



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

### ІЗОЛЮВАННЯ КАПТОПРИЛУ ІЗ ТКАНИН ПЕЧІНКИ

Національний фармацевтичний університет

**Ключові слова:** каптоприл, тонкошарова хроматографія, вискоелективна рідина на хроматографія, спектрофотометрія у видимій області, фотоколориметрія, екстракція, ізолювання із біологічного матеріалу.

**Ключевые слова:** каптоприл, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, спектрофотометрия в видимой области, фотоколориметрия, экстракция, изолирование из биологического материала.

**Keywords:** captoprile, thin-layer chromatography, high-performance liquid chromatography, VIS-spectrophotometry, photocolorimetry, extraction, isolation from biological material.

Визначено доцільність застосування загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання органічних отрут щодо каптоприлу. Розроблено ефективний та експресний окремий метод ізолювання каптоприлу із біологічного матеріалу на основі модифікації методу В. П. Крамаренка, що дозволяє виділити 65% препарату. Запропоновано методики ідентифікації каптоприлу у витягах із біологічного матеріалу, а також очищення одержаних витягів від співекстрактивних речовин із застосуванням методів ТШХ та електрофорезу.

Определена целесообразность применения общепринятых в химико-токсикологическом анализе методов изолирования органических ядов относительно каптоприла. Разработан эффективный и экспрессный частный метод изолирования каптоприла из биологического материала на основе модификации метода В. Ф. Крамаренко, который позволяет выделить 65% препарата. Предложены методики идентификации каптоприла в извлечениях из биологического материала, а также очистки полученных извлечений от соэкстрактивных веществ с применением методов ТСХ и электрофореза.

Expedience of application of the generally accepted in the chemico-toxicological analysis isolation methods of organic poisons in relation to captoprile has been defined. The effective and express private method of captoprile isolation from biological material on the basis of modification of method V. F. Kramarenko, which allows to isolate 65% preparation has been developed. The methods of captoprile identification in extractions from biological material and also the methods of cleaning of these from co-extractive matters by methods of TLC and electrophoresis have been offered.

На сьогодні лікарські засоби для лікування захворювань серцево-судинної системи посідають одне з перших місць на ринку лікарських препаратів, і, як наслідок, смертельні випадки при прийомі зазначених препаратів трапляються досить часто. Звичайно, прийом серцево-судинних засобів є постійним, а в деяких випадках і довічним і фіксується у пацієнтів у віці старше 40 – 50 років. У цьому віці поширені розлади нервової системи, безсоння, внаслідок чого на фоні прийому серцево-судинних засобів хворі вживають снодійні і седативні засоби, транквілізатори. Особливу увагу слід приділити тому, що в країнах пострадянського простору, а зокрема і в Україні, більшість серцево-судинних засобів, за винятком, мабуть, лише препаратів наперстянки і строфанту, можна купити в аптеці без рецепту. Внаслідок цього почастишали випадки самопризначення хворими собі препаратів даної групи без необхідного за цих умов ретельного підбору препарату в умовах стаціонару або хоча б під наглядом лікаря.

В літературних джерелах описано спроби суїциду антигіпертензивними засобами. Третє місце посідають інгібітори АПФ, а саме, каптоприл. В деяких країнах фіксується до 10 летальних випадків на рік внаслідок передозувань каптоприлом [10-14, 16, 17].

Інформація щодо отруєнь каптоприлом на території України відсутня, в першу чергу тому, що методи його хіміко-токсикологічного дослідження не розроблено, а клінічна картина отруєнь та передозувань не має чітко виражених специфічних симптомів, тому в діагностиці цих отруєнь велику увагу приділяють результатам хіміко-токсикологічних досліджень.

Першим етапом проведення цих досліджень є ізолю-

вання препарату із біологічного матеріалу, і провести його необхідно з максимальним виходом.

