

Рекомендована д.ф.н., професором П.О.Безуглим

УДК 615.225.2:54.06:543.544

## ВИСОКОЕФЕКТИВНА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ В АНАЛІЗІ КАПТОПРИЛУ

З.В.Шовкова, С.І.Мерзлікін, В.В.Болотов

Національний фармацевтичний університет

**Розроблені методики кількісного визначення каптоприлу та його основного метаболіту каптоприлу дисульфідом методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Відносна невизначеність середнього результату при кількісному визначенні препарату становила  $\pm 5,88\%$ , а для каптоприлу дисульфідом —  $\pm 2,82\%$ , що обумовлює придатність запропонованих методик для хіміко-токсикологічного аналізу. Запропоновано використовувати каптоприлу дисульфід як маркер при ідентифікації каптоприлу методом ВЕРХ.**

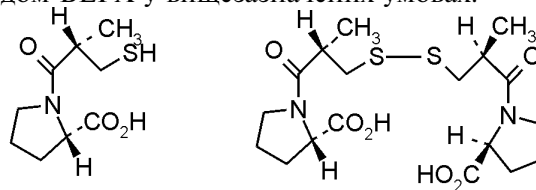
Каптоприл — (2S)-1-[(2S)-3-меркапто-2-метилпропанойл]піролідин-2-карбонова кислота — синтетичний інгібітор ангіотензинконвертуючого ферменту є одним з найпризначуваніших антигіпертензивних засобів у терапії серцево-судинних захворювань. Проте відомо [6, 9, 11, 12], що препарати вказаної фармакологічної групи, включаючи й каптоприл, є причиною досить частих інтоксикацій, в тому числі з летальними випадками.

Для діагностики отруєнь зазначеним лікарським препаратом в хіміко-токсикологічному аналізі (ХТА) використовують оптичні [8, 13] та хроматографічні методи аналізу [14]. Однією з проблем ХТА є потреба у залученні сучасних методів дослідження для ідентифікації та кількісного визначення вмісту отруйних і небезпечних для людини речовин у біологічному матеріалі.

Метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) широко використовується у фармацевтичному та хіміко-токсикологічному аналізі. Однак його застосування у традиційному вигляді вимагає для кожної речовини розробки індивідуальної методики дослідження з використанням окремих хроматографічних колонок та індивідуальних мобільних фаз [7]. У ситуації невизначеності це потребує великих кількостей експериментів та матеріалів для дослідження. Слід зазначити, що відомо декілька спроб розробки універсального ВЕРХ-аналізатора для дослідження певної кількості речовин [4, 5, 10]. На наш погляд, перспективним для ХТА є ВЕРХ-аналізатор ЗАТ “ЕкоНова” (м. Новосибірськ), створений на основі хроматографа “Міліхром А-02” [1].

На відміну від інших хроматографів “Міліхром А-02” виготовляється за технологією, що гарантує збереження його основних технічних характеристик від прибору до прибору. Друга важлива особливість цього хроматографа — це робота з колонками об’ємом лише 0,2 мл. Це дозволяє, маючи 1 кг сорбенту однієї партії, зробити 5000 однакових колонок та протягом декількох років використовувати їх без корегування “бази даних”. Використання наступної партії сорбенту потребує створення нової “бази даних”. Вони мають ефективність не менше 5000 теоретичних тарілок та забезпечують економію дорогих рухомих фаз. Сорбент витримує до 1000 аналізів без помітної зміни властивостей, не “колапсує” в рухомій фазі з великим (до 95%) вмістом води та не виявляє іонообмінних властивостей по відношенню до амінів за рахунок залишкових сіланольних груп силікагелю.

Метою наших досліджень було проведення аналізу каптоприлу та його метаболіту — каптоприлу дисульфідом-(2S, 2’S)-1,1’-[3, 3’-дитіобіс[(2S)-2-метилпропанойл]]-біспіролідин-2-карбонової кислоти методом ВЕРХ у вищезазначених умовах.



каптоприл

каптоприлу дисульфід

Каптоприлу дисульфід, одержаний нами в лабораторних умовах внаслідок окиснення каптоприлу 0,05 М розчином йоду, запропонований нами як маркер наявності каптоприлу в біологічному матеріалі.

