

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИЛТИАЗЕМА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

© *Квачахия Л.Л.*

**Кафедра медицины катастроф Курского государственного медицинского университета, Курск**

E-mail: [Lekso82@yandex.ru](mailto:Lekso82@yandex.ru)

В качестве изолирующего агента для извлечения дилтиазема из биологических жидкостей предложен ацетон. Установлено, что оптимальные условия извлечения дилтиазема из биожидкостей достигаются уже при двукратном настаивании биологического объекта с изолирующим агентом, если массовое соотношение изолирующей жидкости и биоматериала на каждом этапе настаивания составляет не менее 2:1, а продолжительность настаивания – как минимум 45 минут. Показана возможность очистки анализируемого соединения от соэкстрактивных веществ биоматериала на колонке, заполненной сорбентом «Силасорб С-18» с размером частиц 30 мкм. Для идентификации и количественного определения дилтиазема в извлечениях из ткани плазмы крови и мочи предложены методы ТСХ, фотометрии и хромато-масс-спектрометрии (ГХ МС).

**Ключевые слова:** дилтиазем, биологическая жидкость, идентификация и определение.

### DILTIAZEM DETERMINATION IN BIOLOGICAL LIQUIDS

*Kvachakhia L.L.*

**Department of Disaster Medicine of Kursk State Medical University, Kursk**

Acetone was suggested as an isolating agent for extraction of diltiazem from biological liquids. It was found out that the optimum conditions of diltiazem extraction from bioliquids are already obtained in twofold infusion of biological item with an isolating agent provided the weight ratio of the isolating liquid and biomaterial at each stage of the infusion is at least 2:1, and the infusion duration – at least 45 minutes. The possibility of purification of the compound under analysis from the biological material of endogenous substances in a column filled with a sorbent «Silasorb C-18» with 30 mkm particle size was investigated. The TLC, photometry and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) were used to identify and quantify diltiazem in extracts of blood plasma and urine.

**Keywords:** diltiazem, biological liquids, identification and definition.

Дилтиазем (D-дис-3-Ацетокси-2,3-дигидро-5-[2-(диметиламино)этил]-2-(2-метоксифенил)-1,5-бензотиазепин-4(5H)-она гидрохлорид) применяется как антагонист ионов кальция при стенокардии, ИБС и гипертонической болезни, а также обладает антиаритмической активностью [2, 6].

Это белый или не совсем белый кристаллический порошок с горьким вкусом и температурой плавления 213°C, легко растворимый в воде, метаноле, дихлорметане, плохо растворимый в этаноле [4, 10].

Дилтиазем обладает выраженными токсическими свойствами по отношению к теплокровным организмам и может приводить к отравлениям различной степени тяжести. Его LD<sub>50</sub> при внутривенном введении лабораторным животным колеблется от 190±14,61 мг/кг до 140±14,23 мг/кг (p<0,05) [6]. Зафиксированы летальные отравления дилтиаземом людей на территории Российской Федерации и за рубежом [1, 4, 9, 11].

Широкое применение дилтиазема в медицинской практике, его токсические свойства, наличие случаев летального отравления делают его важным объектом судебно-химического анализа.

Для изолирования дилтиазема из трупного материала описано использование классических

методов, которые не позволяют достичь высокой степени изолирования рассматриваемого вещества (степень извлечения 7-30%) и относительно малочувствительны [3, 4].

Ряд известных вариантов исследования дилтиазема в биологическом (трупном) материале, основанных на изолировании метанолом и ацетонитрилом, не предусматривают достаточно высокой степени очистки, что не позволяет в полной мере использовать возможности современных высокочувствительных методов анализа [3].

Недостаточно высокая степень извлечения дилтиазема из биоматериала и очистки аналита от соэкстрактивных веществ биологических матриц характеризует универсальный метод пробоподготовки QuEChERS, а также метод, основанный на замораживании биологического объекта до –70°C с последующей ультразвуковой обработкой [5, 12].

Вопросы идентификации и количественного определения дилтиазема в биологических жидкостях разработаны недостаточно.

Целью настоящего исследования явилась разработка методики идентификации и количественного определения дилтиазема в моче и плазме крови.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования – субстанция дилтиазема гидрохлорида с содержанием основного вещества не менее 99,9%, соответствующая НД.

Рассматривалась возможность применения ацетона в качестве изолирующего агента (экстрагента) для извлечения дилтиазема из мочи и плазмы крови.

