

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

УДК 615.225.2:543.062.061:543.544:543.42

## СПРЯМОВАНИЙ ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ НА КАПТОПРИЛ

З.В.Шовкова, В.В.Болотов, С.І.Мерзлікін, Л.Ю.Клименко

Національний фармацевтичний університет

**Розроблено схему спрямованого дослідження біологічного матеріалу на каптоприл з детальним викладенням методик ізолювання каптоприлу, очищення витяжок із біологічного матеріалу від співекстрактивних речовин, виявлення та кількісного визначення препарату у біологічному матеріалі.**

Неспинне розширення асортименту лікарських засобів, у тому числі і сильнодіючих, що пропонуються на фармацевтичному ринку України, робить розробку методів хіміко-токсикологічного та криміналістичного аналізу актуальною задачею токсикологічної хімії.

На теперішній час лікарські засоби для лікування захворювань серцево-судинної системи і, зокрема, антигіпертензивні препарати посідають одне з провідних місць на ринку лікарських препаратів. Як наслідок, летальні випадки при прийомі зазначених препаратів зустрічаються досить часто [9, 10, 11, 14-16].

Каптоприл як перший препарат у своїй підгрупі антигіпертензивних засобів (інгібітори АПФ) має ряд переваг у порівнянні з іншими препаратами-аналогами. Однак є повідомлення про смертельні випадки внаслідок його застосування [8-16].

Відомості про систематичне хіміко-токсикологічне дослідження каптоприлу в літературі відсутні, що зумовило необхідність розробки схеми дослідження біологічного матеріалу на каптоприл.

### Експериментальна частина

Розробку схеми спрямованого дослідження біологічного матеріалу на каптоприл проводили на модельних сумішах препарату з кров'ю, сечею та печінкою, що не зазнала гнилісних змін, взятою від трупа людини, яка загинула від травм. Для цього до 10 г подрібненої печінки або до 10 мл крові або сечі додавали 1,00 мл розчину каптоприлу в воді очищеній (2000 мкг препарату), ретельно перемішували і залишали на добу. Готували також контрольні суміші з розчинником (вода очищена), дослідження яких проводили паралельно з основними.

Кількість каптоприлу, що використовували для проведення модельних дослідів, була розрахована,

виходячи з даних наукової літератури щодо кількості препарату в органах і тканинах людини при смертельних отруєннях [14-16].

На першому етапі досліджень проводили ізолювання каптоприлу з біологічного матеріалу. Ізолювання каптоприлу із тканин печінки проводили за розробленою нами методикою (модифікований метод В.П.Крамаренка) [4, 5].

**Методика ізолювання каптоприлу з крові.** До 10 мл модельної суміші крові з каптоприлом додавали 10 мл 1 М розчину кислоти хлористоводневої, перемішували та перевіряли за універсальним індикаторним папером рН суміші (при необхідності по краплях додавали 6 М розчин кислоти хлористоводневої до рН = 2), залишали на 2 год при постійному перемішуванні. Суміш центрифугували (протягом 5 хв при 5000 об./хв), зливали надосадову рідину та тричі екстрагували сумішшю хлороформ — пропанол-2 (8:2) порціями по 20 мл. Отримані витяжки ("кислий" хлороформно-ізопропанольна витяжка) об'єднували, фільтрували через паперовий фільтр ("червона стрічка") з 1 г натрію сульфатом безводним до мірної колби місткістю 50,0 мл та доводили об'єм хлороформом до позначки (V<sub>1</sub>).

**Методика ізолювання каптоприлу з сечі.** До 10 мл модельної суміші сечі з каптоприлом додавали 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої до рН = 2 і тричі екстрагували сумішшю хлороформ — пропанол-2 (8:2) порціями по 20 мл. Отримані витяжки ("кислий" хлороформно-ізопропанольна витяжка) об'єднували, фільтрували через паперовий фільтр ("червона стрічка") з 1 г натрію сульфатом безводним до мірної колби місткістю 50,0 мл та доводили об'єм хлороформом до позначки (V<sub>1</sub>).

Ідентифікацію каптоприлу проводили методом ТШХ на хроматографічних пластинах "Sorbfil" ПТСХ-ПВ (сілікагель СТХ-1ВЕ, тип підложки — ПЕТФ, зв'язуюча речовина — силіказоль, фракція — 8÷12 мкм, товщина шару — 100 мкм).

Хроматографування проводили в камері об'ємом 500 см<sup>3</sup>, в яку вносили 50 мл систем розчинників. Камеру насичували протягом 30 хв. Довжина шляху пробігу розчинників становила 5 см.

