



УДК 340.67:612.112.1+612.461.17

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕРАПАМИЛА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

В.К. ШОРМАНОВ
Л.Л. КВАЧАХИЯ

*Курский государственный
медицинский университет*

e-mail: r-wladimir@yandex.ru

Определены оптимальные условия изолирования верапамила из биологического материала ацетоном.

Показана возможность очистки анализируемого соединения от соэкстрактивных веществ биоматериала на колонке, заполненной сорбентом «Силасорб С-18» (размер частиц 30 мкм).

Для идентификации и количественного определения верапамила в извлечениях из ткани трупной печени предложены методы ТСХ, ИК-и УФ – спектрофотометрия.

Ключевые слова: верапамил, изолирование, идентификация и определение.

Верапамил (альфа-[3-[[2-(3,4-диметоксифенил)этил]метиламино]пропил]-3,4-диметокси-альфа-(1-метилэтил) бензолацетонитрил) применяется в медицинской практике, является антагонистом ионов кальция и оказывает сосудорасширяющее, отрицательное инотропное действие, уменьшает потребность миокарда в кислороде, а также обладает слабой антиаритмической активностью [1, 3, 7].

По физическим свойствам верапамил – бесцветный кристаллический порошок с температурой плавления 146 оС, растворимый в воде, метаноле и хлороформе [1, 2].

Данное вещество токсично для теплокровных животных и человека. LD₅₀ для крыс при внутривенном введении составляет 16 мг/кг, при внутрижелудочном введении – 341 мг/кг [6].

Известны случаи летального отравления людей верапамилем при ошибочном приёме, завышении доз в процессе лечения или с целью самоубийства [4, 5]. Токсические свойства, широкое применение верапамила, наличие случаев летального отравления делают его потенциальным объектом судебно-химического исследования. Вопросы идентификации и количественного определения в биологическом материале рассматриваемого вещества разработаны недостаточно.

Целью настоящего исследования явилась разработка методики определения верапамила в биологическом материале.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования явился верапамил (альфа-[3-[[2-(3,4-диметоксифенил)этил]метиламино]пропил]-3,4-диметокси-альфа-(1-метилэтил) бензолацетонитрил), соответствующий требованиям НД 42-5047-01, дополнительно очищенный путем перекристаллизации из хлороформа.

В процессе исследования готовили модельные смеси верапамила с печенью от трупа человека и выдерживали в течение 1,5 часа при температуре 16-18оС, после чего проводили процесс изолирования путем двукратного (каждый раз в течение 30 минут) настаивания с порциями ацетона, этилацетата или ацетонитрила, каждая из которых в 2 раза превышала по массе количество модельной смеси. В каждом случае часть извлечения подвергали хроматографированию на пластинках «Сорбфил» (подвижная фаза – гексан-ацетон (2:8)). Хроматограммы детектировали в УФ-свете. Анализируемое вещество идентифицировали по величине R_f, совпадающей с таковой вещества-свидетеля, и элюировали из сорбента хлороформом. По величине оптической плотности элюата определяли количественное содержание верапамила в извлечениях, используя уравнение калибровочного графика.

Исследовали зависимость степени извлечения верапамила из биологического материала оптимальным (позволяющим достичь наибольшей степени извлечения) изолирующим агентом от кратности настаивания, продолжительности контакта изолирующей жидкости с биологическим материалом, количественного соотношения изолирующего агента и биологического объекта.

Для очистки верапамила, выделенного из биологического материала, применяли хроматографию низкого давления на колонке размерами 490×11 мм, заполненной сорбентом «Силасорб С-18» (размер частиц 30 мкм). Элюентами являлись смеси ацетонитрила и водных растворов различной реакции. Элюаты собирали отдельными фракциями по 2 мл каждая.

Обнаружение и предварительную идентификацию верапамила, изолированного из биологического материала, осуществляли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках «Сорбфил», применяя подвижную фазу гексан-ацетон (2:8).

Исследовали возможность применения метода электронной спектроскопии для подтверждающей идентификации верапамила и его количественного определения. Измерения проводили, используя прибор СФ-56 и карцевые кюветы с толщиной рабочего слоя 10 мм.

Для подтверждающей идентификации верапамила изучена также возможность применения ИК-спектроскопии. Анализируемые образцы запрессовывали в таблетки с бромидом калия и исследовали особенности их поглощения в интервале частот 4000—400 см⁻¹ на приборе Nicolette Magna 750. Верапамил, выделенный из биологического материала, для исследования методом ИК-спектроскопии предварительно очищали на колонке с сорбентом «Силасорб С-18» (размер частиц 30 мкм) по предлагаемой схеме.

