

SUMMARY

METHOD OF DETERMINING SELENIUM
IN THE MULTIVITAMIN- MINERAL
COMPLEXES

S.V.Serezhkina, A.A.Malyarenko,
A.V.Petrov

The analysis of the methods of determining selenium in the application to the selenium-containing multivitamin- mineral complexes is carried out and the method of the quantitative determination of the content of selenium in these objects is proposed. The procedure proposed makes it possible to make the quantitative determination of selenium in the multivitamin- mineral complexes in the range 15-25 mcg to the tablet with a mass of 4 g and it is characterized with a good reproducibility. The method of determining selenium proposed is economical, it is sufficient to simple, it does not require the application of organic solvents, expensive reagents and equipment.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кактурский Л.В., Строчкова Л.С., Истомин А.А. Гипоселенозы// Архив патол. –1990. - Т.52, № 12.- С. 3-8.
2. Абдуллаев Г.М. О содержании селена у здоровых лиц и при некоторых гематологических заболеваниях// Селен в биологии.- 1976.- Т. I.- С. 136-139.
3. Савина М.Д., Кудрин А.Н. Перспектива поиска антиаритмических средств с противоишемическим эффектом среди селеносодержащих веществ// Фармация.- 1992.- Т.XLI, № 1.- С. 39-46.
4. Николаев С.В., Кудрин А.Н., Кактурский Л.В. Лечебно-профилактическое влияние селенита натрия на течение экспериментального инфаркта миокарда// Фармакол. и токсикол.- 1976.- № 5.- С. 571-574.
5. Чернышева Л.Ф., Кудрин А.Н. Новые высокоактивные антигистаминные органические препараты селена// Фармация.- 1971.- № 4.-С. 57-63.
6. Кудрин А.Н., Коган А.Х., Королев В.В. и др. Свободнорадикальное окисление липидов в патогенезе инфаркта миокарда и лечебно-профилактическая роль антиоксидантов – селенита натрия и его

комбинации с витамином Е// Кардиология. –1978. № 2. -С. 115 – 118.

7. Бэгналл К. Химия селена, теллура и полония. Атомиздат, 1971. 170 с.

8. Назаренко Н.И., Ермаков А.Н. Аналитическая химия селена и теллура. Наука, 1971.

9. Уильямс Дж. Определение анионов. М., Химия, 1982. - 342 с.

10. Яцимирский К.В. Кинетические методы анализа. М., Химия, 1967. –199 с.

11. Назаренко И.И., Кислова И.В. Высокочувствительный метод определения миграционных форм селена в природных водах// ЖАХ.- 1978.- № 9.- С. 1857-1859.

12. Лебедев П.А., Лебедев А.А. Модификация спектрофлуориметрического метода определения селена в крови// Химико-фарм. журнал. –1996. –Т. 30, № 10. – С. 54-55.

13. Рекомендация. Государственная система обеспечения единства измерений. Характеристики погрешностей результатов количественного химического анализа. Алгоритмы оценивания (МИ 2336-95)/ Уральский НИИ метрологии. – Екатеринбург, 1995. –44 с.

14. Чарыков А.К. Математическая обработка результатов химического анализа. –Л.: Химия, 1984. -165 с.

Поступила 03.05.2006 г.

А.И.Жебентяев, В.М.Ёршик, В.И.Фадеев

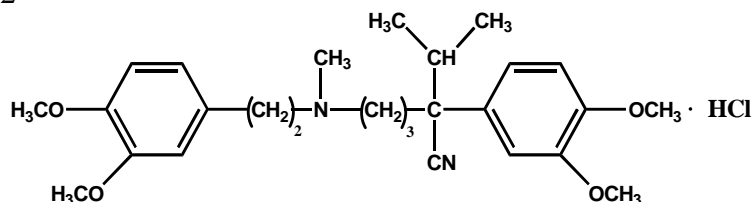
**ТВЁРДОФАЗНАЯ ЭКСТРАКЦИЯ И
ОБНАРУЖЕНИЕ ВЕРАПАМИЛА МЕ-
ТОДОМ ТСХ В ПЛАЗМЕ КРОВИ**

Витебский государственный
медицинский университет

Разработана методика обнаружения верапамила в плазме крови методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в сочетании с твёрдофазной экстракцией. Методика экономична, обладает низкими пределами обнаружения (0,5 мкг/мл).

