

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ КАЗЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ
«ЦЕНТР СУДЕБНЫХ ЭКСПЕРТИЗ
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН»



МЕТОДИКА
ОБНАРУЖЕНИЯ БИСОПРОЛОЛА В МОЧЕ МЕТОДОМ ТСХ
(шифр специальности – 27.1)

ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

1. Наименование методики	Методика обнаружения бисопролола в моче методом ТСХ
2. Шифр специальности методики	27.1(18)
3. Информация о разработчике методики	Ордабаева С.К. – д.фарм.н., профессор ЮКФА, Серикбаева А.Д. - к.фарм.н., доцент ЮКФА, Кулаева С.Ю. – магистрант ЮКФА
4. Сущность методики	Сущность определения бисопролола в моче методом ТСХ с применением в качестве проявляющего реагента модифицированного реактива Драгендорфа по Мунье
4.1. Объекты исследования	Определения в моче бисопролола
4.2. Методы исследования	Тонкослойная хроматография
4.3. Краткое поэтапное описание методики	1. Подготовка пробы 2. Хроматографическое исследование в тонком слое сорбента 3. Оценка результатов
5. Дата одобрения методики Ученым Советом Центра судебной медицины МЮ РК	Протокол № 1 от 07.11.2016г.
6. Информация о составителях паспорта методики	Жуматаева Г.С. - судебно-медицинский эксперт высшей категории РГКП «Центр судебной медицины МЮ РК»

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение	5
2. Область применения	5
3. Термины и обозначения	5
4. Основная часть	6
5. Заключение	7
6. Список использованных источников	7

1. Введение

Среди большого арсенала лекарственных веществ, действующих на сердечно-сосудистую систему, широко используются β_1 -адреноблокаторы. Одним из ярких представителей этой группы является бисопролол.

Близость границы между терапевтической и токсическими концентрациями, широкое применение бисопролола, токсические свойства, наличие случаев летального отравления, передозировки и применение в криминогенных целях делают его потенциальным объектом судебно-химического исследования. Он включен в список запрещенных лекарственных препаратов Всемирного антидопингового агентства (ВАДА) на период соревнований.

Материал для исследования

Объект исследования - моча, не консервированная - 5мл. Забор образцов осуществляется согласно «Инструкции по организации и производству судебно-медицинской экспертизы».

2. Область применения

«Стандартные операционные процедуры по методу определения концентрации бисопролола в моче методом ТСХ» используется в качестве стандарта персоналом лаборатории, выполняющим данную процедуру, а также для обучения нового персонала.

3. Термины и обозначения

СОП – стандартные операционные процедуры.

х.ч. – химически чистый.

Реактивы

1. Вода дистиллированная	ГОСТ
33045-2014	
2. Хлороформ	ГОСТ 20015-88
3. Спирт-изопропиловый	ГОСТ 9805-84
4. Этилацетат	ГОСТ 89-81-79
5. Раствор аммония гидроксида конц.	ГОСТ 3760-79
6. Спирт этиловый 95 %	ГОСТ 5962-2013
7. Бисопролола фумарат	ГФ РК, т.3, стр. 340

Приготовление реагентов:

1. Реактив Драгендорфа модифицированный по Мунье. Вначале 0,85 г нитрита висмута основного растворяют в 40 мл воды и 10 мл уксусной кислоты. Затем готовят раствор йодида калия в воде, для чего 8 г йодида калия растворяют в 20 мл воды. Смешивают равные объемы приготовленных растворов. К 10 мл полученной смеси добавляют 100 мл воды и 20 мл уксусной кислоты.

Оборудование

Хроматографическая камера

ГОСТ 10565-75

Хроматографические пластиинки «Sorbfil»

ГОСТ 24104—2001

Весы лабораторные аналитические

Мерные пипетки вместимостью 1, 5, 10 см ³	ГОСТ 20292-74Е
Колбы мерные вместимостью 25, 50, 100 см ³	ГОСТ 1770—74Е
Палочки стеклянные	ГОСТ 25336-82
Опрыскиватель	
УФ-хроматоскоп	
Микрокапилляры 1, 2, 5, 10 мкл	
Делительная воронка	
Мерный цилиндр	

4. Процедура

Приготовление раствора модельной смеси. К 25 мл мочи добавляют спиртовый раствор, содержащий 2,5 мг бисопролола (концентрация вещества соответствует минимальной терапевтической дозе, исходя из среднесуточного объема мочи 1500 мл). Полученную модельную смесь оставляют на 24 часа в холодильнике при температуре 4°С. Органический растворитель упаривают в токе теплого воздуха.

