

РОЗРОБКА МЕТОДІВ ІЗОЛЮВАННЯ ПРОПРАНОЛОЛУ ГІДРОХЛОРИДУ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Вступ. Захворювання серцево-судинної системи посідають одне з перших місць серед захворювань у світі. В Україні 64 % смертей припадають на захворювання серцево-судинної системи. В їх лікуванні використовують препарати різних груп: β -адреноблокатори, інгібітори ангіотензинперетворювального ензиму, діуретики, антагоністи кальцію, периферичні вазодилататори і нітрати. Пропранолол гідрохлорид був одним із перших β -адреноблокаторів, які відкрили вчені, тому лікарі давно призначають його своїм пацієнтам і знають його переваги та недоліки. Він залишається своєрідним "еталоном" для оцінки ефективності та безпеки нових β -адреноблокаторів, які розробляють.

Мета дослідження – розробити методи ізолювання пропранололу гідрохлориду з біологічного матеріалу.

Методи дослідження. Під час дослідження використовували пропранолол гідрохлорид, виділений з таблеток "Анаприлін" (ФК "Здоров'я"), що містив 40,0 мг пропранололу в таблетці у вигляді 38,6 мг пропранололу гідрохлориду (чистоту отриманої субстанції підтверджували методами тонкошарової хроматографії, УФ-спектрофотометрії).

Результати й обговорення. УФ-спектри досліджуваної речовини мали максимуми світлопоглинання при довжині хвилі 293 ± 2 , а за характером світлопоглинання збігалися з УФ-спектром стандартного розчину пропранололу гідрохлориду в 96 % розчині етанолу. Кількісне визначення проводили за рівнянням калібрувального графіка $y = 0,2161x - 0,0239$, коефіцієнт кореляції (R_2) = 0,9997. Розроблені методики дозволили ізолювати пропранолол гідрохлорид за методами О. О. Васильєвої – (26,01 \pm 1,67) %, Стаса – Отто – (46,04 \pm 2,24) %, І. Сшеджинського – (67,22 \pm 3,16) %.

Висновки. Визначено ефективні умови пробопідготовки пропранололу гідрохлориду з біологічного матеріалу методом УФ-спектрофотометричного визначення. Отримані результати мають практичне значення для створення алгоритму токсикологічного дослідження біологічних об'єктів на наявність досліджуваного препарату.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: пропранолол гідрохлорид; біологічний матеріал; УФ-спектрофотометрія.

ВСТУП. Захворювання серцево-судинної системи (ССС) посідають одне з перших місць серед захворювань у світі. В Україні 64 % смертей припадають на захворювання ССС. В їх лікуванні використовують препарати різних груп: β -адреноблокатори, інгібітори ангіотензинперетворювального ензиму, діуретики, антагоністи кальцію, периферичні вазодилататори і нітрати. Лікування спрямоване на покращення самопочуття та якості життя пацієнта, а також на попередження розвитку хвороб, що можуть виникнути на тлі лікування: хронічної серцевої недостатності, аритмій різного походження, ішемічної хвороби серця, інфаркту міокарда. Найбільшу перевагу віддають групі β -адреноблокаторів, їх широко використовують у протоколах лікування різних захворювань ССС, вони дають хороший фармакотерапевтичний ефект [1–3].

© Н. В. Горлачук, А. А. Кліменчук, 2024.

Одним з таких препаратів, які широко використовують на українському фармацевтичному ринку, є анаприлін (діюча речовина – пропранолол гідрохлорид). Він є неселективним β_1 -адреноблокатором, що має частковий вплив і на β_2 -адренорецептори, чим може викликати побічні ефекти з боку органів дихання. Ці препарати застосовують у клінічній практиці близько 50 років. Крім своєї традиційної ролі у лікуванні артеріальної гіпертензії, серцевої недостатності та інших серцево-судинних захворювань, β -блокатори використовують також як додаткову терапію для лікування таких станів, як мігренозний головний біль, гіпертиреоз, глаукома, тривога та інші розлади. Унаслідок частого їх застосування зросло передозування цих засобів [4–7].