### Експериментальна частина

Дослідження проводили на хроматографі “Міліхром А-02” (ЗАТ “ЕкоНова”, м. Новосибірськ) у зазначених умовах: колонки  $\varnothing 2 \times 75$  мм з оберненою фазою ProntoSIL-120-5-C18 AQ (“Bischoff Analysentechnik und Geraete GmbH”, Німеччина); градієнтне елюювання виконували змішуванням двох елюентів: елюент А — [4М LiClO<sub>4</sub> — 0,1М

Таблиця 1

Основні хроматографічні параметри каптоприлу та каптоприлу дисульфиду при визначенні методом ВЕРХ

| Речовина             | tr     | V <sub>R</sub> | R (S <sub>λ</sub> / S <sub>210</sub> ) |        |        |        |        |        |        |        |
|----------------------|--------|----------------|--|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                      |        |                | 210 нм                                 | 220 нм | 230 нм | 240 нм | 250 нм | 260 нм | 280 нм | 300 нм |
| Каптоприл            | 10,307 | 1030,7         | 1,0000                                 | 0,3853 | 0,1193 | 0,0256 | 0,0184 | 0,0179 | 0,0223 | 0,0239 |
| Каптоприлу дисульфід | 14,098 | 1409,8         | 1,0000                                 | 0,4023 | 0,1049 | 0,0321 | 0,0216 | 0,0220 | 0,0248 | 0,0191 |

НСіО<sub>4</sub>] — Н<sub>2</sub>О (5:95); елюент Б — ацетонітрил “для ВЕРХ” (від 5% до 100% ацетонітрилу за 40 хв, потім 100% ацетонітрил протягом 3 хв); швидкість потоку — 100 мкл/хв; температура колонки — 40°С; об’єм проби — 2 мкл. УФ-детектування виконували одночасно при 8 довжинах хвиль: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 та 300 нм. Обробку хроматограм проводили за допомогою програми “Аналітика Chrom”, розробленої НВФ “Аналітика” (м. Харків). Правильність методики аналізу періодично контролювали шляхом хроматографування спеціального контрольного багатокомпонентного розчину [1].

**Методика побудови градувального графіка для каптоприлу**

Каптоприл (100 мг) вносили в мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняли в невеликій кількості води очищеної та доводили об’єм розчину водою очищеною до позначки (стандартний розчин 1, концентрація 1000 мкг/мл).

У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 40,00 мл стандартного розчину 1 і доводили об’єм розчину водою очищеною до позначки (стандартний розчин 2, концентрація 400 мкг/мл).

У дві мірні колби місткістю 100,0 мл вносили по 50,00 та 25,00 мл стандартного розчину 2 і доводили об’єми розчинів до позначки водою очищеною (розчини 3 та 4 відповідно, концентрація 200 та 100 мкг/мл відповідно). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 25,00 мл розчину 3 і доводили об’єм розчину до позначки водою очищеною (розчин 5, концентрація 50 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 10,00 мл розчину 4 і доводили об’єм розчину до позначки водою очищеною (розчин 6, концентрація 10 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 10,00 мл розчину 6 та доводили об’єм розчину до позначки водою очищеною (розчин 7, концентрація 1 мкг/мл).

Розчини каптоприлу 2, 3, 4, 5, 6 та 7 хроматографували за вищезазначених умов; об’єм проби становив 2 мкл.

Хроматографування кожного розчину проводили тричі.

**Методика побудови градувального графіка для каптоприлу дисульфиду**

100 мг каптоприлу дисульфиду вносили в мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняли в невеликій кількості метанолу та доводили об’єм розчину

метанолом до позначки (стандартний розчин 1, концентрація 1000 мкг/мл).

У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 20,00 мл стандартного розчину 1 і доводили об’єм розчину метанолом до позначки (стандартний розчин 2, концентрація 200 мкг/мл).

