

# ВЫЯВЛЕНИЕ ВЕРАПАМИЛА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Л.Л. Квачахия\*, канд. фарм. наук, В.К. Шорманов, докт. фарм. наук, профессор  
Курский государственный медицинский университет;  
305041, Курск, ул. К. Маркса, д. 3

\*E-mail: Lekso82@yandex.ru

Разработана методика количественного определения верапамила в крови и моче. В качестве изолирующего агента для извлечения верапамила из биологических жидкостей предложен ацетон. Для идентификации и количественного определения верапамила в извлечениях из крови и мочи применены методы ТСХ, хромато-масс-спектрометрии и УФ-спектрофотометрии. Методика позволяет идентифицировать и определять в извлечениях из крови до 97,15%, а из мочи до 98,86% верапамила. Минимально выявляемые количества верапамила в 100 г этих биожидкостей составляют соответственно 0,25 и 0,08 мг.

**Ключевые слова:** верапамил, биологические жидкости, идентификация, определение.

Верапамил (альфа-[3-[[2-(3,4-диметокси-фенил)этил]метиламино]про-пил]-3,4-диметокси-альфа-(1-метилэтил) бензолацетонитрил) является одним из основных препаратов группы блокаторов кальциевых каналов. Он обладает антиаритмической, антиангинальной и антигипертензивной активностью. Препарат снижает потребность миокарда в кислороде за счет снижения сократимости миокарда и уменьшения частоты сердечных сокращений. Вызывает расширение коронарных сосудов сердца и увеличивает коронарный кровоток [2, 6]. По физическим свойствам верапамил – бесцветный кристаллический порошок с температурой плавления 146°C, хорошо растворим в этиловом спирте и воде, практически нерастворим в эфире [2, 4].

Верапамил достаточно токсичен для теплокровных животных и человека. LD<sub>50</sub> для крыс при внутривенном введении составляет 16 мг/кг, при внутривенном введении – 341 мг/кг [4, 5]. Есть данные о случаях отравления людей верапамилем, в том числе с летальным исходом [3].

Токсические свойства, широкое применение рассматриваемого соединения, наличие случаев летального отравления делают его потенциальным объектом судебно-химического исследования. Вопросы идентификации и количественного определения верапамила в биологических жидкостях разработаны недостаточно.

Цель настоящего исследования – разработка методики идентификации и количественного определения верапамила в крови и моче.

## Экспериментальная часть

Объект исследования – верапамил, соответствующий требованиям НД 42-5047-01 и дополнительно очищенный путем перекристаллизации из хлороформа.

Рассматривалась возможность применения ацетона в качестве изолирующего агента для извлечения верапамила из биожидкостей человека. Эксперименты проводили на модельных смесях верапамила с кровью или мочой, которые выдерживали 1,5 ч при температуре 16–18°C в темном месте [1]. Исследовали зависимость степени извлечения анализируемого вещества из той или иной биожидкости ацетоном от кратности настаивания, ее продолжительности, количественного соотношения изолирующего агента и биологического материала.

Извлечения хроматографировали на пластинах «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ, подвижная фаза – гексан–ацетон (2:8). Хроматограммы проявляли в УФ-свете. Анализируемое вещество идентифицировали по величине R<sub>f</sub> вещества-свидетеля и элюировали с сорбента этиловым спиртом. По величине оптической плотности элюата, измеряемой в области максимума наиболее длинноволновой полосы, рассчитывали количественное содержание верапамила, используя уравнение калибровочного графика.

Для очистки верапамила, выделенного из биологического материала, использовали хроматографию низкого давления в колонке 490×11 мм с сорбентом «Силасорб С-18» (размер частиц – 30 мкм). Изучали хроматографическое поведение анализируемого вещества при использовании полярных элюентов (смесей ацетонитрила с водой или водными растворами различной реакции). Элюаты собирали фракциями по 2 мл каждая. Обнаружение верапамила во фракциях элюата осуществляли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ), используя пластины «Сорбфил» и подвижную фазу гексан–ацетон (2:8).

Для подтверждающей идентификации верапамила применяли хромато-масс-спектрометрию (ГХ МС). Использовали газовый хроматограф Agilent Technologies 6890N с масс-селективным квадрупольным детектором 5973N. Процесс хроматографирования осуществляли в колонке DB-1MS с неподвижной жидкой фазой диметилполисилоксана (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 содержащихся веществ выполняли в режиме регистрации по полному ионному току (диапазон сканирования – 40–550 m/z).

Для подтверждающей идентификации и количественного определения анализируемого соединения применяли метод Уф-спектрофотометрии.

Оптимальные условия для извлечения верапамила из биожидкостей ацетоном: 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 30 мин.