ВВЕДЕНИЕ

Верапамила гидрохлорид 5-[(3,4-диметоксифенилэтил)-метиламино]-2-(3,4-диметокси-фенил)-2-



изопропилвалеронитрила гидрохлорид обладает антиаритмической активностью, применяется при лечении стенокардии, гипертонии.

Содержание верапамила в плазме крови достигает 0,068 мкг/мл при пероральном применении [1]. При передозировках токсическая концентрация верапамила в плазме крови может составлять от 0,63 мкг/мл [2] до 3-8 мкг/мл [1]. Согласно литературным данным, обнаружение верапамила в плазме крови осуществляют методами высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с жидкость-жидкостной экстракцией [2, 3], методами газовой хроматографии в сочетании с твёрдофазной экстракцией [4] или жидкость-жидкостной экстракцией [5].

Целью настоящей работы является разработка методики изолирования верапамила из плазмы крови и идентификации методом ТСХ на доступных хроматографических пластинках «Сорбфил» российского производства.

При разработке методики идентификации верапамила методом ТСХ в плазме крови необходимо учесть ряд факторов:

- низкие концентрации верапамила в плазме крови (токсические концентрации порядка 1 мкг/мл);
- метод ТСХ обладает невысокой чувствительностью;
- содержание в пробе значительного количества компонентов матрицы;
- объём пробы, взятой на анализ, невелик (обычно 1-5 мл).

Поэтому при анализе необходима предварительная очистка пробы, конечный объём пробы должен быть минимален и обеспечивать возможность полного нанесения пробы на пластинки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали верапамил фармакопейной чистоты. В качестве стандартного раствора применяли этанольный раствор верапамила концентрации 1 мкг/мл. Использовали донорскую плазму крови. Изолирование верапамила проводили методом твёрдофазной экстракции на модифицированном силикагеле силосорб-100-С₁₆. Хроматографическое разделение проводили на пластинках «Сорбфил» (Россия) с закреплённым слоем силикагеля СТХ-1А при температуре 291-293 К. Высота подъёма фронта подвижной фазы составляла 9 см. Хроматографирование проводили в насыщенной парами подвижной фазы камере (общий объём 0,45 л, объём подвижной фазы 10 мл). В качестве подвижной фазы использовали бинарную смесь ацетон-вода 8:2 (при таком соотношении компонентов подвижной фазы верапамил отделяется от сопутствующих веществ, а значение подвижности R_f составляет 0,62-0,66). После высушивания пластины проявляли реактивом Драгендорфа, модифицированным по Мунье [6]. При этом получались контрастные жёлтые пятна анализируемого вещества на белом фоне. Для сравнительного анализа содержания верапамила в хроматографических пятнах хроматограммы сканировали с помощью сканера MUSTEK 1200USB с разрешением 300 dpi в цветовом режиме RGB 24 бит. Полученные изображения хроматограмм обрабатывали программой «ScionImage». В работе использовали цитратный (рН 4), фосфатные (рН 5-8), боратные (рН 9-11) буферные растворы [7], 0,01 М раствор NaOH (рН 12).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе предварительных исследований установлено, что жидкость-жидкостная экстракция не позволяет обеспечить достаточную степень извлечения аналита из матрицы для обнаружения методом ТСХ. Извлечение верапамила без предварительного осаждения белков требует значительного разбавления пробы ацетоном, ацетонитрилом и т.д. При предварительном осаждении белков с помощью трихлоруксусной кислоты, фосфорномолибденовой кислоты, солей тяжёлых металлов не удастся выделить лекарственное вещество вследствие значительной адсорбции на осадке.