Для ідентифікації каптоприлу використовували по 100 мкл отриманих хлороформних витяжок. У випадку негативного результату по 1/10 частині отриманих хлороформних витяжок випаровували током холодного повітря до об'єму 0,3–0,5 мл і по 100 мкл згущених витяжок використовували для ідентифікації каптоприлу [1].

При виконанні спрямованого дослідження біологічного матеріалу на каптоприл проводили попереднє ТШХ-дослідження в системі розчинників толуен — метанол — кислота ацетатна концентрована (9:1:1). Попередньо пластину елюювали в хлороформі з метою очистки від співекстрактивних речовин.

Пластину проявляли 2% розчином 5,5'-дитіобіс(2-нітробензойної кислоти) в метанолі, рН якого доведено до 8, та спостерігали плями жовтого кольору ( $R_f = 0,60$ ). Ідентифікацію проводили в присутності "свідка" — каптоприлу (концентрація 1 мг/мл).

За умов позитивного результату проводили ТШХ-очистку отриманої витяжки, після чого проводили підтвердуючі дослідження методом ВЕРХ та реакційної ТШХ.

Кількісне визначення каптоприлу проводили за спектрофотометричною [3], фотоколориметричною [6] та ВЕРХ-методиками [7] в 20 мл ( $V_2$ ) отриманих витяжок. Дослідження методом ВЕРХ проводили після очистки отриманих витяжок за методом ТШХ.

**ТШХ-очистка витяжок із об'єктів біологічного походження, що містять каптоприл.** Брали 40% від загального об'єму отриманої витяжки і вносили в порцелянову чашку та видаляли органічний розчинник током холодного повітря. Сухий залишок розчиняли у 0,5 мл хлороформу та кількісно наносили на лінію старту хроматографічної пластини "Sorbfil" ПТСХ-ІІВ смугою шириною 2 см. Поряд наносили 10 мкл стандартного хлороформного розчину каптоприлу (концентрація 1 мкг/мкл).

Пластину елюювали в хлороформі з метою очистки від співекстрактивних речовин — один раз або, за необхідності, двічі. За цих умов каптоприл залишається на лінії старту, а співекстрактивні речовини мігрують до лінії фінішу.

Після висушування пластину елюювали в системі розчинників толуен — метанол — кислота ацетатна концентрована (9:1:1), висушували, проявляли смугу "свідка" 2% розчином 5,5'-дитіобіс(2-нітробензойної кислоти) в метанолі, рН якого доведено до 8 розчином амоніаку, та спостерігали пляму жовтого кольору з  $R_f = 0,60$ .

За допомогою скальпеля навпроти плями "свідка" з пластини ретельно знімали сорбент з площі 3 см × 1 см у скляний флакон. У флакон додавали 10 мл 0,01 М розчину кислоти хлористоводневої та струшували протягом 5 хв, після чого фільтрували через фільтр ("червона стрічка") до мірної колби місткістю 10,0 мл, нейтралізували 10% роз-

чином натрію гідроксиду (рН = 7) та доводили об'єм розчину через фільтр водою очищеною до позначки.

**Методика дослідження елюату методом реакційної ТШХ [2].** Елюат (5 мл), отриманий в ході ТШХ-очистки, переносили в ділільну лійку та екстрагували сумішшю хлороформ — пропанол-2 (8:2) об'ємом 10 мл. Отриману витяжку збирали через паперовий фільтр ("червона стрічка") з 1 г натрію сульфатом безводним до мірної колби місткістю 10,0 мл, доводили об'єм хлороформом до позначки (очищена витяжка).

На лінію старту хроматографічної пластини наносили в дві точки по 100 мкл очищеної витяжки і в одну з точок вводили 0,6% розчин гідрогену пероксиду. Поряд наносили по 10 мкл стандартного хлороформного розчину каптоприлу (концентрація 1 мг/мл) і стандартного метанольного розчину каптоприлу дисульфід (концентрація 1 мг/мл) у точки.

Після висушування проб при кімнатній температурі пластину елюювали в системі розчинників толуен — метанол — кислота ацетатна концентрована (9:1:1).

Після елюювання пластину висушували і обробляли сумішшю 15% розчину феруму (ІІ) хлориду і 1% розчину калію гексаціаноферату (ІІ) (1:1). При цьому утворюювалися плями, забарвлені в синій колір;  $R_f$  плям каптоприлу і каптоприлу дисульфід становили 0,60 і 0,36 відповідно. Величина відношення  $R_f$  другої і першої плям становила 0,60. Пляма каптоприлу забарвлюється миттєво. Забарвлення плями каптоприлу дисульфід розвивається поступово протягом 5–10 хв.

#### Результати та їх обговорення

Запропоновано схему спрямованого дослідження біологічного матеріалу на каптоприл (схема).

