

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

РОЗРОБКА МЕТОДИК ІЗОЛЮВАННЯ КАПТОПРИЛУ З БІОЛОГІЧНИХ РІДИН ОРГАНІЗМУ

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: каптоприл, тонкошарова хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія, спектрофотометрія у видимій області, фотоколориметрія, екстракція, ізолювання з крові та сечі.

Ключевые слова: каптоприл, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, спектрофотометрия в видимой области, фотоколориметрия, экстракция, изолирование из крови и мочи.

Key words: captoprile, thin-layer chromatography, high-performance liquid chromatography, VIS-spectrophotometry, photocolourimetry, extraction, isolation from blood and urine.

Вивчено умови ізолювання каптоприлу з біологічних рідин на модельних сумішах з кров'ю та сечею за допомогою різних осаджувачів формених елементів крові й білків, що найчастіше застосовуються в сучасному хіміко-токсикологічному аналізі. Встановлено, що серед використаних методів найбільш ефективними є ізолювання каптоприлу з крові й сечі за умов обробки біологічних рідин 1 М і 0,1 М розчинами кислоти хлористоводневої та використання для екстракції препарату з «кислого» водного витягу суміші хлороформ – пропанол-2 (8:2).

Изучены условия изолирования каптоприла из биологических жидкостей на модельных смесях с кровью и мочой с помощью различных осадителей форменных элементов крови и белков, которые чаще всего применяются в современном химико-токсикологическом анализе. Установлено, что из использованных методов наиболее эффективными являются изолирование каптоприла из крови и мочи при условиях обработки биологических жидкостей 1 М и 0,1 М растворами кислоты хлористоводородной и использовании для экстракции препарата из «кислого» водного извлечения смеси хлороформ – пропанол-2 (8:2).

The conditions of captoprile isolation from biological liquids at model mixtures with blood and urine by different precipitants of hemocytes and albumens, which are used the most frequent in the modern chemico-toxicological analysis have been studied. It has been set that the method of captoprile isolation from blood and urine at the conditions of treatment of biological liquids by 1 M and 0,1 M hydrochloric acid solutions and the using of mixture of chloroform and propanol-2 (8:2) for extraction of preparation from acid aqueous extraction is the most effective.

За даними наукової літератури, каптоприл викликає значний інтерес в аспекті хіміко-токсикологічних досліджень, оскільки на сьогодні лікарські засоби для лікування захворювань серцево-судинної системи посідають одне з провідних місць на ринку лікарських препаратів, і, як наслідок, смертельні випадки при прийомі зазначених препаратів трапляються досить часто. Пов'язано це, в першу чергу, із загостренням основного захворювання у пацієнтів при невірному доборі препарату або внаслідок резистентності організму до нього. Нерідкими є також випадки суїцидів серцево-судинними засобами. При цьому трапляються як моно-, так і полівалентні отруєння.

Так, у Польщі за період з 1990 по 2002 роки на лікуванні знаходились понад 200 пацієнтів віком від 15 до 84 років (середній вік – 36 років), серед яких більшість жінок, після спроби суїциду антигіпертензивними засобами. Основні причини отруєнь – різні види депресій (63%), такі як психопатії і/або соціопатії (16%) і шизофренія (10%). 28 пацієнтів були з повторною спробою суїциду. Тільки 36 осіб отруїлися лише антигіпертензивними засобами, в інших випадках інтоксикації були сумішню антигіпертензивних засобів з іншими видами ліків. Найчастіше фіксували прийом β-адреноблокаторів (38,3%), блокаторів кальцієвих каналів (34,8%) та інгібіторів АПФ (24,3%). Лікарські препарати, що найчастіше використовувались у досліджуваних випадках, – пропранолол, амлодипін, теофілін і каптоприл. Смертність, пов'язана з використанням антигіпертензивних засобів, у Польщі становить 1,5% [11,12].

Подібна картина спостерігається і в деяких скандинавських

країнах, а саме в Фінляндії, Данії та Швеції, а також у Німеччині – фіксується до 10 летальних випадків на рік внаслідок передозувань каптоприлом [8–10, 13–18, 20–24].

Проте, інформація щодо отруєнь каптоприлом на території України відсутня, не в останню чергу тому, що методи його хіміко-токсикологічного дослідження не розроблено.

Одним із найважливіших етапів хіміко-токсикологічного дослідження є проведення ізолювання препарату з біологічного матеріалу, зокрема з біологічних рідин, з максимально можливим виходом.

МЕТА РОБОТИ

Розробка методів ізолювання каптоприлу з біологічних рідин організму – крові й сечі. Це викликає особливий інтерес, оскільки, як засвідчили наші попередні дослідження [2] щодо ізолювання каптоприлу з тканин печінки, виділити препарат з достатнім виходом за допомогою загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів О.О. Васильєвої, Стаса-Отто, В.П. Крамаренка, П. Валова тощо не є можливим.