Наиболее оптимальным способом

выделения верапамила из плазмы является твёрдофазная экстракция (ТФЭ). Схема изолирования представлена на рис. 1.

Метод твёрдофазной экстракции позволяет выделять аналит без предварительного осаждения белков в малом объёме органического растворителя. Логарифм коэффициента распределения верапамила в системе вода-октанол составляет 3,79 [8]. Поэтому наиболее подходящими сорбентами для изолирования верапамила могут быть модифицированные силикагели S_8 , S_{16} , S_{18} , сополимеры стирола и дивинилбензола, активированные угли. Для изолирования верапамила из плазмы был выбран доступный сорбент S_{16} Российского производства.

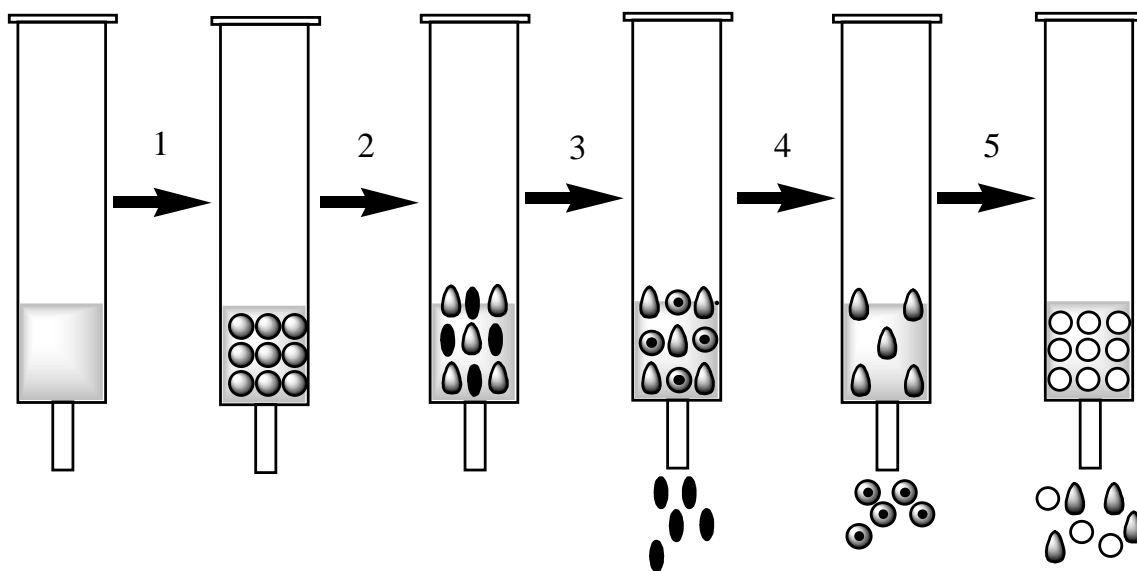


Рис. 1. Схема твёрдофазной экстракции верапамила из плазмы крови

● — аналит; ● — компоненты матрицы; ○ — растворитель а;
 ⊙ — растворитель б; ○ — растворитель с

1. кондиционирование патрона с сорбентом; 2 — пропускание исследуемого объекта через патрон с сорбентом; 3 — промывка водой и органическими растворителями; 4 — высушивание сорбента; 5 — элюирование.

Подбор оптимального режима элюирования сорбированных лекарственных веществ

При подборе оптимального элюента необходимо обеспечить полноту и по возможности селективность элюирования лекарственных веществ, сорбированных методом ТФЭ. Поскольку после стадии

элюирования следует стадия упаривания досуха, объём элюата должен быть минимален, а элюирующая жидкость достаточно летуча. Этим требованиям удовлетворяют спирты (метиловый, этиловый), смеси спиртов с кислотами, диэтиловый эфир.