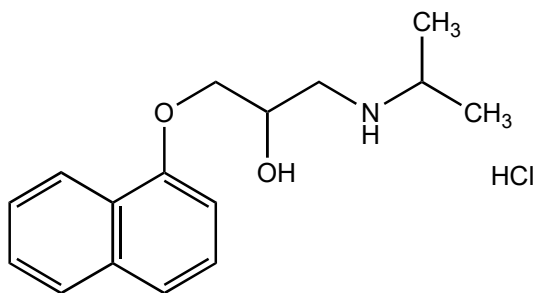
Пропранолол гідрохлорид є найбільш токсичним β -блокатором, і його найчастіше використовують при спробах самогубства в усьому світі.

У щорічному звіті Національної системи даних про отрути Американської асоціації центрів контролю отруєнь (AAPCC) за 2019 р. повідомляється про 11 166 випадків застосування β -блокаторів. Із зазначених експозицій 2699 були в дітей, молодших 6 років, а 7131 – у дорослих віком від 20 років і старших. Приблизно у 80 % випадків використання β -блокаторів було ненавмисним [8].

Розроблено біоаналітичні методи визначення пропранололу гідрохлориду в плазмі крові за допомогою високоефективної рідинної хроматографії з мас-спектрометричним [9], УФ-спектрофотометричним [10] детектуванням. Дані про ефективність загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання лікарських речовин з біологічного матеріалу з використанням гідрофільних і амфільних розчинників (методи О. О. Васильєвої, Стаса – Отто, І. Шведжинського) відносно пропранололу гідрохлориду в літературі відсутні.

Мета дослідження – розробити методи ізолювання пропранололу гідрохлориду з біологічного матеріалу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Під час дослідження використовували пропранолол гідрохлорид, виділений з таблеток “Анаприлін” (ФК “Здоров’я”), що містив 40,0 мг пропранололу в таблетці у вигляді 38,6 мг пропранололу гідрохлориду (чистоту отриманої субстанції підтверджували методами тонкошарової хроматографії (ТШХ), УФ-спектрофотометрії). Пропранололу гідрохлорид, або анаприлін, – 1-ізопропіламін-3-(1-нафтокс) пропранолу-2 гідрохлорид має таку структурну формулу:



РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Дослідження проводили з використанням модельних проб тканин печінки тварин. До 20,0 г подрібненої печінки додавали 5,0 мл розчину, що містив 2000,0 мкг пропранололу гідрохлориду. Паралельно ставили холостий дослід з біологічним матеріалом.

Методика. Об’єкт, який аналізували, переносили в колбу, додавали воду, підкислену оксалатною кислотою (метод О. О. Васильєвої), 96 % етиловий спирт, підкислений оксалатною кисло-

тою (метод Стаса – Отто) або ацетонітрил, підкислений хлористоводневою кислотою (метод І. Шведжинського) до значення рН 2–3 (за універсальним індикаторним папером) до покриття всіх частин біологічного об’єкта. Суміш залишали настоюватись 2 год, періодично перемішуючи вміст склянкою паличкою. Екстракти, що утворилися, зливали в колбу, проціджували через подвійний шар марлі. Цей біологічний матеріал покривали ще двічі відповідними розчинниками і залишали настоюватись 1 год, періодично помішуючи, отримані витяжки проціджували через марлю, об’єднували та струшували протягом 10 хв на середній швидкості шейкера. До кислих витяжок додавали 25 % розчин амоній гідроксиду до значення рН 9–10 (за універсальним індикаторним папером) та екстрагували тричі окремими порціями хлороформу (10,0; 10,0; 5,0 мл). Фільтрували через паперовий фільтр у колбу, що містила 0,8 г натрій сульфату безводного, попередньо змоченого хлороформом. Цей фільтрат переносили в колбу місткістю 25,0 мл і доводили хлороформом до мітки.

Отримані екстракти містили певну кількість домішок, що перешкоджали виявленню пропранололу гідрохлориду хімічними та фізико-хімічними методами. Ці екстракти піддавали ТШХ-очистці.

Методика ТШХ-очистки екстрактів. Відбирали 5,0 мл (при ізолюванні методами О. О. Васильєвої, Стаса – Отто, І. Шведжинського). Переносили витяжки у порцелянову чашку, випаровували на водяній бані до мінімального об’єму і наносили смугою на лінію старту хроматографічних пластин Сорбфіл та Merk.

