 минут и центрифугировали 5 минут при 2500 об/мин. С помощью шприца отбирали из каждого опыта органическую фазу, делили её на 2 части и помещали в алюминиевые концентриционные чашки, которые вставляли в специальные лунки системы OMEGA-12, испаряли до сухого остатка на подогревающей пластине. Полученные остатки растворяли в 3 мл спирта этилового (кветиапин) или в 6 мл смеси этилового спирта и воды очищенной (1:1) (метопролол) и исследовали.

Вергейчик Тамара Харитоновна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры токсикологической химии. E-mail: en-vergeichik@mail.ru

Линникова Валентина Акимовна, кандидат фармацевтических наук старший преподаватель кафедры токсикологической химии

Гуськова Галина Багдасаровна, преподаватель кафедры токсикологической химии

Изолирование метопролола и кветиапина из печени и почек. Измельченные навески объектов (печени, почек) массой 25-50 г заливали водой очищенной (1:1), подкисляли раствором щавелевой кислоты до pH 2 и настаивали 2 раза по 2 и 1 часу. Водные извлечения сливали, объединяли, процеживали через слой ваты в делительные воронки и экстрагировали хлороформом 3 раза порциями по 15-20 мл с целью очистки от эндогенных соединений. Затем водную фазу подщелачивали 25% раствором аммиака и трижды экстрагировали хлороформом теми же объемами. Объединенные экстракты центрифугировали с целью расслаивания образовавшейся эмульсии. Органическую фазу испаряли в фарфоровых чашках досуха. Сухие остатки растворяли в 6 мл спирта этилового (кветиапин) или в 3 мл смеси этилового спирта и воды очищенной (1:1) (метопролол) и анализировали.

Для обнаружения выделенных из объектов метопролола и кветиапина использовали хроматографию в тонком слое сорбента, УФ-спектрофотометрию, высокоэффективную жидкостную хроматографию.

Хроматография в тонком слое сорбента. Анализ проводили на пластинах «Сорбфил», «Силуфол УФ-254», используя одномерную восходящую хроматографию и 2 системы растворителей. Первая система: хлороформ-ацетон – 25% аммиак (12:24:1), вторая система: диоксан-хлороформ-ацетон – 25% аммиак (47,5:45:5:2,5). Насыщение камеры парами растворителей составляло не менее 30-40 минут. В качестве «свидетелей» на пластины наносили стандартные образцы кветиапина в количестве 12 мкг и метопролола – 10 мкг. Для обнаружения исследуемых веществ пластины просматривали при длине волны 254 нм (наблюдали гашение флуоресценции на месте расположения веществ). При детекции реактивом Драгендорфа обнаруживали пятна, окрашенные в оранжевый цвет. При этом пятна «свидетелей» и веществ, выделенных из объектов, имели одинаковую окраску и значения Rf. Значение Rf для метопролола в первой системе растворителей составило 0,51-0,52, для кветиапина – 0,65-0,68; во второй системе растворителей значение Rf составило для метопролола – 0,46-0,48, для кветиапина – 0,69-0,73. В указанных условиях соэкстрактивные соединения находились вне зоны расположения исследуемых веществ. Предел обнаружения метопролола и кветиапина с помощью ТСХ составляет 6-8 мкг в исследуемой пробе.

УФ-спектрофотометрия. Для анализа использовали спектрофотометр СФ-54 и интервал длин волн 220-320 нм. Метопролол в водно-спиртовых растворах экстрактов обнаруживался в виде четко выраженного максимума при длине

волны 278 ± 2 нм. Фоновое поглощение составило в экстрактах из почек 0,09-0,11, в экстрактах из печени и мочи 0,13-0,19, в экстрактах из крови 0,08-0,09. Предел обнаружения метопролола составил 12,5 мкг в 1 мл исследуемого раствора.