При подборе оптимального элюента патроны твёрдофазной экстракции (поли-

пропиленовые трубки с внутренним диаметром 9 мм, высотой 60 мм, заполняли 100 мг сорбента силасорб-100-С₁₆) кондиционировали 96% этанолом 15 минут, после чего промывали 10% этанолом. Вносили по 3 мл растворов верапамила в концентрации 1 мкг/мл (с добавкой 10% этанола), после сорбции сорбент высушивали в токе воздуха и элюировали различными элюентами (1 мл). Элюат выпаривали в пробирке до объёма 10 мкл в токе азота и количественно наносили на пластинку ТСХ. В пробирку вносили 100 мкл 96%

этанол, вновь упаривали до 10 мкл и количественно переносили на пластинку ТСХ. Хроматографировали в системе ацетон:вода 8:2. Пластинку высушивали, проявляли реактивом Драгендорфа по Мунье [6] методом погружения. Проявленную пластинку сканировали и синий канал полученных изображений обрабатывали с помощью «ScionImage». Для примера на рис. 2 представлена зависимость площади хроматографических пиков верапамила от природы элюента.

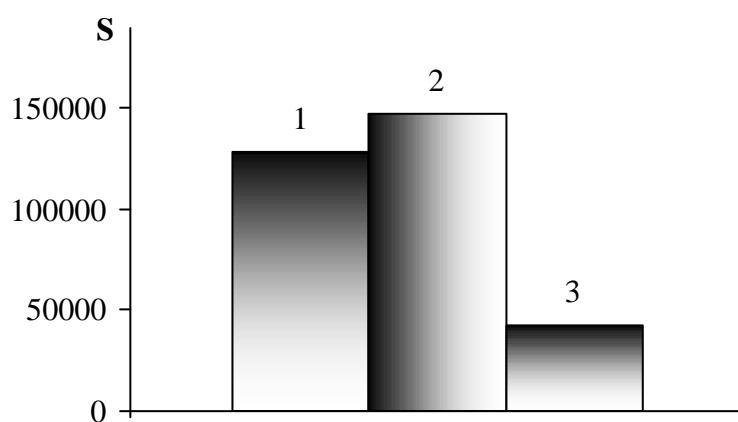


Рис. 2. Влияние природы элюента на площадь хроматографических пиков верапамила
1. метанол; 2. этанол; 3. 4% раствор уксусной кислоты в этаноле

При использовании эфира элюат в значительной степени загрязнён компонентами матрицы, в результате чего при хроматографировании происходит перегрузка хроматографических пластинок липидами и не удаётся идентифицировать пятна исследуемых лекарственных веществ. Таким образом, наиболее полное элюирование анализов с колонок ТФЭ осуществляется этанолом.

Подбор состава органического растворителя для селективной промывки патрона ТФЭ

Промывку патронов ТФЭ обычно осуществляют этанолом различной крепости. При этом подбирают такой промывающий растворитель, чтобы максимально

очистить сорбент от компонентов матрицы при минимальных потерях аналита.

Патроны ТФЭ с сорбированным верапамилем промывали 3 мл (объём патрона ТФЭ) этанола различной крепости. После высушивания сорбента в токе воздуха элюировали аналит оптимальным объёмом 96% этанола, упаривали и количественно переносили на пластинку ТСХ. После хроматографирования сухого остатка проявленные пластинки ТСХ сканировали и обрабатывали изображения хроматограмм на компьютере. Влияние концентрации раствора этанола на площадь хроматографических пиков верапамила представлено на рис. 4.

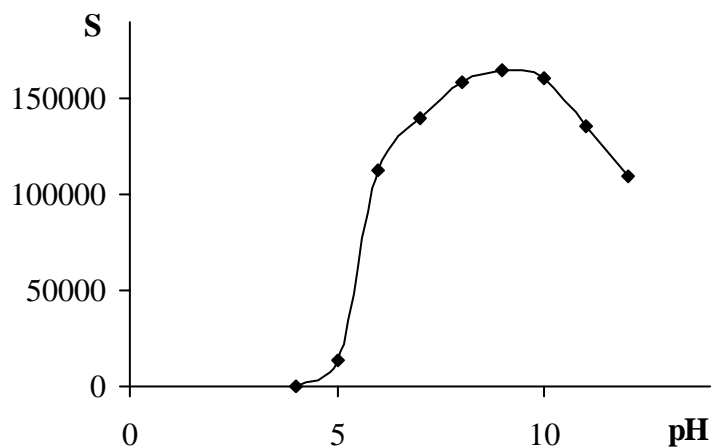


Рис. 4. Влияние концентрации раствора этанола при селективной промывке патронов ТФЭ на площадь хроматографических пиков верапамила