На відстані 2 см від смуги за допомогою капіляра наносили точку 10,0 мкл стандартного розчину пропранололу гідрохлориду (0,1 мл). Друга точка містила 1,0 мл досліджуваної хлороформної витяжки, попередньо випареної до мінімального об’єму. Поряд наносили ще дві точки по 1,0 та 0,5 мл холостого екстракту, також випареного до мінімального об’єму. Хроматограму поміщали у хроматографічну камеру, що містила рухома фазу метанол – 25 % розчин аміаку (50:0,75).

Хроматограму проявляли реактивом Драгендорфа у модифікації за Мун’є (чутливість 0,5 мкг у пробі), залишаючи не проявленими смуги, що відповідали 5,0 мл екстракту та були нанесені смугами. Елюювання пропранололу гідрохлориду проводили розчином етанолу з не проявленої смуги хроматограми на рівні, що відповідав плямі стандартного розчину препарату (значення R_f становило 0,55).

УФ-спектри отриманих елюатів були аналогічні спектру стандартного розчину пропраноло-

лу в розчині 96 % етилового спирту і мали максимуми поглинання при довжині хвилі (293±2) нм (рис. 1–3).

Ступінь ізолювання (R, %) пропранололу гідрохлориду з печінки розраховували за формулою:

$$R = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3}{V_2 \cdot m} \cdot 100,$$

де C – концентрація препарату в елюаті, розрахована за калібрувальним графіком, мкг·мл⁻¹;

V₁ – об'єм хлороформного екстракту, одержаного в результаті ізолювання препарату з біологічного матеріалу, мл;

V₂ – об'єм хлороформного екстракту, взятого для ТШХ-очистки, мл;

V₃ – об'єм розчину, взятого для УФ-спектрофотометричного визначення, мл;

m – наважка пропранололу гідрохлориду, додана до досліджуваного біологічного об'єкта.

Результати кількісного визначення пропранололу гідрохлориду, виділеного з печінки за методом О. О. Васильєвої, наведено в таблиці 1. За допомогою цього методу з печінки можна виділити (26,06±1,67) % вказаного β-адреноблокатора.

Результати УФ-спектрофотометричного визначення пропранололу гідрохлориду за методом Стаса – Отто наведено в таблиці 2.

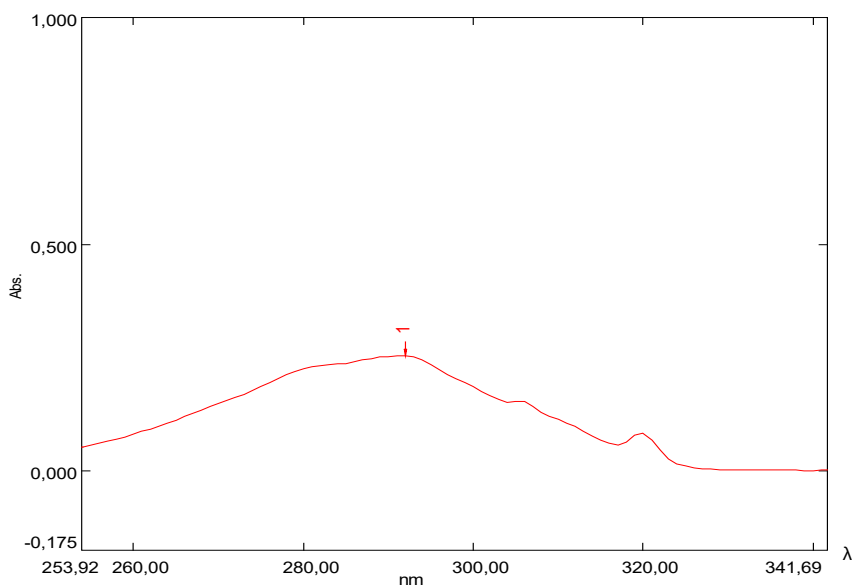


Рис. 1. УФ-спектр світлопоглинання пропранололу гідрохлориду (в розчині 96 % етанолу), виділеного з модельних проб печінки за методом О. О. Васильєвої.