У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 50,00 мл стандартного розчину 2 і доводили об’єм розчину до позначки метанолом (розчин 3, концентрація 100 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 50,00 мл розчину 3 і доводили об’єм розчину до позначки метанолом (розчин 4, концентрація 50 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 10,00 мл розчину 4 і доводили об’єм розчину до позначки метанолом (розчин 5, концентрація 10 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 10,00 мл розчину 5 та доводили об’єм розчину до позначки метанолом (розчин 6, концентрація 1 мкг/мл).

Розчини каптоприлу дисульфиду 2, 3, 4, 5 та 6 хроматографували за вищезазначених умов; об’єм проби становив 2 мкл.

Хроматографування кожного розчину проводили тричі.

**Методика визначення каптоприлу та каптоприлу дисульфиду**

Приготування модельних розчинів каптоприлу та каптоприлу дисульфиду з концентрацією 10,0; 50,0; 100,0 та 200,0 мкг/мл проводили згідно з методикою, наведеною вище. Хроматографування приготовлених модельних розчинів каптоприлу та каптоприлу дисульфиду проводили у вищезазначених умовах; об’єм проби становив 2 мкл.

Для розрахунку вмісту каптоприлу та каптоприлу дисульфиду використовували відповідні градувальні графіки або рівняння відповідних прямих.

**Методика одержання каптоприлу дисульфиду**  
0,2170 г (0,001 Моль) каптоприлу розчиняли в 10 мл воді та додавали 10 мл 0,05 М розчину йоду. Осад, що утворився, відфільтровували, промивали водою та висушували. Вихід — 0,2 г.

**Результати та їх обговорення**

При розробці методики ідентифікації каптоприлу та каптоприлу дисульфиду методом ВЕРХ нами встановлено [2], що максимальні площі піків зазначених речовин на хроматограмі спостерігаються при довжині хвилі 210 нм — R = 1,000 та мають різні показники часу утримування (10,3 хв

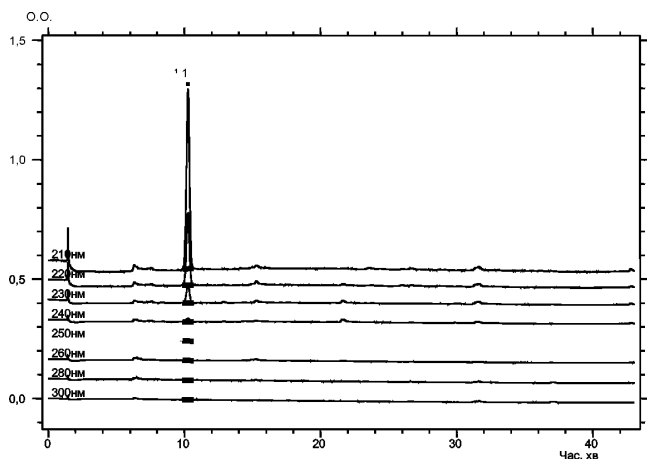


Рис. 1. Хроматограма розчину каптоприлу, отримана за методом ВЕРХ.

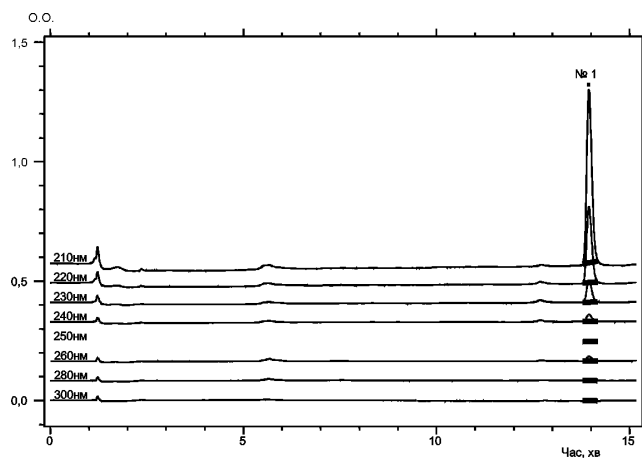


Рис. 2. Хроматограма розчину каптоприлу дисульфїду, отримана за методом ВЕРХ.