**МЕТОЮ ДАНОЇ РОБОТИ** є дослідження ефективності ізолювання каптоприлу із тканин печінки за допомогою загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів: О. О. Васильєвої, Стаса-Отто, В. П. Крамаренка, П. Валова [3, 6], О. В. Удалова (модифікація методу Стаса-Отто) [7], а також розробка модифікацій та доповнень до зазначених методів з метою підвищення ступеню ізолювання каптоприлу із біологічного матеріалу.

Попередньо нами досліджено умови екстракції каптоприлу із водних розчинів органічними розчинниками, що найчастіше використовують у хіміко-токсикологічному аналізі, та сумішню хлороформ – ізопропанол у різних співвідношеннях при різних значеннях рН. При цьому встановлено, що найбільш ефективними екстрагентами для каптоприлу є хлороформ (ступінь одноразової екстракції R становить 55% при рН = 2,0 – 3,0) та суміш хлороформ – ізопропанол у співвідношенні 8:2 (R = 80% при рН = 2,0 – 3,0), а гексан є найпридатнішим для очищення «кислих» водних витягів із біологічного матеріалу від співекстрактивних речовин, завдяки відсутності здатності екстрагувати каптоприл із водних розчинів незалежно від рН середовища. Ступінь екстракції каптоприлу із водних розчинів діетиловим етером не перевищує 35% (рН = 2,0 – 3,0) [2].

Крім того, доведено, що випаровування органічних витягів на водяній бані призводить до зменшення ступеню екстракції каптоприлу вдвічі, ймовірно, за рахунок окиснення каптоприлу до каптоприлу дисульфїду [15]. Тому нами рекомендовано проводити видалення органічного розчинника по током холодного повітря.

### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

При дослідженні виділення каптоприлу із біологічного матеріалу використовували модельні суміші препарату з печінкою, що не зазнала гнилісних змін, взятою від трупа людини, яка загинула від травм. Для цього до 10 г подрібненої печінки (розмір частинок не повинен перевищувати 1 мм) додавали 1,00 мл розчину каптоприлу в воді очищеній (2000 мкг препарату), ретельно перемішували і залишали на добу. Готували також контрольні суміші печінки з розчинником (вода очищена), дослідження яких проводили паралельно з основними.

Кількість каптоприлу, що використовували для проведення модельних дослідів, було розраховано, виходячи з даних літератури щодо кількості препарату в органах і тканинах людини при смертельних отруєннях [10, 14, 17].

На першому етапі досліджень ізолювання каптоприлу з біологічного матеріалу проводили за допомогою методів О. О. Васильєвої, Стаса-Отто, П. Валова, В. П. Крамаренка [3, 6], що було модифіковано (модифікація I) шляхом зменшення наважок біологічного матеріалу до 10 г, відповідного зменшення об'ємів органічних розчинників та заміни стадій проціджування на центрифугування.

«Кислі» хлороформні або етерні витяги збирали до мірної колби місткістю 50,0 мл та доводили хлороформом або діетиловим етером відповідно до позначки. Таким чином одержували витяг 1 (за О. О. Васильєвою), витяг 2 (за В. П. Крамаренком), витяг 3 (за Стасом-Отто) та витяг 4 (за П. Валовим).

Крім того, виділення каптоприлу із біологічного матеріалу проводили за допомогою методики, запропонованої О. В. Удаловим [7], що є модифікацією методу Стаса-Отто та відрізняється від нього тим, що екстракцію етанолом проводять в нейтральному середовищі, а осадження білків проводять за допомогою ацетону після підкислення спиртового витягу кислотою хлористоводневою – одержували 50,0 мл витягу 5.

На другому етапі наших досліджень з урахуванням результатів, одержаних при вивченні екстракції каптоприлу з водних розчинів, ми проводили ізолювання препарату із тканин печінки за допомогою зазначених методів із заміною органічного розчинника (хлороформ або діетиловий етер) на суміш хлороформ – ізопропанол (8:2) та одержували по 50,0 мл «кислих» хлороформно-ізопропанольних витягів із біологічного матеріалу – витяг 6 (модифікація II методу О. О. Васильєвої), витяг 7 (модифікація II методу В. П. Крамаренка), витяг 8 (модифікація II методу П. Валова).