Эксперименты проводили на модельных смесях дилтиазема с плазмой крови и мочой человека, которые выдерживали 1,5 часа при температуре 16-18°C в соответствии с ранее предложенными методиками [7, 8]. Исследовали зависимость степени извлечения анализируемого вещества из биожидкости ацетоном от кратности настаивания, её продолжительности, количественного соотношения изолирующего агента и биологического материала.

В каждом случае часть извлечения подвергали хроматографированию на пластинах «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ (подвижная фаза хлороформ-ацетон (5:5 по объему)). На хроматограммах в УФ-свете дилтиазем обнаруживался в виде темного пятна с  $R_f$  0,57±0,03. Вещество элюировали этанолом 15 минут и идентифицировали по особенностям поглощения элюата в УФ-части спектра. По величине оптической плотности элюата, измеренной при 278 нм (спектрофотометр СФ-56, длина оптического пути 10 мм), определяли количество дилтиазема, используя уравнение градуировочного графика.

Определяя возможность очистки дилтиазема методом обращеннофазовой колоночной хроматографии, изучали особенности его хроматографического поведения в колонке 120×11 мм, заполненной 7,5 г сорбента «Силасорб С-18» 30 мкм. Элюенты – полярные растворители (ацетонитрил, диоксан, ацетон) с различным содержанием воды. Элюаты собирали фракциями по 2 мл каждая. Дилтиазем обнаруживали во фракциях методом ТСХ (пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ, подвижная фаза – ацетон-хлороформ (5:5), объем фракции, наносимый на пластину – 5-10 мкл).

Параллельно осуществляли контрольное хроматографирование на колонке извлечения из 25 мл биологической жидкости (моча и плазма крови). Фракции элюата, в которых теоретически возможно присутствие анализируемого вещества, объединяли, испаряли, растворяли остаток в 25 мл этанола и измеряли оптическую плотность раствора при 278 нм (растворитель и длина волны соответствуют условиям определения дилтиазема методом спектрофотометрии).

Для предварительной идентификации дилтиазема изучена возможность применения нормальнофазной ТСХ. Вещество хроматографировали на пластинах «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ в подвижной фазе ацетон – хлороформ (5:5). Для подтверждающей идентификации и количественного определения дилтиазема рассмотрена возможность применения фотометрических методов и хромато-масс-спектрометрии (вариант ГХ МС).

Для фотометрических определений в видимой области вводили в структуру дилтиазема электрофильный заместитель (нитрогруппу) и получали аци-нитросоль образующегося нитропроизводного.

При определении дилтиазема методом ГХ МС использовали газовый хроматограф фирмы Agilent Technologies (США) модели 6890N с масс-селективным квадрупольным детектором модели 5973N (Agilent Technologies) и колонку DB-1MS (J&WScientific, США) с неподвижной жидкой фазой диметилполисилоксан (длина колонки 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина пленки фазы 0,25 мкм). Масс-селективный детектор работал в режиме электронного удара (70 эВ). Обнаружение вещества проводилось в режиме регистрации по полному ионному току (диапазон сканирования 40-550 m/z).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимальными условиями для извлечения верапамила из мочи и плазмы крови ацетоном являются: двукратное настаивание с изолирующим агентом, массовое соотношение изолирующей жидкости и биологического объекта на каждом этапе настаивания как минимум 2:1, продолжительность контакта изолирующего агента и биожидкости в каждом случае не менее 45 мин.

Изучение экстракции дилтиазема показало, что он в наибольшей степени извлекается гидрофобными растворителями из щелочных растворов, а оптимальным экстрагентом является диэтиловый эфир (коэффициент распределения (если  $r=1$ ) равен 49-62,7 при pH 10-12). Введение электролитов (хлорида калия, декагидрата сульфата натрия, сульфата аммония) в водную фазу коэффициент распределения заметно не изменяет.

Установлено, что в реакции с нитратом калия в среде концентрированной серной кислоты дилтиазем при 18-22°C переходит в нитропроизводное, образующее в водно-щелочной среде окрашенный продукт (аци-нитросоль). Подчинение основному закону светопоглощения для реакции нитрования дилтиазема и последующего получения аци-нитросоли соответствует интервалу концентраций 2,5–200 мкг/мл. Градуировочный гра-

фик (коэффициент корреляции  $r \geq 0,99$ ) имеет вид:  $A=0,010171 \cdot C+0,089425$  ( $A$  – оптическая плотность,  $C$  – концентрация вещества в фотометрируемом растворе, мкг/мл). При определении дилтиазема методом спектрофотометрии в субстанции относительная ошибка среднего результата не более 1,2%.