Исследование хроматографического поведения верапамила в колонке с сорбентом «Силасорб С-18» показало, что при использовании подвижной фазы ацетонитрил–вода (9:1) верапамил присутствует во фракциях элюата с 14 по 17 включительно (27–34 мл).

При определении верапамила методом (ГХ МС) объем вводимой пробы составлял 1 мкл, проба вводилась в режиме без деления потока, задержка – 3 мин. Газом-носителем служил гелий, подаваемый со скоростью 39 см<sup>3</sup>/с. Начальная температура термостата колонки составляла 80°С, которая выдержива-

лась в течение 2 мин, после чего осуществляли нагревание до 250°С со скоростью 40°С/мин. Время при конечной температуре – 6 мин. Температура инжектора – 280°С, температура интерфейса детектора – 300°С. Исследования в предлагаемых условиях показали, что на газо-жидкостной хроматограмме анализируемого соединения обнаруживается пик с временем удерживания 13,4 мин.

Масс-спектр вещества, соответствующего данному пику, включает **сигналы ряда осколков с характерными массами (58, 84, 107, 130, 151, 177, 260, 303)**. Основным (масса которого принимается за 100%) является осколок с массой 303. Подобное сочетание характерных осколков вещества с временем удерживания 13,4 мин позволяет с достаточной степенью селективности идентифицировать анализируемое вещество как верапамил.

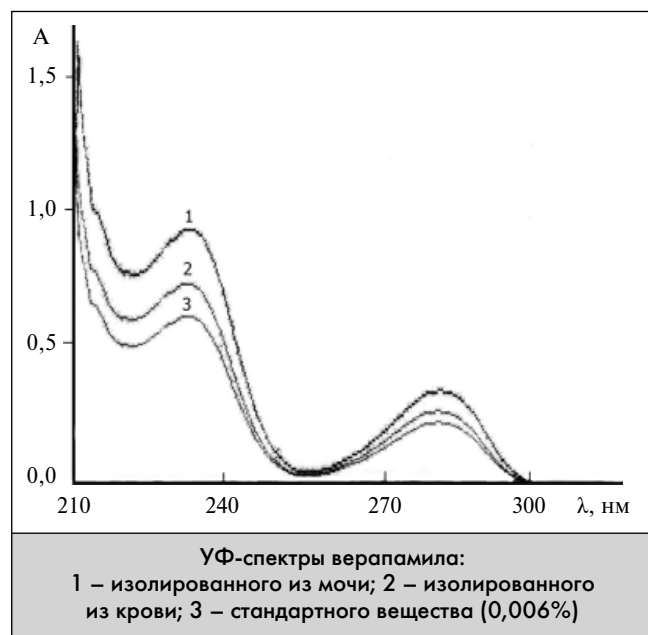
Исследование особенностей светопоглощения верапамила в УФ- и видимой областях показало, что оптимальные условия определения могут быть достигнуты при таком растворителе, как этиловый спирт. Поглощение верапамила в данной системе характеризуется наличием 3 характерных полос с максимумами при 205 и 232 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. Сравнение УФ-спектров стандартного верапамила и верапамила, выделенного из биологического материала, показало отсутствие дополнительных полос или заметного увеличения фонового поглощения (см. рисунок). При этом основные оптические характеристики верапамила, выделенного из биологических объектов, совпадали 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 имеет вид:  $A = 0,010202 \cdot C - 0,001794$ .

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 биологических жидкостях.

**Изолирование верапамила из биожидкостей.** К 10 г крови или мочи прибавляли 20 г ацетона и выдерживали полученную смесь 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 комнатной температуре до получения сухого остатка.



**Очистка извлечения.** Сухой остаток растворяли в 2,7 мл ацетонитрила, к раствору прибавляли 0,3 мл воды, полученный раствор 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. Верапамил обнаруживали во фракциях методом ТСХ: пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ, подвижная фаза гексан–ацетон (2:8). Фракции с 14 по 17 включительно объединяли, испаряли в токе воздуха при температуре 16–22°C. Остаток растворяли в 5 мл этилового спирта.

В 2 выпарительные чашки вносили соответственно 0,1–2,0 и 1,0–2,5 мл этанольного раствора и испаряли растворитель.

**Предварительная идентификация методом ТСХ.** Остаток в чашке 1 растворяли в небольшом количестве этанола и количественно переносили раствор 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 хромато-масс-спектрометрии (ГХ МС).** Остаток в чашке 2 растворяли в 2 мл этилового спирта. 1 мкл полученного раствора вводили в хроматограф Agilent Technologies 6890 N с масс-селективным квадрупольным детектором модели 5973N. Пробу вводили без деления потока и хроматографировали в вышеописанных условиях. Верапамил идентифицировали по сочетанию времени удерживания вещества в неподвижной фазе колонки и специфического набора сигналов характеристических заряженных частиц в его масс-спектре.