В спектре поглощения спиртовых растворов экстрактов из объектов и стандартного образца кветиапина четких максимумов обнаружить не удалось, и спектральная кривая в области 220-320 нм имела дугообразный вид. Чтобы выяснить положение максимума нами была рассчитана 2-я производная по всему спектру [1, 2]. В результате расчетов установлено, что РСО и кветиапин, выделенный из биологических объектов, имеют хорошо обозначенные максимумы при длинах волн 250 и 290 нм. Предел обнаружения кветиапина с помощью УФ-спектрофотометрии – 10,9 мкг в 1 мл исследуемого раствора.

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Анализ проводили, используя микроколоночный жидкостный хроматограф Милихром А-02 производства ЗАО «Эконова». Для обоих веществ использовали хроматографические колонки размером 2×75 мм, заполненные обращено-фазовым сорбентом «ProntoSil 120-5 C₁₈ AQ». Для метопролола: подвижная фаза элюент А – 0,1% раствор трифторуксусной кислоты; элюент Б – ацетонитрил; изократический режим 40% ацетонитрила в течение 9 минут; объем вводимой пробы 10 мкл. Аналитическая длина волны 278 нм. Для кветиапина: подвижная фаза элюент А – 2% раствор трифторуксусной кислоты; элюент Б – ацетонитрил; градиентный режим от 10% до 45% элюента Б за минуту; объем вводимой пробы 15 мкл. Аналитическая длина волны 290 нм. Скорость подачи подвижной фазы в обоих случаях 100 мкл/мин, время измерения 0,18 сек, температура термостата 35⁰С. В указанных условиях метопролол детектируется со временем удерживания $2,4 \pm 0,2$ мин, кветиапин – $11,61 \pm 0,4$ мин.

Таблица 1. Результаты определения метопролола в биологических объектах методом ВЭЖХ

Объект анализа	Время удерживания, мин	Площадь пика опыта*	Процент изолирования*
метопролол РСО	$2,4 \pm 0,1$	-	-
моча	2,4	1,58	$61,5 \pm 5,6$
кровь	2,5	2,89	$56,1 \pm 5,4$
печень	2,4	16,08	$65,6 \pm 5,1$
почки	2,45	35,65	$80,9 \pm 8,5$

Примечание: здесь и в табл. 2* - среднее значение из 6 опытов

Для количественного определения, выделенных из биологических объектов изучаемых веществ, использовали УФ-спектрофотометрию и ВЭЖХ. Для определения с помощью ВЭЖХ хроматографировали растворы стандартных образцов метопролола и кветиапина и полученные извлечения из шести основных и трех контрольных опытов.

Расчет содержания метопролола и кветиапина проводили по формуле:

$$X = \frac{S_{\text{исп}} \times C_{\text{ст}} \times V}{S_{\text{ст}} \times a} \times 100\%$$

где: $S_{\text{исп}}$ – площади пиков извлечений из объектов, содержащих метопролол или кветиапин; $S_{\text{ст}}$ – площадь пика раствора рабочего стандартного образца; $C_{\text{ст}}$ – концентрация раствора рабочего стандартного образца метопролола или кветиапина в мг/мл или мг/г; a – количество метопролола и кветиапина в исследуемой навеске объекта (в модельной смеси), мг; V – объем этилового спирта или смеси этилового спирта и воды очищенной (1:1) взятых для растворения сухих остатков, мл.

Полученные данные приведены в таблицах 1 и 2.

Таблица 2. Результаты определения кветиапина в биологических объектах методом ВЭЖХ

Объект анализа	Время удерживания, мин	Площадь пика опыта*	Процент изолирования*
кветиапин РСО	11,23±0,15	—	—
моча	10,96	101,46	40,10±5,3
кровь	11,23	183,28	72,44±3,65
печень	11,23	149,03	58,90±4,08
почки	11,36	146,41	57,66±5,89

Таблица 3. Результаты определения метопролола в биологических объектах методом УФ-спектрофотометрии

Объект анализа	λ_{max}	$A_{\text{фона}}^*$	$A_{\text{опыта}}^{**}$	Процент изолирования**
метопролол РСО	278±2 нм	—	—	—
моча	279	0,16	0,318	63,70±6,09
кровь	278	0,08	0,342	69,30±6,57
печень	279	0,16	0,326	65,90±5,08
почки	278	0,11	0,643	80,69±8,28