Для определения дилтиазема методом ГХ МС предложены условия, при которых начальная температура термостата колонки составляла 80°C (задержка на 2 минуты). Температура программировалась от 80°C до 250°C со скоростью 40°C в минуту с выдержкой при конечной температуре 6 минут. Температура инжектора составляла 280°C, температура интерфейса – 300°C. Газ-носитель – гелий, скорость подачи которого 39 см/с. Объем вводимой пробы – 1 мкл, проба вводилась в режиме без деления потока, задержка 3 мин. В данных условиях на хроматограммах наблюдали пик (время удерживания 11,7 мин), соответствующий дилтиазему. Масс-спектр вещества, соответствующего данному пику, включает сигналы ряда осколков с характерными массами (58, 77, 104, 121, 150, 178). Основным (масса которого принимается за 100%) является осколок с массой 58.

Сочетание сигналов характерных осколков в масс-спектре и времени удерживания в колонке обеспечивает достаточно высокую селективность идентификации рассматриваемого соединения методом ГХ МС. Открываемый минимум дилтиазема составляет при этом  $0,2 \cdot 10^{-9}$  г в хроматографируемой пробе.

#### **Методика определения дилтиазема в биологических жидкостях**

Изолирование. 25 г биологической жидкости, содержащего дилтиазем, настаивали дважды по 45 минут с порциями ацетона массой 50 г каждая при перемешивании, затем объединяли извлечение. Объединённое извлечение пропускали через стеклянный фильтр диаметром 4 см со слоем безводного сульфата натрия толщиной 1,5-2,0 см, слой сульфата натрия промывали 20 мл изолирующего агента. Фильтраты объединяли, растворитель из объединённого фильтрата испаряли при комнатной температуре.

Очистка экстракцией. Остаток растворяли в 10 мл 0,1 М раствора хлороводородной кислоты, раствор фильтровали через бумажный фильтр, фильтр промывали 10 мл 0,1 М раствора хлороводородной кислоты. Фильтрат и промывную жидкость объединяли, доводили рН раствора 1 М раствором натрия гидроксида до 8-9 и экстрагировали диэтиловым эфиром дважды по 40 мл. Экстракты объединяли в выпарительной чашке и испаряли в токе воздуха до сухого остатка.

Очистка колоночной хроматографией. Остаток, полученный после очистки экстракцией, рас-

творяли в 2 мл смеси ацетонитрил – вода (9,1:0,9) и вносили данную смесь в хроматографическую колонку размерами 120×11 мм, заполненную 7,5 г «Силасорб С-18» 30 мкм. Хроматографировали, используя элюент ацетонитрил – вода (9,1:0,9). Элюат собирали фракциями по 2 мл. Фракции 8 и 9 объединяли, испаряли в токе воздуха при 20-22°C. Остаток растворяли в 10 мл ацетона (исходный ацетоновый раствор). В две выпарительные чашки (№ 1, № 2) вносили соответственно 0,1-2,0 мл и 1,0-2,5 мл исходного ацетонового раствора и испаряли растворитель.

Идентификация методом ТСХ. Остаток в чашке № 1 растворяли в незначительном объёме ацетона и количественно наносили на линию старта хроматографической пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ. Хроматографировали, применяя систему хлороформ – ацетон (5:5), в присутствии вещества-свидетеля. Хроматограммы детектировали в УФ-свете и идентифицировали анализируемое вещество по величине  $R_f$ , совпадающей с таковой вещества-свидетеля ( $0,57 \pm 0,03$ ).

Идентификация методом УФ-спектрофотометрии. После хроматографирования методом ТСХ пятно вещества вырезали из хроматограммы, помещали в пробирку, элюировали вещество из сорбента 95% этанолом 15 минут и исследовали поглощение элюата в интервале длин волн 200-360 нм. Соединение идентифицировали по форме спектральной кривой и положению максимумов поглощения (210, 242 и 278 нм). УФ-спектры в этаноле стандарта дилтиазема и дилтиазема, извлеченного из биожидкости, изображены на рис. 1. Как видно из рисунка, формы спектральных кривых и положения полос поглощения практически совпадают.