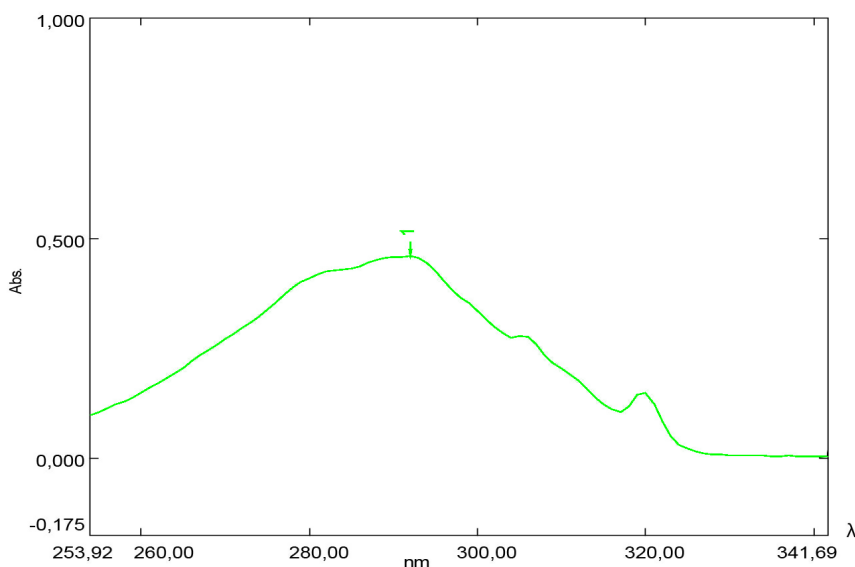


Рис. 2. УФ-спектр світлопоглинання пропранололу гідрохлориду (в розчині 96% етанолу), виділеного з модельних проб печінки за методом Стаса – Отто.

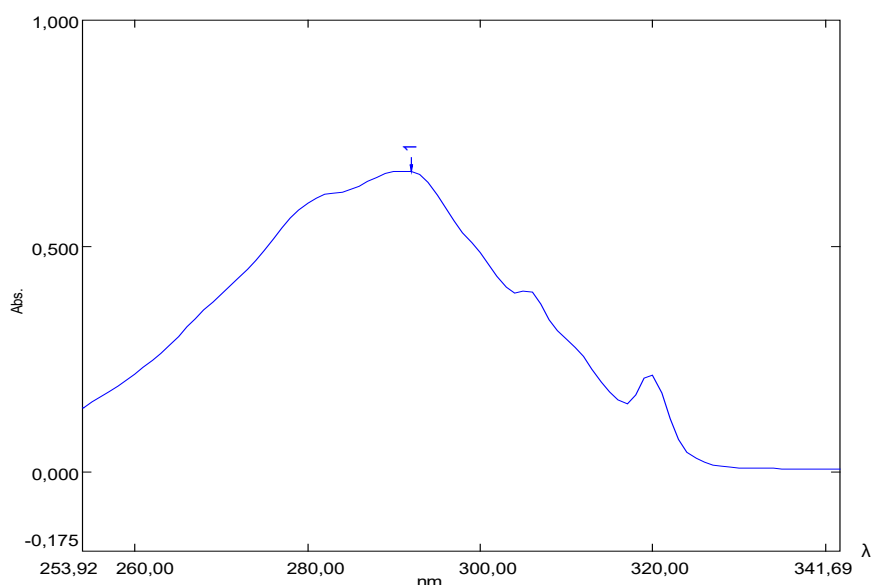


Рис. 3. УФ-спектр світлопоглинання пропранололу гідрохлориду (в розчині 96% етанолу), виділеного з модельних проб печінки за методом І. Сшеджинського.

Таблиця 1 – Результати УФ-спектрофотометричного визначення пропранололу гідрохлориду, виділеного з печінки за методом О. О. Васильєвої

Додано пропранололу гідрохлориду до 20 г печінки, мкг	A	Виділено пропранололу гідрохлориду		Метрологічні характеристики (n=5; P=0,95)
		мкг	%	
2000	0,251	522	26,1	X=26,06 % S=1,6196 RSD=6,21 % S _x =0,7242 ΔX=1,6702 % ε=6,4 %
	0,258	546	27,3	
	0,245	512	25,6	
	0,226	472	23,6	
	0,267	553	27,7	

Таблиця 2 – Результати УФ-спектрофотометричного визначення пропранололу гідрохлориду, виділеного з печінки за методом Стаса – Отто

Додано пропранололу гідрохлориду до 20 г печінки, мкг	A	Виділено пропранололу гідрохлориду		Метрологічні характеристики (n=5; P=0,95)
		мкг	%	
2000	0,459	958	47,9	X=46,04 % S=2,1686 RSD=4,71 % S _x =0,9698 ΔX=2,2364 % ε=4,86 %
	0,435	910	45,5	
	0,467	971	48,6	
	0,426	891	44,6	
	0,418	869	43,4	

Наведені дані свідчать про те, що за допомогою цього методу з біологічного матеріалу можна виділити (46,04±2,24) % пропранололу гідрохлориду.