Таблиця 2

Метрологічні характеристики градувальних залежностей (1) та (2) площ піків від вмісту речовини ( $y = bx + a$ ), отриманих методом ВЕРХ

| Пряма | $r^2$  | $b \cdot 10^{-4}$ | $a \cdot 10^{-3}$ | $S^2 \cdot 10^{-6}$ | $\Delta b \cdot 10^{-5}$ | $\Delta a \cdot 10^{-3}$ |
|-------|--------|-------------------|-------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1     | 0,9994 | 5,860             | - 1,720           | 6,070               | 2,010                    | 3,784                    |
| 2     | 0,9998 | 5,632             | - 0,284           | 0,445               | 1,303                    | 1,337                    |

та 14,1 хв відповідно). Основні хроматографічні параметри досліджуваних речовин наведені в табл. 1, а типові хроматограми — на рис. 1 та 2.

У зв'язку з вищенаведеним саме довжину хвилі 210 нм було використано при розробці методики кількісного визначення каптоприлу та каптоприлу дисульфїду вказаним методом. Як розчинник для приготування досліджуваних розчинів каптоприлу використовували воду очищену, а для каптоприлу дисульфїду — метанол.

За одержаними даними будували градувальні графіки. Встановлено, що цим графікам відповідають рівняння прямих (1) — для каптоприлу та (2) для каптоприлу дисульфїду відповідно виду  $y = bx + a$  [3]:

$$S = 0,000586 \cdot C - 0,00172 \quad (1)$$

$$S = 0,0005632 \cdot C - 0,000284 \quad (2),$$

Таблиця 3

Результати кількісного визначення каптоприлу методом ВЕРХ у модельних розчинах ( $\lambda = 210$  нм; об'єм проби 2 мкл)

| Концентрація розчину каптоприлу, мкг/мл | Площа піку | Знайдено каптоприлу |        | Метрологічні характеристики   |
|---|------------|---------------------|--------|---|
|   |            | мкг/мл              | %      |   |
| 10,0                                    | 0,004550   | 10,70               | 107,00 | $X=102,81$<br>$S=3,80$<br>$S_x=1,90$<br>$\Delta X=6,04$<br>$\varepsilon=\pm 5,88\%$<br>$X \pm \Delta X = 102,81 \pm 6,04$ |
| 50,0                                    | 0,02755    | 49,95               | 99,90  |   |
| 100,0                                   | 0,05647    | 99,30               | 99,30  |   |
| 200,0                                   | 0,1214     | 210,10              | 105,05 |   |

де:  $S$  — площа піку;

$C$  — концентрація речовин, мкг / мл.

Метрологічні характеристики отриманих градувальних залежностей [3] наведені в табл. 2.

Після перевірки значущості коефіцієнтів  $a$  в рівняннях (1) та (2) зроблено висновок про неможливість переходу до рівняння виду  $y = b \cdot x$ . Також визначено, що площі піків розчинів досліджуваних речовин лінійно залежать від їх концентрації в діапазоні 1-400 мкг/мл для каптоприлу, що відповідає вмісту речовини у пробі від 2 до 800 нг відповідно та концентрації в діапазоні 1-200 мкг/мл для каптоприлу дисульфїду, що відповідає вмісту речовини у пробі від 2 до 400 нг відповідно.

Одержані градувальні графіки та рівняння прямих (1) та (2) використані нами для розрахунку концентрації досліджуваних речовин у модельних розчинах. Результати досліджень наведені в табл. 3 та 4.

Таблиця 4

Результати кількісного визначення каптоприлу дисульфїду методом ВЕРХ у модельних розчинах ( $\lambda = 210$  нм; об'єм проби 2 мкл)

| Концентрація розчину каптоприлу дисульфїду, мкг/мл | Площа піку | Знайдено каптоприлу дисульфїду |        | Метрологічні характеристики   |
|--|------------|--------------------------------|--------|---|
|  |            | мкг/мл                         | %      |   |
| 10,0   | 0,005186   | 9,71                           | 97,10  | $X=99,51$<br>$S=1,76$<br>$S_x=0,88$<br>$\Delta X=2,80$<br>$\varepsilon=\pm 2,82\%$<br>$X \pm \Delta X = 99,51 \pm 2,80$ |
| 50,0   | 0,02824    | 50,64                          | 101,28 |   |
| 100,0  | 0,05577    | 99,53                          | 99,53  |   |
| 200,0  | 0,1125     | 200,26                         | 100,13 |   |

Відносна невизначеність середнього результату при кількісному визначенні каптоприлу становила  $\pm 5,88\%$ , а при визначенні каптоприлу дисульфиду —  $\pm 2,82\%$ .