По 5, 10 та 100 мкл одержаних витягів використовували для ідентифікації каптоприлу методом ТШХ.

Кількісне визначення каптоприлу проводили за спектрофотометричною, фотоколориметричною та ВЕРХ-методиками в 20 мл одержаних витягів за методиками, що висвітлено нами в роботах [5, 8, 9]. Дослідження методом ВЕРХ проводили після очистки одержаних витягів за методом ТШХ або електрофорезу.

**МЕТОДИКА ТШХ-ОЧИСТКИ ВИТЯГІВ ІЗ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ.** 20 мл витягу із біологічного мате-

ріалу випаровують на водяній бані до сухого залишку, який розчиняють у 0,5 мл хлороформу та кількісно наносять на лінію старту хроматографічної пластини «Sorbfil» смугою шириною 2 см. Пластину елюювали в системі розчинників толуен – метанол – кислота ацетатна концентрована (9:1:1) в присутності «свідка» – каптоприлу. Попередньо пластину двічі елюють в хлороформі з метою очистки від співекстрактивних речовин.

Після висушування проявляють смугу «свідка» 2% розчином 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти (реактив Еллмана) в метанолі, рН якого доведено до 8 розчином амоніаку.

За допомогою скальпелю навпроти плями «свідка» з пластини ретельно знімають сорбент з площі 3 см × 1 см в скляний флакон. У флакон додають 10 мл 0,01 М розчину кислоти хлористоводневої та струшують протягом 5 хв., після чого фільтрують до мірної колби місткістю 10,0 мл та доводять через фільтр («червона стрічка») відповідним розчинником до позначки.

**МЕТОДИКА ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНОЇ ОЧИСТКИ ВИТЯГІВ ІЗ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ.** Концентрований як зазначено вище витяг кількісно наносять на лінію старту хроматографічного паперу FN-5 смугою шириною 2 см.

Папір з нанесеними пробами вносять в електроліт (ацетатно-амоніачний буферний розчин з рН 8,0) та проводять електрофорез протягом 60 хв. при напрузі 400 В у присутності «свідка» – каптоприлу. Лінію старту розташовують з катодного кінця.

Фореграми висушують, пляму «свідка» проявляють 2% розчином реактиву Еллмана в метанолі, рН якого доведено до 8 розчином амоніаку.

Вирізають фрагмент паперу площею 4 см × 2 см навпроти плями «свідка» та вносять у скляний флакон. У флакон додають 10 мл 0,01 М розчину кислоти хлористоводневої та струшують протягом 5 хв., після чого фільтрують до мірної колби місткістю 10,0 мл та доводять через фільтр («червона стрічка») відповідним розчинником до позначки.

Ідентифікацію каптоприлу методом ТШХ проводили на хроматографічних пластинках «Sorbfil» в системі розчинників толуен – метанол – кислота ацетатна концентрована (9:1:1) в присутності «свідка» – каптоприлу – за методикою, що розроблена нами раніше [1]. Для проявлення плям на пластинках використовували 2% розчин реактиву Еллмана в метанолі, рН якого доведено до 8 розчином амоніаку.

У випадку позитивного результату проводили електрофоретичну або ТШХ-очистку одержаного витягу (див. вище), після чого проводили підтвердуючі дослідження елюату методами ВЕРХ як за незмінним препаратом, так і за його «маркером» – каптоприлу дисульфідом [8] та реакційної ТШХ [4]. Для проведення дослідження методом реакційної ТШХ елюат, одержаний після очистки, екстрагували 10 мл суміші хлороформ – ізопропанол (8:2).

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати кількісного визначення каптоприлу у витягах із біологічного матеріалу наведено в таблиці.



Таким чином, потрібно зазначити, що найкращі результати ізолювання каптоприлу було одержано за умов обробки біологічного матеріалу кислотами та використання для екстракції препарату із «кислого» водного витягу суміші хлороформ – ізопропанол (8:2).