Запропоновані методики ідентифікації каптоприлу методом ТШХ та реакційної ТШХ дозволяють виявити 0,2 мкг каптоприлу в пробі.

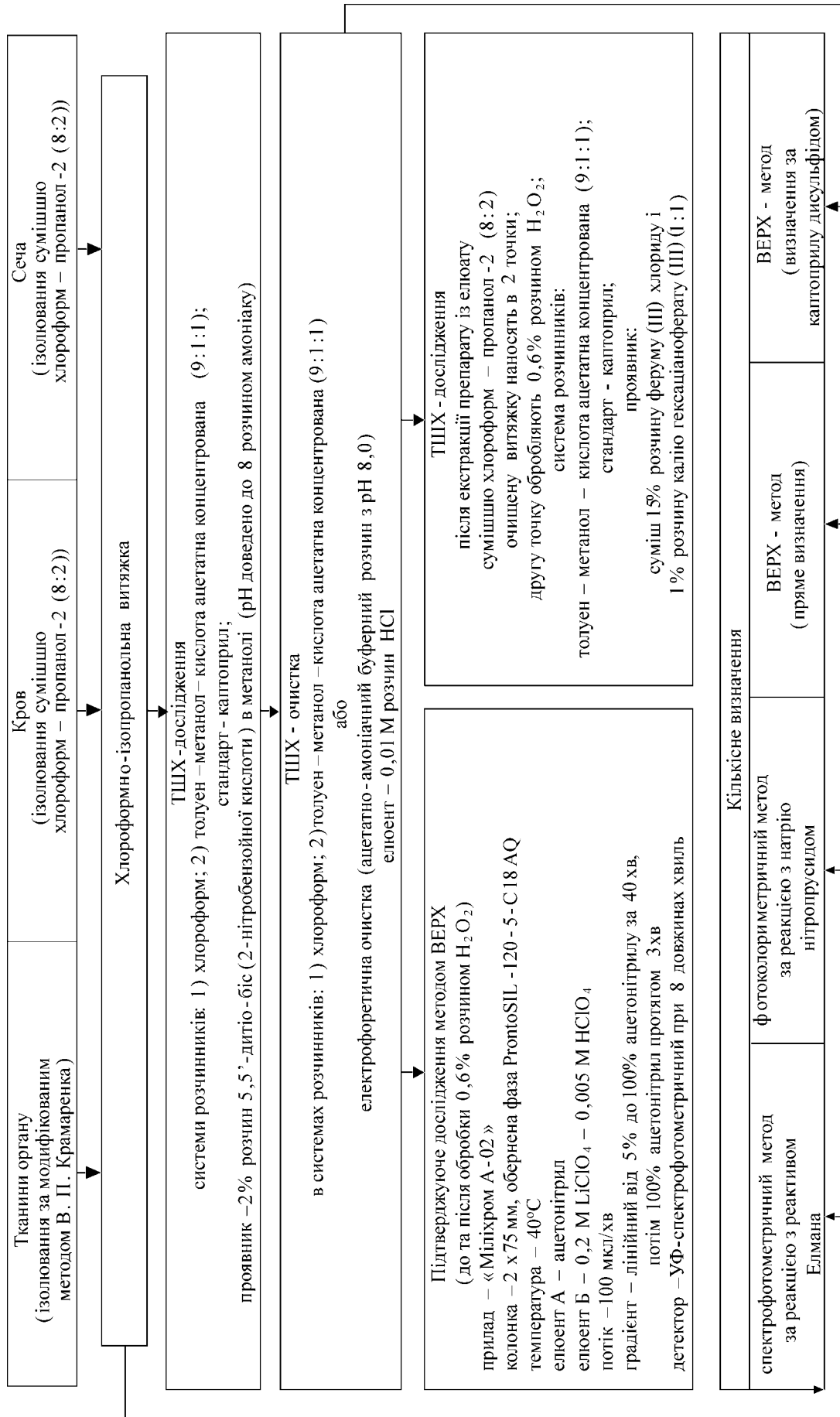
Запропонована методика ТШХ-очистки дозволяє виділити з пластини не менше як 90% препарату [3].

Кількість каптоприлу в навазці біологічного матеріалу  $X$  (мкг/10 г) рекомендовано розраховувати за наступною формулою:

$$X = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3}{V_2},$$

де:  $C$  — концентрація каптоприлу в розчині, що аналізується, мкг/мл;  $V_1$  — об'єм хлороформної витяжки, отриманої з навазки біологічного матеріалу, мл;  $V_2$  — об'єм хлороформної витяжки, взятої для аналізу, мл;  $V_3$  — об'єм мірної колби, мл.