#### ВИСНОВКИ

1. Розроблені методики аналізу каптоприлу та каптоприлу дисульфиду методом ВЕРХ. Запропо-

новано використовувати каптоприлу дисульфід як маркер при виявленні каптоприлу.

2. Розроблені методики кількісного визначення каптоприлу та його дисульфиду методом ВЕРХ. Відносна невизначеність середнього результату при кількісному визначенні каптоприлу становила  $\pm 5,88\%$ , а при визначенні каптоприлу дисульфиду —  $\pm 2,82\%$ .

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Барам Г.И., Рейхарт Д.В., Гольдберг Е.Д. и др. // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 2003. — Т. 135, №1. — С. 75-79.
2. Болотов В.В., Мерзликін С.І., Шовкова З.В. // 36. наук. статей “Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки і практики”. — 2006. — Вип. XV, Т. 1. — С. 220-221.
3. Доерфель К. Статистика в аналитической химии / Пер. с нем. под ред. В.В.Налимова. — М.: Мир, 1969. — 223 с.
4. Baram G.I. // J. Chromatogr. A. — 1996. — Vol. 728. — P. 387.
5. Bogusz M. // J. Analyt. Toxicol. — 1991. — Vol. 15. — P. 174-178.
6. Chodorowski Z., Anand J.S., Waldman W. // Przegl. Lek. — 2003. — Vol. 60 (4). — P. 233-235.
7. European Pharmacopea. — 4 ed. — Council of Europe. — Strasbourg, 2002. — 2416 p.
8. Hosseinimehr S.J., Ebrahimi P., Hassani N. et al. // Boll. Chim. Farm. — 2004. — Jul.-Aug. — 143 (6). — P. 249-251.
9. Jonsson A., Holmgren P., Ahlner I. // Forensic Sci. Intern. — 2004. — Vol. 143. — P. 53-59.
10. Kohn A. // Toxicchem. Krimtech. — 1993. — Vol. 60, №2. — P. 39-50.
11. Lahti R.A., Vuori E. // Forensic Sci. Intern. — 2003. — Vol. 136. — P. 35-46.
12. Park H., Purnell G.V., Mirchendani H.G. // Clin. Tox. — 1990. — Vol. 28. — P. 379-382.
13. Rahman N., Singh M., Hoda M. N. // Farmaco. — 2005. — May 28.
14. Salem I.I., Saif W.A., Jmeian Y., Al Tamimi J.I. // J. Pharm. Biomed. Anal. — 2005. — Apr. 29. — 37 (5). — P. 1073-1080.

УДК 615.225.2:54.06:543.544

#### ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В АНАЛИЗЕ КАПТОПРИЛА

З.В.Шовковая, С.И.Мерзликин, В.В.Болотов

Разработаны методики идентификации и количественного определения каптоприла и его основного метаболита — каптоприла дисульфида методом ВЭЖХ. Относительная неопределенность среднего результата при количественном определении каптоприла составляет  $\pm 5,88\%$ , а для каптоприла дисульфида —  $\pm 2,82\%$ , что обуславливает пригодность предложенных методик для химико-токсикологического анализа. Предложено использовать каптоприла дисульфид в качестве маркера при обнаружении каптоприла.

UDC 615.225.2:54.06:543.544

#### HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY IN THE ANALYSIS OF CAPTOPRIL

Z.V.Shovkovaya, S.I.Merzlikin, V.V.Bolotov

The identification and quantitative determination methods for captopril and its main metabolite — captopril disulfide — by HPLC method have been developed. A relative error of the method is  $\pm 5,88\%$  for captopril and  $\pm 2,82\%$  for captopril disulfide, that allows to use these methods in chemical and toxicological analysis. Captopril disulfide has been suggested to be used as a marker while revealing captopril.