Оптимальное содержание этанола для промывания патронов ТФЭ составляло 25%. При больших концентрациях этанола происходили значительные потери сорбированного анализата, при меньших концентрациях этанола проба в значительной степени загрязнена компонентами матрицы, которые увеличивали подвижность верапамила. В результате значения Rf стандартного раствора верапамила и верапамила, выделенного из плазмы, не совпадали.

Влияние значения pH на экстракцию анализата из плазмы

Патроны твёрдофазной экстракции, содержащие 100 мг сорбента силасорб-100-С₁₆, кондиционировали 96% этанолом 15 минут, после чего промывали 10% этанолом.

В 2 мл плазмы крови вносили по 3 мкг верапамила, прибавляли 2 мл соответ-

ствующего буферного раствора, 200 мкл этанола и пропускали через патроны ТФЭ с подготовленным сорбентом со скоростью 30-60 капель в минуту. Промывали 3 мл воды, затем 3 мл 25% этанола. Сорбент высушивали в токе воздуха и элюировали 1 мл 96% этанола. Элюат упаривали до 10 мкл, переносили на пластинку ТСХ. После чего стенки пробирки омывали 100 мкл 96% этанола, вновь упаривали до 10 мкл и количественно наносили на пластину ТСХ «Сорбфил». После хроматографирования и проявления полученные изображения хроматограмм обрабатывали с помощью программы «ScionImage». Зависимость площади хроматографических пиков от значения pH буферного раствора представлена на рис. 5.

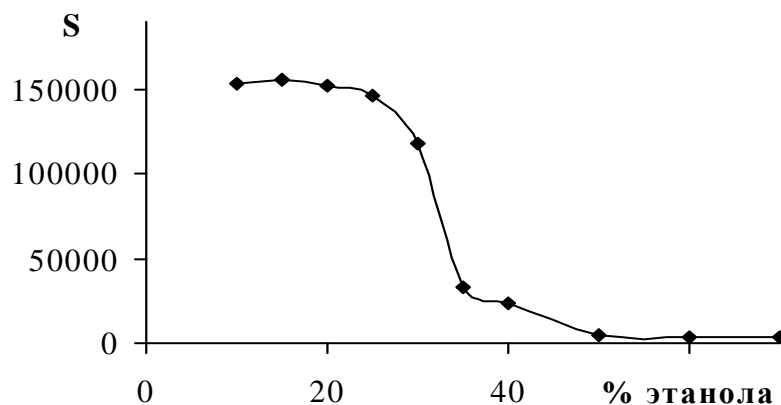


Рис. 5. Влияние значения pH буферного раствора на площадь хроматографических пиков верапамила

Таким образом, оптимальное значение рН для проведения изолирования верапамила методом твёрдофазной экстракции составило 8,0 – 10,0. При уменьшении значения рН ниже 8,0 степень извлечения верапамила уменьшилось вследствие доминирования в системе ионизированных форм верапамила ($pK_{BH^+} = 8,92$ [8]). Кроме того, при значениях рН ниже 3,0 происходило выпадение белков в осадок и разрушение сорбента [9]. При увеличении значения рН выше 10,0 степень извлечения верапамила также уменьшилась, что может быть связано с разрушением сорбента.

При заборе проб крови их иногда консервируют [10] прибавлением 1 г/л натрия фторида. Увеличение концентрации натрия фторида вплоть до 2 г/л не оказывало влияния на степень извлечения верапамила из плазмы.

Методика обнаружения верапамила в плазме крови

2 мл плазмы крови разбавляют в 2 раза боратным буферным раствором [7] со значением рН 9,0, прибавляют 200 мкл 96% раствора этанола.