Результаты исследования и их обсуждение. Оптимальным изолирующим агентом для извлечения верапамила из биологического материала (при содержании его в исследуемых образцах в количествах 0,02-0,3%) явился ацетон.

Установлено, что достаточно полное извлечение анализируемого соединения из биологического материала может быть достигнуто уже при двукратном настаивании биологической ткани с ацетоном в случае, если масса изолирующего агента каждый раз как минимум в 2 раза превышает массу биоматериала. Продолжительность контакта биологического объекта с изолирующей жидкостью при каждом настаивании должна составлять не менее 30 минут.

При изучении особенностей хроматографирования анализируемого вещества в колонке с сорбентом «Силасорб С-18» (размер частиц 30 мкм) установлено, что в случае использования подвижной фазы ацетонитрил-вода (9:1) верапамил обнаруживается во фракциях элюата с 14 по 17 (27-34 мл).

При исследовании ИК-спектра верапамила показано присутствие в нем ряда характеристических полос, соответствующих определенным видам колебаний различных структурных элементов молекулы рассматриваемого вещества (рис. 1). Это обуславливает принципиальную возможность применения метода ИК-спектроскопии для идентификации верапамила.

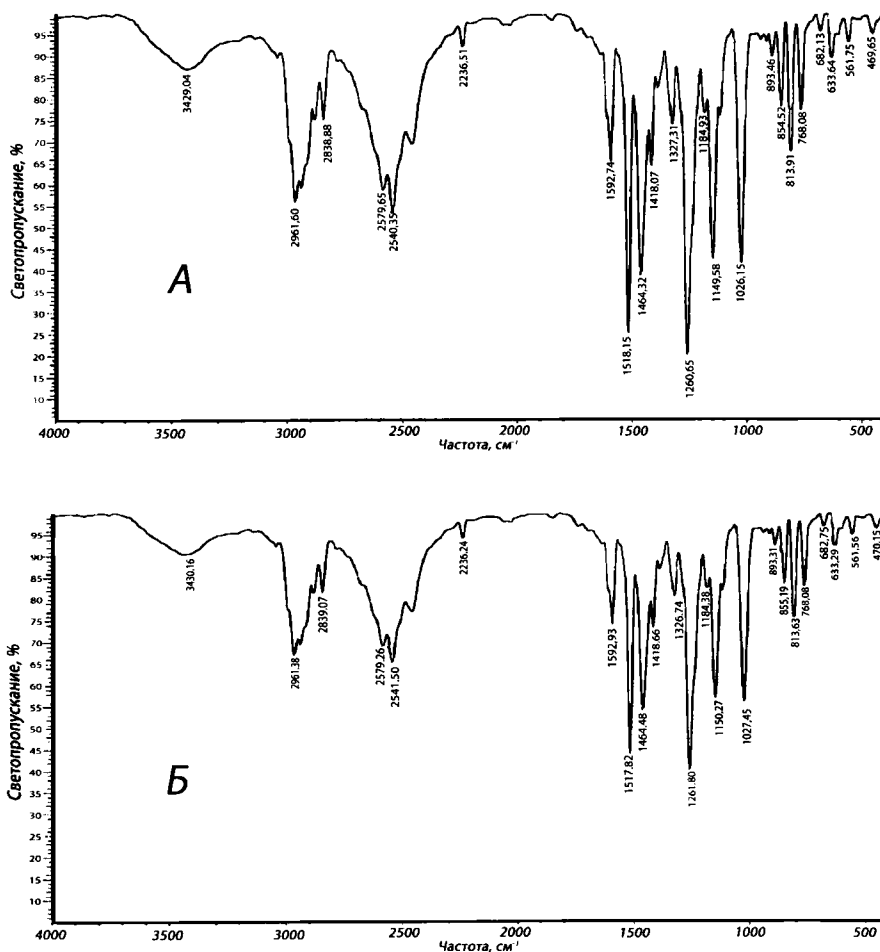


Рис. 1. ИК-спектры верапамила: А – стандартного вещества; Б – изолированного из трупной печени

ИК-спектр вещества (рис. 1), изолированного из биологического материала (печень) и очищенного на колонке с сорбентом «Силасорб С-18» (размер частиц 30 мкм), практически совпадал с таковым стандартного вещества. Это указывает на высокую степень очистки верапамила методом колоночной хроматографии низкого давления и целесообразность применения ИК-спектрофотометрии для идентификации данного соединения в извлечениях из биоматериала.