Таблиця

**Результати ізолювання каптоприлу із тканин печінки та їх метрологічні характеристики (n = 3, α = 0,95)**

Витяг	Метод ізолювання	Виділено каптоприлу, %*
1	за О. О. Васильєвою (модифікація I)	27,24±5,36
2	за В. П. Крамаренком (модифікація I)	25,14±4,83
3	за Стасом-Отто	5,21±2,38
4	за П. Валовим (модифікація I)	29,43±2,72
5	за О. В. Удаловим	–
6	за О. О. Васильєвою (модифікація II)	47,15±1,70
7	за В. П. Крамаренком (модифікація II)	65,14±4,00
8	за П. Валовим (модифікація II)	39,45±2,27

*Примітка:* за результатами кількісного визначення спектрофотометричним методом за фотометричною реакцією з реактивом Еллмана [5]

За методикою, запропованою О. В. Удаловим, каптоприл із біологічного матеріалу виділити не вдалося.

В умовах проведення ідентифікації позитивний результат одержано для витягів 1-4 та 6-8. За допомогою запропонованої ТШХ-методики ідентифікації можна виявити каптоприл при його вмісті в пробі не менше 0,1 мкг. Слід зазначити, що співекстрактивні речовини в умовах проведення ідентифікації не заважають виявленню каптоприлу в витягах із біологічного матеріалу.

Запропоновані методики електрофоретичної та ТШХ-очистки дозволяють елюювати з паперу або пластини не менш як 90% препарату.

**ВИСНОВКИ**

1. Вивчено умови ізолювання каптоприлу з біологічного матеріалу на модельних сумішах з печінкою за допомогою модифікованих методів О. О. Васильєвої, Стаса-Отто, В. П. Крамаренка та П. Валова, що найчастіше застосовуються у сучасному хіміко-токсикологічному аналізі. Встановлено, що з використаних методів найбільш ефективними є методи О. О. Васильєвої, В. П. Крамаренка та П. Валова, що дозволяють ізолювати до 30% каптоприлу за умов неспрямованого пошуку отруйної речовини, а використання методу Стаса-Отто як в класичному варіанті, так і в модифікації О. В. Удалова є недоцільним у зв'язку з неможливістю ізолювання препарату із біологічного матеріалу.

2. Запропоновано окрему методику ізолювання каптоприлу із біологічного матеріалу на основі модифікованого методу В. П. Крамаренка, що дозволяє виділити до 65% препарату.

3. Запропоновано умови ідентифікації каптоприлу у

витягах із біологічного матеріалу, а також очистки одержаних витягів від співекстрактивних речовин з використанням методів ТШХ та електрофорезу.