Карtridge ТФЭ, содержащие 100 мг сорбента силасорб-100-С16, кондицио-

нируют 96% этанолом 15 минут, после чего промывают 10% этанолом.

Плазму пропускают через картридж со скоростью 30-60 капель в минуту, промывают последовательно 3 мл воды и 3 мл 25% этанола, после чего высушивают в токе воздуха.

Верапамил элюируют 1 мл 96% этанола в пробирку на 1 мл и упаривают в токе азота при температуре 40°C до небольшого объёма (примерно 10 мкл), после чего количественно переносят на хроматографическую пластинку. В пробирку прибавляют 100 мкл 96% этанола (при этом пробирку слегка покачивают, чтобы максимально растворить остаток на стенках), упаривают до объёма примерно 10 мкл и количественно наносят на хроматографическую пластинку «Сорбфил». Параллельно наносят 1 мкл стандартного раствора верапамила (1 мг/мл). Хроматографируют восходящим способом в системе вода-ацетон 8:2.

Проявляют пластинки методом погружения в реактив Драгендорфа по Мунье. Предел обнаружения верапамила составляет 0,5 мкг/мл плазмы. Хроматограмма верапамила, изолированного из плазмы, представлена на рис. 6.



Рис. 6. Хроматограмма верапамила, изолированного из плазмы крови
1. верапамил, выделенный из плазмы (1 мкг/мл); 2. стандарт верапамила;
3. фосфолипиды, содержащиеся в плазме

ВЫВОДЫ

1. Установлены оптимальные условия сорбционного концентрирования верапамила из плазмы крови.
2. Разработанная методика обнаружения верапамила в плазме крови отличается простотой исполнения, низким пределом обнаружения (0,5 мкг/мл).

SUMMARY

V.M.Yorshyk, A.I.Zhebentyaev, V.I.Fadeev
SOLID PHASE EXTRACTION AND TLC
DETERMINATION OF VERAPAMIL IN
BLOOD PLASMA

Verapamil detection in blood plasma with the use of SPE and TLC was. The method developed is cost effective and has low detection limit of verapamil.

ЛИТЕРАТУРА

1. Moffat A.C. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals. Second Edition. – London: The pharmaceutical press. – 1986. – 1684 p.
2. Holzer M., Sterz F., Schoerhuber W. et al. Successful resuscitation of a verapamil-intoxicated patient with percutaneous cardiopulmonary bypass// Crit Care Med. – 1999. – Vol 27, № 12. – P. 2818-2823.
3. Bremseth D.L., Lima J.J., MacKichan J.J. Specific HPLC method for the separation of verapamil and four major metabolites after oral dosing// J. Liq. Chromatogr. – 1988. – Vol 11, № 13. – P. 2731-2749.
4. Hoffman D.J., Higgins J. Resolution of verapamil from heptadeuteroverapamil and their quantitation in serum using capillary gas chromatography// J. Chromatogr. Biomed. Appl. – 1986. – Vol. 47, № 1. – P. 170-176.
5. Shin H.S., Oh-Shin Y.S., Kim H.J. et al. Sensitive assay for verapamil in plasma using gas-liquid chromatography with nitrogen-phosphorus detection// J. Chromatogr. B Biomed. Appl. – 1996. – Vol. 677, № 2. – P 369-373.
6. Шаршунова М., Шварц Б., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии, Ч. 2. – М.: Мир, 1980. – 620 с.
7. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. – М.: Химия, 1989. – С. 268-269.
8. Interactive PhysProp Database Demo // Environmental Science [Electronic resource]. – 1999 – 2004. – Mode of access: <http://esc.syrres.com>. – Date of access: 04.01.2003.
9. Лисичкин Г.В. Модифицированные кремнезёмы в сорбции, катализе и хроматографии. — М.: Химия, 1986. — 248 с.
10. Фланаган Р.Дж. Основы аналитической токсикологии. – Женева, 1997. – 384 с.

Поступила 14.06.2006 г.