Исследование особенностей светопоглощения верапамила в УФ – и видимой областях показало, что оптимальные условия определения могут быть достигнуты при использовании в качестве растворителя этанола. Поглощение верапамила в данном растворителе характеризуется наличием трёх характерных полос с максимумами при 205 и 232 и 282 нм. Для количественного определения верапамила измерения осуществляли в области 282 нм. Открываемый минимум верапамила спектрофотометрическим методом составлял 2,5 мкг в 1 мл фотометрируемого раствора.

УФ-спектры стандартного верапамила и верапамила, выделенного из биологического материала, представлены на рис. 2.

Как видно из рис. 2, на спектрах вещества, выделенного из биологического материала, по сравнению с таковым вещества-стандарта не обнаруживаются дополнительные полосы или заметное увеличение фонового поглощения. При этом основные оптические характеристики верапамила, выделенного из трупной печени, совпадают с соответствующими параметрами стандартного вещества.

Установлено наличие линейной зависимости между оптической плотностью (А) и содержанием верапамила в фотометрируемом растворе (С, мкг/мл) в интервале концентраций 5,00-120,00 мкг/мл.

Уравнение калибровочного графика в данном случае имеет вид:

$$A = 0,010202 \cdot C - 0,001794,$$

где А- оптическая плотность, С – концентрация определяемого вещества в фотометрируемом растворе, мкг/мл.

Относительная ошибка среднего результата при определении верапамила методом спектрофотометрии не превышала 1% (n = 6; P = 0,95).

На основе результатов предварительных исследований разработана методика определения верапамила в биологическом материале.

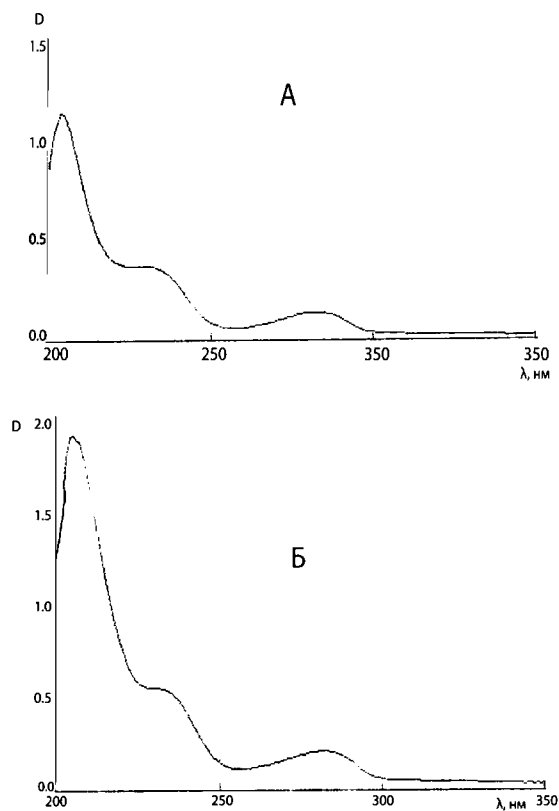


Рис. 2. УФ- спектры верапамила: А– стандартного вещества (0,002 %);
Б – изолированного из трупной печени



Методика определения верапамила в биологическом материале.

Изолирование верапамила. К 25 г биологического материала (мелкоизмельченной ткани печени от трупа человека), содержащего определенное количество анализируемого вещества, прибавляли 50 г ацетона и выдерживали в течение 30 мин при перемешивании. Полученное извлечение отделяли, а процесс настаивания повторяли. Отдельные извлечения объединяли в выпарительной чашке и испаряли растворитель в токе воздуха при температуре 18-22°C до получения сухого остатка.

Очистка извлечения. Сухой остаток растворяли в 2-3 мл смеси растворителей ацетонитрил-вода (9:1), вносили в стеклянную хроматографическую колонку размером 490±11 мм, предварительно заполненную 7,5 г сорбента «Силасорб С-18» (размер частиц 30 мкм). Хроматографирование осуществляли, используя в качестве элюента систему растворителей ацетонитрил-вода (9:1). Элюат собирали отдельными фракциями по 2 мл каждая. Фракции с 14 по 17 включительно объединяли, испаряли в токе воздуха при температуре 16-22°C. Остаток растворяли в 5 мл этанола.

Предварительная идентификация методом ТСХ. 0,4 мл этанольного раствора наносили на линию старта хроматографической пластины «Сорбфил» и осуществляли процесс хроматографирования с применением элюента гексан-ацетон (2:8) в присутствии вещества-свидетеля. Анализируемое вещество идентифицировали по величине $R_f = 0,38 \pm 0,03$.