Застосування вперше запропонованого комплексу методик дозволить ефективно, експресно та специфічно ідентифікувати та кількісно визначити каптоприл у витяжках із об'єктів біологічно-



го походження, що, в свою чергу, дозволить фіксувати випадки гострих та смертельних отруєнь зазначеним препаратом.

Запропоновані методики ідентифікації та кількісного визначення не дозволяють виявити каптоприл при прийомі середньої терапевтичної дози, через що неможливо зробити хибноопозитивний висновок про отруєння капторилом.

Експерт може обирати методику кількісного визначення каптоприлу в залежності від наявності

у нього відповідного обладнання та мети дослідження.

#### ВИСНОВКИ

Запропоновано схему спрямованого дослідження біологічного матеріалу на каптоприл з детальним викладенням методик ізолювання каптоприлу, очищення витяжок із біологічного матеріалу від співекстрактивних речовин, виявлення та кількісного визначення препарату у біологічному матеріалі.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Болотов В.В., Шовкова З.В., Мерзлікін С.І. // *Фармац. журн.* — 2007. — №1. — С. 54-58.
2. Болотов В.В., Шовкова З.В., Мерзлікін С.І. / *Акт. питання фарм. та мед. науки та практики: зб. наук. ст.* — Запоріжжя: Вид-во ЗДМУ, 2007. — Вип. XX. — С. 276-277.
3. Болотов В.В., Шовкова З.В., Мерзлікін С.І., Клименко Л.Ю. // *ЖОФХ.* — 2007. — Т. 5, вип. 4 (20). — С. 63-66.
4. Доерфель К. *Статистика в аналитической химии* / Пер. с нем. — М.: Мир, 1969. — 223 с.
5. Шовкова З.В., Болотов В.В., Мерзлікін С.І., Клименко Л.Ю. // *Запорож. мед. журн.* — 2008. — №5. — С. 148-150.
6. Шовкова З.В., Болотов В.В., Мерзлікін С.І. / *Стан, перспективи судово-токсикол. служби та наук. досліджень: матер. наук.-практ. конф. за міжнар. участю, 9-10 листоп. 2005 р., Харків.* — Х.: Вид-во НФаУ, 2005. — С. 33-34.
7. Шовкова З.В., Мерзлікін С.І., Болотов В.В. // *Вісник фармації.* — 2006. — №3 (47). — С. 31-34.
8. Augenstein W.L., Kulig K.W., Rumack B.H. // *J. Am. Med. Asso.* — 1988. — Vol. 259. — P. 3302-3305.
9. Chodorowski Z., Anand J.S., Waldman W. // *Przegl Lek.* — 2003. — Vol. 60 (4). — P. 233-235.
10. Jonsson A., Holmgren P., Ahlner J. // *Forensic Sci. Int.* — 2004. — Vol. 143. — P. 53-59.
11. Lahti R.A., Vuori E. // *Forensic Sci. Int.* — 2003. — Vol. 136. — P. 35-46.
12. Lechleitner P., Dzien A., Haring D., Glossmann H. // *Toxicol.* — 1990. — Vol. 64. — P. 325-329.
13. Park H., Purnell G.V., Mirchandani H.G. // *Clin. Tox.* — 1990. — Vol. 28. — P. 379-382.
14. Rogde S., Hougen H.P., Poulsen K. // *Forensic Sci. Int.* — 1996. — Vol. 80. — P. 211-219.
15. Worm K., Steentoft A., Christensen H. // *Ugeskr. Laeger.* — 1988. — Vol. 150. — P. 1039-1043.
16. Worm K., Steentoft A. // *Ugeskr. Laeger.* — 1994. — Vol. 156. — P. 3039-3043.

УДК 615.225.2:543.062.061:543.544:543.42

НАПРАВЛЕННИЙ ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧЕСКИЙ АНАЛІЗ БІОЛОГІЧЕСКОГО МАТЕРІАЛА НА КАПТОПРИЛ

З.В.Шовковая, В.В.Болотов, С.И.Мерзликин, Л.Ю.Клименко  
Разработана схема направленного исследования биологического материала на каптоприл с детальным изложением методик изолирования каптоприла, очистки вытяжек из биологического материала от соэкстрактивных веществ, обнаружения и количественного определения препарата в биологическом материале.

UDC 615.225.2:543.062.061:543.544:543.42

THE CHEMICAL AND TOXICOLOGICAL ANALYSIS OF THE BIOLOGICAL MATERIAL DIRECTED TO CAPTOPRIL

Z.V.Shovkova, V.V.Bolotov, S.I.Merzlikin, L.Yu.Klimenko  
The scheme of analysis of the biological material directed to captopril with a detailed description of captopril isolation methods, purification methods of extracts from the biological material from co-extractive substances, detection and quantitative determination of a medicine in the biological material has been developed.