**Подтверждающая идентификация и количественное определение методом электронной спектрофотометрии.** После предварительного хроматографирования методом ТСХ по вышеуказанной схеме участок хроматограммы с анализируемым веществом вырезали и элюировали вещество 5–10 мл этилового спирта. Поглощение полученного элюата 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, ис-

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕРАПАМИЛА В МОДЕЛЬНЫХ СМЕСЯХ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ ОБЪЕКТАМИ

Внесено верапамила (мг в 25 г биологического объекта)	Найдено, % (n=5; p=0,95)			
	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	$\Delta\bar{x}$
	В крови			
2,5	94,87	3,62	1,62	4,16
5,0	95,37	3,29	1,47	3,79
12,5	95,65	2,99	1,29	3,44
25,0	96,15	2,71	1,21	3,10
50,0	97,15	2,68	1,20	3,08
	В моче			
2,5	97,73	2,0	0,89	2,35
5,0	98,17	1,83	0,82	2,10
12,5	98,23	1,54	0,69	1,77
25,0	98,76	1,37	0,61	1,58
50,0	98,86	1,27	0,57	1,48

пользуя уравнение калибровочного графика, и пересчитывали на навеску анализируемого вещества, внесенную в биологический материал.

Результаты количественного определения верапамила представлены в таблице. Как свидетельствуют полученные данные, при содержании верапамила 2,5–50,0 мг в 25 г биологической жидкости предлагаемая методика позволяет определить 94,87–97,15% анализируемого вещества в крови и 97,73–98,86% в моче с достаточной для биологических исследований воспроизводимостью и правильностью. Минимально выявляемые количества верапамила в 100 г этих биожидкостей составляют соответственно 0,25 и 0,08 мг.

### Вывод

Разработана методика идентификации и количественного определения верапамила в извлечениях из крови и мочи с помощью методов ТСХ, хромато-масс-спектрометрии и УФ-спектрофотометрии.

### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Квачахия Л.Л., Шорманов В.К. Идентификация нифедипина в биологических жидкостях. Фармация, 2013; 62, (8): 16–19 (Quachakhia L.L., Shormanov V.K. Nifedipine identification in biological fluids. Farmatsiya. 2013; 62 (8): 16–19 (in Russian)).
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства Т.1. (Изд. 13). Харьков: Торсинг, 1998: 560 (Mashkovsky M.D. Medicines. Vol. 1. (13<sup>th</sup> edition). Kharkov: Torsing, 1998: 560 (in Russian)).
3. Седов А.Т. Мужановский Э.Б. Судебно-химическое доказательство отравления верапамилем. Судебно-медицинская экспертиза, 1980; 23, (2): 48–50 (Sedov A.I., Muzhanovsky E.B. Forensic-chemical evidence of verapamil poisoning. Sudebno-meditsinskaya expertiza. 1980; 23 (2): 48–50 (in Russian)).
4. (+/-)-Verapamil hydrochloride. Chemical Properties, Usage, Production // Chemical Book. 2010. Mode of access: [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB7664827.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7664827.htm).
5. Satish Kumar K., Ravi Kumar K., Ravi Kumar D.V.V. et al. Validated new spectrophotometric methods for the estimation of verapamil in pharmaceutical dosage forms. J. Pharm. Educ. Res., 2010; 1, (2): 96–100.

Поступила 28 марта 2014 г.

## DETECTION OF VERAPAMIL IN BIOLOGICAL FLUIDS

**L.L. Kvachakhia, PhD; Professor V.K. Shormanov, PhD**

*Kursk State Medical University; 3, K. Marx St., Kursk 305041*

### SUMMARY

A procedure was developed to quantify verapamil in blood and urine. Acetone was proposed as an isolating agent to be used for the extraction of verapamil from biological fluids. The authors showed that the test compound could be purified from the co-extractives of the biomaterial on a column packed with the sorbent Silasorb C-18 with a particle size of 30- $\mu\text{m}$ . In doing this, the optimal eluate is a mixture of acetonitrile solvents and water (9:1). Thin layer chromatography, chromatography mass spectrometry, and UV-spectrophotometry were used to identify and quantify verapamil in the blood and urine extractions. The procedure can identify and determine 97.15 and 98.86% of verapamil in the blood and urine extractions, respectively. The minimally detectable amounts of verapamil in 100 g of these biofluids are 0.25 and 0.08 mg, respectively.

**Key words:** verapamil, biological fluids, identification, quantification.