Попередні дослідження умов екстракції каптоприлу з водних розчинів органічними розчинниками показали, що найбільш ефективними екстрагентами для каптоприлу є хлороформ (ступінь одноразової екстракції R становить 55% при рН=2,0–3,0) і суміш хлороформ–пропанол-2 у співвідношенні 8:2 (R=80% при рН=2,0–3,0) [3].

Крім того, доведено, що випаровування органічних витягів на водяній бані призводить до зменшення ступеня екстракції каптоприлу вдвічі, ймовірно, за рахунок окиснення каптоприлу до каптоприл дисульфідіду [19].



Тому рекомендовано проводити видалення органічного розчинника током холодного повітря.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

При дослідженні виділення каптоприлу з біологічних рідин використовували модельні суміші крові й сечі з препаратом. Для цього до 10 мл відповідної біологічної рідини додавали 1 мл розчину каптоприлу в воді очищеній (2000 мкг препарату), ретельно перемішували і залишали на добу. Готували також контрольні суміші біологічних рідин з розчинником (вода очищена), дослідження яких проводили паралельно з основними.

Кількість каптоприлу, що використовували для проведення модельних дослідів, розраховано, виходячи з відомостей наукової літератури [8,18,21] щодо кількості препарату в біологічних рідинах людини при смертельних отруєннях.

Ізолювання каптоприлу з крові проводили за трьома методиками, що відрізнялись використаним осаджувачем для формених елементів крові й білків.

У першому випадку до 10 мл модельної суміші крові з каптоприлом додавали 5 мл 10% водного розчину кислоти трихлорацетатної, перемішували й залишали на годину при постійному перемішуванні. Суміш центрифугували (протягом 5 хв. при 5000 об/хв), зливали надосадову рідину, перевіряли рН (має дорівнювати 2–3) і тричі екстрагували сумішшю хлороформ–пропанол-2 (8:2) порціями по 20 мл.

У другому випадку 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 (за необхідності краплями додавали 6 М розчин кислоти хлористоводневої до рН=2), залишали на 2 години при постійному перемішуванні. Суміш центрифугували (протягом 5 хв. при 5000 об/хв), зливали надосадову рідину й тричі екстрагували сумішшю хлороформ–пропанол-2 (8:2) порціями по 20 мл.

У третьому випадку до 10 мл модельної суміші крові з каптоприлом додавали 50 мл 96% етанолу, перемішували та залишали на 1 годину при постійному перемішуванні. Суміш центрифугували (протягом 5 хв. при 5000 об/хв), зливали надосадову рідину й випаровували етанол током холодного повітря до об'єму близько 10 мл. До залишку додавали 20 мл 0,01 М розчину кислоти хлористоводневої й тричі екстрагували сумішшю хлороформ–пропанол-2 (8:2) порціями по 20 мл.

Ізолювання каптоприлу з сечі проводили в такий спосіб: 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.

Одержані витяги («кислий» хлороформно-ізопропанольний витяг) об'єднували, фільтрували через паперовий фільтр («червона стрічка») з 1 г натрій сульфату безводного до мірної колби місткістю 50 мл та доводили об'єм хлороформом до позначки. Таким чином отримували витяги 1, 2, 3 та 4.

По 5, 10 та 100 мкл одержаних витягів використовували для ідентифікації каптоприлу методом ТШХ [1,4].

Кількісне визначення каптоприлу проводили за спектрофотометричною, фотоколориметричною та ВЕРХ-методиками в 20 мл одержаних витягів за методиками, що висвітлено

в роботах [5,6,7]. Дослідження методом ВЕРХ проводили після очистки одержаних витягів за методом ТШХ або електрофорезу.

Методика ТШХ-очистки витягів з біологічних рідин. 20 мл витягу з біологічних рідин випаровують на водяній бані до сухого залишку, який розчиняють у 0,5 мл хлороформу й 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) за наявності «свідка» – каптоприлу. Попередньо пластину двічі елюють у 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 8,0 розчином амоніаку.

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

Методика електрофоретичної очистки витягів з біологічних рідин. 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) і проводять електрофорез протягом 60 хв. при напрузі 400 В за наявності «свідка» – каптоприлу. Лінію старту розташовують з катодного кінця.

Фореграми висушують, пляму «свідка» проявляють 2% розчином реактиву Еллмана в метанолі, рН якого доведено до 8,0 розчином амоніаку.