Результати УФ-спектрофотометричного визначення пропранололу гідрохлориду у витяжках, отриманих з печінки за допомогою методу І. Сшеджинського, наведено в таблиці 3. Відповідно, можна виділити (67,22±3,16) % лікарської речовини.

Таким чином, при використанні УФ-спектрофотометричного методу для визначення пропра-

нололу гідрохлориду в біологічних об'єктах перевагу необхідно віддати пробопідготовці на основі методу І. Сшеджинського, який забезпечує найвищий ступінь ізолювання. Одержані результати мають практичне значення для вибору оптимальних умов пробопідготовки при судово-токсикологічних дослідженнях наявності пропранололу гідрохлориду.

ВИСНОВКИ. У ході проведеного дослідження було показано, що серед загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолю-

Таблиця 3 – Результати УФ-спектрофотометричного визначення пропранололу гідрохлориду, виділеного з печінки за методом І. Сшеджинського

Додано пропранололу гідрохлориду до 20 г печінки, мкг	А	Виділено пропранололу гідрохлориду		Метрологічні характеристики (n=5; P=0,95)
		мкг	%	
2000	0,652	1365	68,3	X=67,22 % S=3,0638 RSD=4,56 % S _x =1,3701 ΔX=3,1596 % ε=4,7 %
	0,602	1260	63,0	
	0,677	1404	70,2	
	0,664	1389	69,5	
	0,627	1301	65,1	

вання лікарських речовин з біологічного матеріалу найефективнішим відносно пропранололу гідрохлориду виявився метод І. Сшеджинського з використанням як екстрагенту ацетонітрилу, підкисленого 10 % розчином хлоридної кислоти

((67,22±3,16) %). Отримані результати мають практичне значення для створення алгоритму токсикологічного дослідження біологічних об'єктів на наявність досліджуваного препарату.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Al-Majed A. Propranolol / A. A. Al-Majed, A. H. Bakheit, H. A. Aziz // In Profiles of drug substances, excipients and related methodology. – 2017. – No. 42 (6). – P. 287–338.
2. Relative toxicity of beta blockers in overdose / D. Reith, M. Dawson, A. Whyte, I. Buckley // Journal of Toxicology: Clinical Toxicology. – 2018. – No. 34 (3). – P. 273–278.
3. Пропранолол [Електронний ресурс]. – Режим доступу : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4946>.
4. Byington R. Beta-Blocker Heart Attack Trial Research Group / R. Byington // Controlled Clinical Trials. – 2017. – No. 25 (4). – P. 382–437.
5. Effects of propranolol on recovery of heart rate variability following acute myocardial infarction and relation to outcome in the Beta-Blocker Heart Attack Trial. / R. Lampert, J. Ickovics, C. Viscoli, R. Horwitz // The American journal of cardiology. – 2013. – No. 91 (2). – P. 137–142.
6. Doughty A. Effects of beta-blocker therapy on mortality in patients with heart failure: a systematic overview of randomized controlled trials / A. Doughty, A. Rodgers, H. Sharpe // European heart journal. – 2019. – No. 18 (4). – P. 560–565.
7. Brouwers, S. Arterial hypertension / S. Brouwers, I. Sudano, Y. Kokubo // The Lancet. – 2021. – No. 398 (4). – P. 249–254.
8. Antihypertensive action of propranolol: specific antirenin responses in high and normal renin forms of essential, renal, renovascular and malignant hypertension / F. Bühler, R. Laragh, J. Vaughan [et al.] // The American Journal of Cardiology. – 2011. – No. 32 (4). – P. 511–522.
9. European Pharmacopoeia (2023) European Pharmacopoeia ed. 11. – Access mode: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-11-edition>.
10. The United States Pharmacopeia. The National Formulary; United States Pharmacopeial Convention, Inc.: Rockville, MD, USA, 2021.