Подтверждающая идентификация методом ИК-спектрофотометрии. 2 мл этанольного раствора испаряли до сухого остатка. Остаток, содержащий анализируемое вещество, измельчали, запрессовывали в таблетку с бромидом калия и исследовали поглощение образца в интервале частот 4000–400 см⁻¹ (прибор Nicolette Magna 750).

Определяемое вещество идентифицировали по наличию в его ИК-спектре специфического набора характеристических полос поглощения, максимумы которых совпадали с максимумами соответствующих полос в ИК-спектре вещества-стандарта (рис. 1).

Подтверждающая идентификация и количественное определение методом электронной спектрофотометрии. 1 мл этанольного раствора вносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили содержимое колбы этанолом до метки. Поглощение полученного раствора исследовали в интервале длин волн 200-400 нм, используя спектрофотометр СФ-56, в кюветах с толщиной рабочего слоя 10 мм. Измерения проводили на фоне раствора, полученного в контрольном опыте.

Определяемое вещество идентифицировали по форме спектральной кривой и положению максимумов полос поглощения. Количественное содержание вещества рассчитывали по величине оптической плотности, измеренной при длине волны 282 нм, используя уравнение калибровочного графика, и пересчитывали на навеску анализируемого вещества, внесённую в биологический материал.

Результаты количественного определения верапамила представлены в таблице.

Таблица

Результаты изолирования различных концентраций верапамила из ткани печени трупа человека

Внесено верапамила (мг) на 25 г ткани печени	Найдено, % (n=5, p=0,95)			
	\bar{X}	S	S _x	$\Delta \bar{X}$
2,50	75,32	3,76	1,68	4,68
5,00	86,65	3,31	1,48	4,12
12,50	93,48	2,91	1,30	3,62
25,00	95,58	2,61	1,17	3,24
50,00	96,26	2,53	1,13	3,15

Как свидетельствуют полученные данные, предлагаемая методика позволяет определять 75,32 – 96,26 % верапамила в ткани печени, содержащей 2,5-50,0 мг данного соединения на 25 г биоматериала, с достаточной для биологических исследований воспроизводимостью и правдивостью.

Выводы:

1. Для изолирования верапамила из биологического материала предложен ацетон.
2. Определена возможность очистки анализируемого соединения, изолированного из биологических объектов, методом хроматографии низкого давления в колонке с сорбентом «Силасорб С-18» (размер частиц 30 мкм).



3. Разработана методика идентификации и количественного определения верапамила в извлечениях из трупного материала с использованием методов тонкослойной хроматографии, а также ИК- и УФ – спектрофотометрии.

Литература

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Т. 1. (Издание тринадцатое).-Харьков: Торсинг, 1998.-560 с.
2. НД 42-5047-01. Верапамил (субстанция) / На основе письма Департамента Государственного контроля лекарственных средств и медицинской техники.- М., 2001.-13 с.
3. Светый Л.И., Кукес В.Г. Применение ретардной формы дилтиазема при лечении больных ишемической болезнью сердца и артериальной гипертонией в амбулаторных условиях // Курск. Науч.-практ. Вестн. «Человек и его здоровье». – 2006. – № 4. – С. 62-68.
4. Седов, А.И. Судебно-химическое доказательство отравления верапамилом / А.И.Седов, Э.Б.Мужановский // Судебно-медицинская экспертиза. 1980.- Т. 23, N 2. – С. 48-50.
5. Clarke's analysis of drugs and poisons in Pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3rd ed.- London: Pharmaceutical Press, 2004.- Vol. 2.- 550 p.
6. <http://chemister.ru/Database/properties.php?dbid=1&id=3367>.
7. Verapamil quantification in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry An application for bioequivalence study / N. C. do C. Borges, G. D. Mendes, R.E. Barrientos-Astigarraga, P. Galvinas e. A. // Journal of Chromatography B.-2005.- Vol. 827.-P. 165–172.

VERAPAMIL DEFINITION IN BIOLOGICAL MATERIAL

The optimal conditions for verapamil isolation from biological material with acetone have been determined.

The possibility of purification of the analyte from co-extracted biomaterial substances on a column with sorbent “Silasorb C-18” (particle size: 30 microns) has been shown.

The methods of TLC, IR- and UV-spectrophotometry have been offered for identification and quantification of verapamil in tissue extracts from cadaveric liver.

Key words: verapamil, isolation, identification and determination.

V.K. SHORMANOV

L.L. KVACHAKHIA

Kursk State Medical University

e-mail: r-wladimir@yandex.ru