Идентификация методом ГХ МС. Остаток в чашке № 2 растворяли в 25 мл гексана. 2-10 мкл полученного раствора вводили в испаритель газового хроматографа. 2 мкл полученного раствора вводили в хроматограф типа Agilent Technologies (США) модели 6890N с масс-селективным квадрупольным детектором модели 5973N (Agilent Technologies) и хроматографировали в вышеописанных условиях.

Дилтиазем идентифицировали по сочетанию времени удерживания вещества в неподвижной фазе колонки и специфического набора сигналов характеристических заряженных частиц в его масс-спектре.

В табл. 1 представлены масс-спектры стандарта (фармакопейного образца) дилтиазема, а также дилтиазема, выделенного из мочи и плазмы крови.

Таблица 1

Сопоставление библиотечного масс-спектра стандартного образца дилтиазема и дилтиазема, извлеченного из биологических объектов

Анализируемое вещество	Основные характеристические заряженные частицы, m/Z
Фармакопейный образец	41, 58, 77, 104, 121, 150, 178, 199, 223, 242, 272, 302, 326, 343, 372, 429
Вещество, извлеченное из плазмы крови	41, 58, 77, 104, 121, 150, 178, 199, 223, 242, 272, 302, 326, 343, 372, 429
Вещество, извлеченное из мочи	41, 58, 77, 104, 121, 150, 178, 199, 223, 242, 272, 302, 326, 343, 372, 429

Таблица 2

Результаты количественного определения дилтиазема в модельных смесях с биологическими объектами

Внесено дилтиазема (мг в 25 г биологического объекта)	Найдено, % (n=5; P=0,95)			
	$\bar{X}$	S	S $\bar{x}$	$\Delta \bar{X}$
	в моче			
2,50	94,71	2,01	0,90	2,51
5,00	95,03	1,83	0,82	2,28
12,50	95,37	1,56	0,70	1,95
25,00	95,51	1,41	0,63	1,76
50,00	95,67	1,31	0,59	1,65
	в плазме крови			
2,5	91,85	2,75	1,23	3,42
5,0	92,43	2,41	1,08	3,03
12,5	92,83	2,14	0,96	2,68
25,0	93,02	1,94	0,87	2,42
50,0	93,18	1,78	0,80	2,24

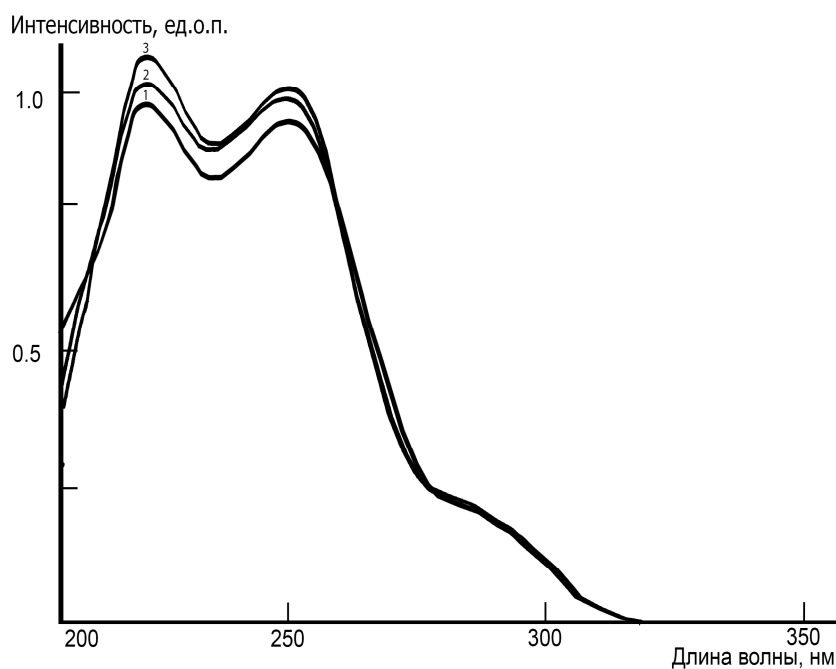


Рис. 1. Спектральные кривые дилтиазема в этаноле: 1 – 0,01% раствор стандартного образца; 2 - раствор вещества, изолированного из мочи; 3 – раствор вещества, изолированного из плазмы крови.

Как свидетельствуют полученные данные, обнаруживается совпадение масс-спектров анализируемого и стандартного веществ на 86-93%.