REFERENCES

1. Al-Majed, A.A., Bakheit, A.H., Aziz H.A. (2017). Propranolol. *Profiles of drug substances, excipients and related methodology*, 42 (6), 287-338.
2. Reith, D., Dawson, M., Whyte, A., Buckley, I. (2018). Relative toxicity of beta blockers in overdose. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 34 (3), 273-278.
3. NLM/NCBI/PubChem. (2024). Propranolol. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4946/>
4. Byington R. (2017). Beta-blocker heart attack trial research group controlled. *Clinical Trials*, 25 (4), 382-437.
5. Lampert, R., Ickovics, J., Viscoli, C., Horwitz, R. (2013). Effects of propranolol on recovery of heart rate variability following acute myocardial infarction and relation to outcome in the Beta-Blocker Heart Attack Trial. *The American journal of cardiology*, 91 (2), 137-142.
6. Doughty, A., Rodgers, A., Sharpe, H. (2019). Effects of beta-blocker therapy on mortality in patients with heart failure: a systematic overview of randomized controlled trials. *European heart journal*, 18 (4), 560-565.
7. Brouwers, S., Sudano I., Kokubo Y. (2021). Arterial hypertension. *The Lancet*, 398 (4), 249-254.
8. Bühler, F., Laragh, R., Vaughan, J., Brunner, D., Gavras, H. (2011). Antihypertensive action of propranolol: specific antirenin responses in high and normal renin forms of essential, renal, renovascular and malignant hypertension. *The American Journal of Cardiology*, 32 (4), 511-522.

9. European Pharmacopoeia. (2023). European Pharmacopoeia (11th edn.). Retrieved from: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-11-edition>.

10. The United States Pharmacopeia. The National Formulary; United States Pharmacopoeial Convention, Inc.: Rockville, MD, USA, 2021.

Отримано 03.05.2024

Адреса для листування: Н. В. Горлачук, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, майдан Воли, 1, 46001, Україна, e-mail: Horlachuk@tdmu.edu.ua.

N. V. Horlachuk, A. A. Klimenchuk
I. HORBACHEVSKY TERNOPII NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

DEVELOPMENT OF METHODS FOR THE ISOLATION OF PROPRANOLOL HYDROCHLORIDE FROM BIOLOGICAL MATERIAL

Summary

Introduction. Diseases of the cardiovascular system (CVD) occupy one of the first places among diseases in the world. In Ukraine, 64 % of deaths are caused by cardiovascular diseases. Drugs of various groups are used in the treatment: beta-blockers, ACE inhibitors, diuretics, calcium antagonists, peripheral vasodilators and nitrates. Anaprilin was one of the first β -blockers discovered by scientists, so doctors have been prescribing it to their patients for a long time and know its advantages and disadvantages. It remains a kind of "benchmark" for evaluating the effectiveness and safety of new β -blockers under development.

The aim of the study – development of methods for isolating propranolol hydrochloride from biological material.

Research methods. During the study, propranolol hydrochloride was used, isolated from "Anaprilin" tablets, which contained 40 mg of propranolol in a tablet in the form of 38.6 mg of propranolol hydrochloride (the purity of the obtained substance was confirmed by TLC, UV spectrophotometry).

Results and Discussion. The UV spectra of the substance under study had light absorption maxima at a wavelength of 293 ± 2 , and the nature of light absorption coincided with the UV spectrum of a standard solution of propranolol in a 96 % ethanol solution. Quantification was done by the calibration graph equation $y = 0.2161x - 0.0239$, correlation coefficient (R_2) = 0.9997. The developed methods made it possible to isolate propranolol hydrochloride according to the method of O. O. Vasileva 26.01 ± 1.67 %, Stas – Otto – 46.04 ± 2.24 , according to the method of I. Sshezhinski – 67.22 ± 3.16 %.

Conclusion. Effective conditions for sample preparation of propranolol hydrochloride from biological material by UV-spectrophotometric determination were determined. The obtained results are of practical importance for the creation of an algorithm of toxicological research of biological objects for the presence of the specified substance in the case of fatal drug intoxications.

KEY WORDS: propranolol hydrochloride; biological material; UV spectrophotometry.