Процедура ЖЖМС. 5 мл мочи с содержанием активного вещества 0,1 мг/мл помещают в 100 мл стеклянную колбу с коническим дном и оставляют на час. После этого исследуемый образец переносят в делительную воронку на 100 мл и экстрагируют смесью, состоящей из хлороформа и спирта изопропилового в соотношении 8:2 в течение 15-20 мин при комнатной температуре по 5 мл два раза. Нижний органический слой отделяют и фильтруют через бумажный фильтр. После этого, полученные вытяжки объединяют и упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 0,5 мл спирта этилового 96%.

Методика обнаружения. На линию старта хроматографической пластины размером 15x15 наносят 10 мкл раствора СОВС бисопролола и 10 мкл извлечения из биологической жидкости. Пластиинку с нанесенными пробами подсушивают на воздухе в течение 10 мин, помещают в камеру с подвижной фазой состава хлороформ-спирт-изопропиловый-этилацетат-раствор аммония гидроксида конц. (40:9:5:0,5 по объему) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителя достигает 12 см, пластиинку вынимают из камеры, подсушивают на воздухе до полного исчезновения запаха растворителей и детектируют раствором модифицированным по Мунье. При этом R_f и интенсивность пятна бисопролола в испытуемом образце должен соответствовать СОВС.

При концентрации более 5 мкг/мл можно обнаружить бисопролол по собственной светло-коричневой окраске, при меньших концентрациях - по флюоресценции в УФ-свете.

Приготовление раствора стандартного образца вещества свидетеля бисопролола (СОВС). 0,001 г (точная навеска) бисопролола растворяют в 50 мл спирта этилового 95 % в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем тем же раствором до метки и перемешивают. Срок годности раствора - 1 месяц.

Подготовка камеры для хроматографирования. Хроматографирование проводят в стеклянных камерах (высота 30 см, диаметр 15 см), в которые помещают соответствующую смесь растворителей. Толщина слоя жидкости - 1 см. Камеру плотно закрывают крышкой и оставляют на 30 мин для насыщения пространства парами системы растворителей.

Предварительная подготовка пластинок. При необходимости перед использованием пластинки либо промывают в подходящем растворителе, либо посредством элюирования, погружения или опрыскивания, либо активируют в термостате при температуре от 100 °С до 105 °С в течение 1 ч.

Рассчитать значение R_f бисопролола. Детектировать проявляющим реагентом модифицированного реактива Драгендорфа по Мунье с предварительным опрыскиванием 1 % раствором аскорбиновой кислоты для предотвращения взаимодействия крахмала с йодом. Также детектирование провести в УФ-свете и с парами йода.

5. Заключение.

При применении в качестве проявляющего реагента модифицированного реактива Драгендорфа по Мунье должны наблюдаться пятна ярко-оранжевого цвета.

Под действием паров йода бисопролол в исследуемом образце и в стандартном образце вещества-свидетеля (СОВС) должен детектироваться в виде пятна темно-коричневого цвета.

Внутренний оперативный контроль

Внутренний оперативный контроль качества результатов контрольного химического анализа осуществляют с целью получения оперативной информации о качестве анализов и принятия при необходимости оперативных мер по его повышению.

6. Список использованных источников

1. Hahn-Deinstrop E. Applied Thin-Layer Chromatography.-2nd Ed. -Wiley, 2007.
2. Reich E., Widmer V. Thin Layer Chromatography//Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. -Wiley, 2012.
3. Приказ министра здравоохранения Республики Казахстан от 20 мая 2010 года № 368 «Об утверждении Инструкции по организации и производству судебно-медицинской экспертизы».
4. TIAFT 2015 53rd Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists 30 August 2015 - 04 September 2015, Italy, Florence
5. Секреты токсикологии: пер. с англ. / Д. Луис, Ф. Ричард, Б. Тимоти, Джон Х. Трестрэйл III. - М.-Спб. : Изд. Бином – Дизамант, 2006. – 376.
6. Руководство по экспертизе лекарственных средств /под ред. проф. А. Н. Миронова. Том 1. / М.: Гриф и К, 2013