Количественное определение. Этанольный элюат после идентификации методом УФ-спектрофотометрии упаривали в выпарительной чашке до сухого остатка, остаток 7,5 мин обрабатывали 0,5 мл 10% раствора нитрата калия в концентрированной серной кислоте. Реакционную массу разбавляли 1 мл воды, к полученной смеси прибавляли 4,5 мл 20% раствора гидроксида натрия и измеряли оптическую плотность образующегося окрашенного раствора при 303 нм на фоне раствора, получаемого в контрольном опыте. Количественное содержание дилтиазема определяли, используя уравнение градуировочного графика, и пересчитывали на навеску анализируемого вещества, внесенную в биоматериал. Результаты представлены в табл. 2.

Согласно полученным данным, изменение содержания дилтиазема в модельных смесях от 2,5 до 50,0 мг при постоянных массах навесок биожидкости (25 г) сопровождается изменением среднего значения степени извлечения, не превышающим 1,7%. При содержании дилтиазема в количестве 25 мг в 25 г биожидкости разработанная методика позволяют определить в моче 95,51%, в плазме крови 93,02% данного вещества. Открываемый минимум методики (в 100 г биологического объекта) составляет: 0,15 мг вещества в моче, 0,3 мг – в плазме крови.

Таким образом, разработанная методика может быть применена при исследовании тканей трупных органов и биожидкостей на присутствие в них дилтиазема.

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. В качестве изолирующего агента для извлечения дилтиазема из биожидкости предложен ацетон. Установлены оптимальные параметры изолирования ацетоном.

2. Показана возможность очистки дилтиазема, извлекаемого из биологических объектов, сочетанием жидкость-жидкостной экстракции и хроматографии в колонке сорбента «Силасорб С-18» 30 мкм.

3. Разработана универсальная методика определения дилтиазема в моче и плазме крови на основе изолирования рассматриваемым растворителем.

4. Для идентификации и оценки количественного содержания исследуемого вещества в биологических жидкостях предложены методы ТСХ, спектрофотометрии и ГХ МС.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Базы данных «ВЭЖХ-УФ». Хроматография на благо России / под ред. А.А. Курганова. – М. : Граница, 2007. – 720 с.
2. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства. 16-е изд., перераб., испр. и доп. – М. : Новая волна, 2012. – 1216 с.
3. *Медведева Ю.П., Бондарь В.С.* Исследование эффективности методов изолирование дилтиазема из биологического материала // Медицинская химия. – 2004. – Т. 2, № 6. – С. 97-100.
4. *Мингазов А.А., Мусина М.Г., Килин В.В.* Изолирование дилтиазема из биоматериала и его идентификация // Актуальные вопросы судебной медицины и права. – 2011. – № 2. – С. 122-125.
5. *Романов Б.К.* Кальциевая регуляция активности лизосомальных ферментов миокарда // Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 51, № 6. – С. 634-642.
6. *Усанова А.А., Александровский А.А., Зорькина А.В., Киселева О.М.* Влияние эналаприла, дигоксина, атенолола и дилтиазема на перекисное окисление липидов при сочетанных метаболических нарушениях // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2009. – № 6. – С. 63-67.
7. *Шорманов В.К., Герасимов Д.А., Омельченко В.А.* Особенности изолирования 4-нитроанилина из биологического материала // Судебно-медицинская экспертиза. – 2014. – Т. 54, № 3. – С. 34-38.
8. *Шорманов В.К., Столяров М.Л., Сипливый Г.В.* Определение хлорамбуцила в биологических жидкостях // Фармация. – 2013. – Т. 62, № 2. – С. 3-6.
9. *DeWitt C.R., Waksman J.C.* Pharmacology, pathophysiology, and management of calcium channel blocker and beta-blocker toxicity. // Toxicol. Rev. – 2004. – Vol. 23, N 2. – P. 23-38.
10. Clarke's analysis of drugs and poisons in Pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3rd ed. – London: Pharmaceutical Press, 2004. – Vol. 2. – 550 p.
11. *Kalin J.R., Wood K.M., Lee A.J.* A possible suicide by diltiazem overdose // J. Anal. Toxicol. – 1994. – Vol. 18, N 3. – P. 180-182.
12. *Sun H., Ai L., Wang F.* Quantitative Analysis of Sulfonamide residues in Natural Animal Casings by HPLC // J. Chromatographia. – 2007. – Vol. 66, N 5/6. – P. 333-337.