4. Експериментально доведено доцільність застосування розроблених спектрофотометричної, фотоколориметричної та ВЕРХ-методик для кількісного визначення каптоприлу у витягах з біологічного матеріалу.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Болотов В. В. Застосування хроматографії в тонких шарах сорбенту та кольорових реакцій в аналізі каптоприлу / В. В. Болотов, З. В. Шовкова, С. І. Мерзлікін // Фармацевтичний журнал. – 2007. – №1. – С. 54 – 58.
2. Исследование степени экстракции каптоприла из водных растворов органическими растворителями / З.В. Шовкова, В.В. Болотов, С.И. Мерзликін, Л.Ю. Клименко // Тези доповідей Всеукраїнського конгресу «Сьогодення та майбутнє фармації» (16 – 19 квітня 2008 р., м. Харків). - Харків: Вид-во НФаУ, 2008. – С. 102.
3. Крамаренко В.Ф. Токсикологическая химия / В. Ф. Крамаренко. - Киев: Вища школа, 1989. – 429 с.
4. Патент 29704 Україна, МПК 2006 G01N31/20. Специфічний спосіб виявлення каптоприлу / Болотов В.В., Шовкова З.В., Клименко Л.Ю., Мерзлікін С.І. – № u 2007 10313; заявлено 17. 09. 2007; опубл. 25. 01. 2008, Бюл. №1. – 6 с.
5. Спектрофотометричне визначення каптоприлу за допомогою фотометричної реакції з реактивом Еллмана / В.В. Болотов, З.В. Шовкова, С.І. Мерзлікін, Л.Ю. Клименко // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2007. – Т. 5, вип. 4 (20). – С. 63-66.
6. Токсикологическая химия: учеб. / под ред. Т.В. Плетеневой. – М.: ГЭО-ТАР-Медиа, 2005. – 512 с.
7. Удалов А.В. Пробоподготовка при судебно-химическом определении малолетучих органических веществ / А. В. Удалов // Лабораторный журнал. – 2003. – №1 (3), июль. – С. 54-58.
8. Шовкова З.В. Високоєфективна рідинна хроматографія в аналізі каптоприлу / З.В. Шовкова, С.І. Мерзлікін, В.В. Болотов // Вісник фармації. – 2006. – №3 (47). – С. 31-34.
9. Шовкова З.В. Розробка методу кількісного визначення каптоприлу / З.В. Шовкова, В.В. Болотов, С.І. Мерзлікін // Мат. науково-практ. конф. і з міжнародною участю «Стан, перспективи судово-токсикологічної служби та наукових досліджень». – Харків, 2005. – С. 25-26.
10. Augenstein W. L. Captopril overdose resulting in hypotension / W.L. Augenstein, K.W. Kulig, B.H. Rumack // J. Am. Med. Asso. - 1988. - V. 259. - P. 3302-3305.
11. Chodorowski Z. Suicidal poisoning with antihypertensive drugs / Z. Chodorowski, J. S. Anand, W. Waldman // Przegl Lek. – 2003. – V. 60 (4). – P. 233 – 235.
12. Jonsson A. Fatal intoxication in a Swedish forensic autopsy material during 1992 – 2002 / A. Jonsson, P. Holmgren, J. Ahlner / Forensic Sci. Int. – 2004. – V. 143. – P. 53 – 59.
13. Lahti R. A. Fatal drug poisoning: medico-legal reports and mortality statistics / R. A. Lahti, E. Vuori // Forensic Sci. Int. – 2003. – V. 136. – P. 35 – 46.
14. Park H. Suicide by captopril overdose / H. Park, G. V. Purnell, H. G. Mirchandani // Clin. Tox. – 1990. – V. 28. – P. 379 – 382.
15. Physico-chemical and analytical characteristics of captopril / V. Caplar, S. Rendic, F. Kajfez, H. Hofman, J. Kufitinec // Acta Pharm. Jugosl. – 1982. – V. 32 (2). – P. 125 – 136.
16. Rogde S. Suicides in two Scandinavian capitals – a comparative study / S. Rogde, H.P. Hougen, K. Poulsen // Forensic Sci. Int. – 1996. – V. 80. – P. 211-219.
17. Uneventful self-poisoning with a very high dose of captopril / P. Lechleitner, A. Dzien, D. Haring, H. Glossmann // Toxicology. – 1990. – V. 64. – P. 325-329.

**Відомості про авторів:** Шовкова Зоя Виталівна - асистент кафедри токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету; Болотов Валерій Васильович – завідувач кафедри аналітичної хімії Національного фармацевтичного університету, доктор хімічних наук, професор, тел.роб. 8(057)267-94-24; Мерзлікін Сергій Іванович – професор кафедри токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету, доктор фармацевтичних наук, професор, тел.роб. 8(057)267-91-92; Клименко Лина Юрївна - асистент кафедри аналітичної хімії Національного фармацевтичного університету, кандидат фармацевтичних, тел.роб. 8(057)267-94-24

**Адреса для листування:** Харьков, пер. Пятигорський, д.6, кв.10.

© З.В. Шовкова, В.В. Болотов, С.І. Мерзлікін, Л.Ю. Клименко, 2008