Примечание: здесь и в табл. 4 ** - среднее из 6 опытов

Для определения выделенных из биологических объектов исследуемых веществ с помощью УФ-спектрофотометрии расчет вели по оптической плотности стандартных образцов метопролола и кветиапина. Оптическую плотность

исследуемых растворов – экстрактов из биологических объектов измеряли на фоне оптической плотности контрольных опытов. Полученные результаты приведены в таблицах 3 и 4.

Таблица 4. Результаты определения кветиапина в биологических объектах методом УФ-спектрофотометрии

Объект анализа	λ_{max} по 2-ой производной	$A_{\text{фона}}^*$	$A_{\text{опыта}}^{**}$	Процент изолирования**
кветиапин РСО	250±2 нм	—	—	—
моча	251	0,17	0,560	43,16±4,64
кровь	250	0,09	0,680	56,08±3,86
печень	252	0,13	0,578	44,46±5,10
почки	250	0,11	0,550	42,75±4,89

Выводы: разработанные методики рекомендуются для использования в практике химико-токсикологических и судебно-химических лабораторий при подозрении на отравление метопрололом или кветиапином.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Вергейчик, Т.Х.* Определение карбамазепина в трупном материале с использованием производной спектрофотометрии / *Т.Х. Вергейчик, С.В. Шабалин* // Судеб.- мед. экспертиза. 1993. № 1. С. 32-34.
2. *Вергейчик, Т.Х.* Применение метода ортогональных функций для подавления фона при судебно-химическом определении некоторых пестицидов в биологическом материале / *Т.Х. Вергейчик, Е.Н. Вергейчик, В.А. Линникова* и др. // Судеб.- мед. экспертиза. 1984. Т.27, № 3. С. 47-49.
3. *Машковский, М.Д.* Лекарственные средства. – 15-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: ООО «Издательство Новая Волна», 2005. С. 270.
4. *Мингазов, А.А.* Случай острого отравления лекарственным веществом группы избирательных (кардиоселективных) β_1 – адреноблокаторов- метопрололом (эгилок) // Проблемы экспертизы в медицине. 2007. Т. 7, №2. С. 70-71.
5. *Мингазов, А.А.* Случай смерти от отравления кветиапином // Проблемы экспертизы в медицине. 2007. Т. 7, №3. С. 62-63.
6. «Toxi-Lab» – Инструкция по эксплуатации системы обнаружения наркотиков «Toxi- лаб А-плюс».
7. Регистр лекарственных средств России РЛС Энциклопедия лекарств. 19-й вып. /под ред. *Г.Л. Вышковского*. – М.: РЛС-МЕДИА, 2010. С. 569.

CHEMICAL AND TOXICOLOGICAL ANALYSIS OF METOPROLOL AND KVETIAPIN IN BIOLOGICAL OBJECTS

© 2012 Т.Кh.Vergeychik, V.A. Linnikova, G.B. Guskova

Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy

Isolation methods of metoprolol and kvetiapin from urine, blood, a liver, nephros for chemical and toxicological and judicial chemical analysis are given. Detection methods of metoprolol and kvetiapin in extraction from objects by means of TLC, by HPLC, UV-spectrophotometry (for kvetiapin calculation of the 2nd derivative for a range for specification of provision the maximum of UV-absorption is recommended) are described. For the quantitative definition the methods of HPLC and UV-spectrophotometry are used.

Key words: *metoprolol, kvetiapin, chemical and toxicological analysis*

*Tamara Vergeychik, Candidate of Pharmacy, Associate Professor
at the Department of Toxicological Chemistry. E-mail:
en-vergeichik@mail.ru*

*Valentina Linnikova, Candidate of Pharmacy, Senior Lecturer at the
Department of Toxicological Chemistry*

Galina Guskova, Teacher at the Department of Toxicological Chemistry