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

Ідентифікацію каптоприлу методом ТШХ проводили на хроматографічних пластинах «Sorbfil» в системі розчинників толуен–метанол–кислота ацетатна концентрована (9:1:1) у присутності «свідка» – каптоприлу – за методикою, що розроблена нами раніше [1]. Для проявлення плям на пластинах використовували 2% розчин реактиву Еллмана в метанолі, рН якого доведено до 8,0 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» – каптоприл дисульфідом [6] та реакційної ТШХ [4]. Для проведення дослідження методом реакційної ТШХ елюат, одержаний після очистки, екстрагували 10 мл суміші хлороформ–пропанол-2 (8:2).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати кількісного визначення каптоприлу у витягах з біологічних рідин наведено в *табл. 1*.



Результати ізолювання каптоприлу з біологічних рідин та їх метрологічні характеристики (n = 3, α = 0,95)

Витяг	Метод ізолювання	Виділено каптоприлу, %			
		спектрофотометричний за фотометричною реакцією з реактивом Еллмана	фотоколориметричний за фотометричною реакцією з натрій нітропрусидом	ВЕРХ – пряме визначення (після ТШХ-очистки)	ВЕРХ – визначення за каптоприл дисульфідом (після ТШХ-очистки)
1	з крові (методика I)	—	—	—	—
2	з крові (методика II)	75,59 ± 1,30	75,91 ± 3,79	74,04 ± 2,27	74,53 ± 2,52
3	з крові (методика III)	14,64 ± 1,30	16,16 ± 3,79	15,43 ± 0,86	15,26 ± 1,18
4	з сечі	89,70 ± 2,84	89,63 ± 3,79	90,23 ± 1,09	90,77 ± 1,24

Отже потрібно зазначити, що найкращі результати ізолювання каптоприлу з крові й сечі б одержано за умов обробки біологічних рідин 1 М та 0,1 М розчинами кислоти хлористоводневої та використання для екстракції препарату із «кислого» водного витягу суміші хлороформ–пропанол-2 (8:2).

У випадку застосування розчину кислоти трихлорацетатної виділити каптоприл з крові не вдалося, що, можливо, пояснюється великим ступенем співосадження препарату на формених елементах крові.

В умовах проведення ідентифікації позитивний результат одержано для витягів 2–4. За допомогою запропонованих ТШХ-методик 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 з біологічних рідин.

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

ВИСНОВКИ

Вивчено умови ізолювання каптоприлу з біологічних рідин на модельних сумішах з кров'ю й сечею за допомогою різних осаджувачів формених елементів крові та білків, що найчастіше застосовуються у сучасному хіміко-токсикологічному аналізі. Встановлено, що з використаних методів найбільш ефективними є ізолювання каптоприлу з крові й сечі за умов обробки біологічних рідин 1 М та 0,1 М розчинами кислоти хлористоводневої та використання для екстракції препарату з «кислого» водного витягу суміші хлороформ–пропанол-2 (8:2).

Запропоновано умови ідентифікації каптоприлу у витягах з біологічних рідин, а також очистки одержаних витягів від співекстрактивних речовин з використанням методів ТШХ й електрофорезу.

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

ЛІТЕРАТУРА

1. Болотов 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. Шовкова З.В. Ізолювання каптоприлу із тканин печінки / З.В.

Шовкова, В.В. Болотов, С.І. Мерзлікін, Л.Ю. Клименко // Запорож. мед. журн. – 2008. – №5. – С. 148–150.

3. Шовкова З.В. Исследование степени экстракции каптоприла из водных растворов органическими растворителями / З.В. Шовкова, В.В. Болотов, С.И. Мерзликін, Л.Ю. Клименко // Сьогодні та майбутнє фармації: тез. доп. Всеукр. конгр., 16–19 квіт. 2008 р., Харків. – Х.: Вид-во НФаУ, 2008. – С. 102.
4. Пат. 29704 Україна, МПК 2006 G01N31/20. Специфічний спосіб виявлення каптоприлу / Болотов В.В., Шовкова З.В., Клименко Л.Ю., Мерзлікін С.І. – № 2007 10313; заявл. 17.09.2007; опубл. 25.01.2008, Бюл. №1.
5. Болотов В.В. 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. Шовкова З. Високоєфективна рідинна хроматографія в аналізі каптоприлу / З.В. Шовкова, С.І. Мерзлікін, В.В. Болотов // Вісник фармації. – 2006. – №3 (47). – С. 31–34.
7. Шовкова З. Розробка методу кількісного визначення каптоприлу / З.В. Шовкова, В.В. Болотов, С.І. Мерзлікін // Стан, перспективи судово-токсикологічної служби та наукових досліджень: матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 9–10 листоп. 2005 р., Харків. – Х.: Вид-во НФаУ, 2005. – С. 25–26.
8. Augenstein W. Captopril overdose resulting in hypotension / W. L. Augenstein, K. W. Kulig, B. H. Ruckmuck // J. Am. Med. Asso. – 1988. – V. 259. – P. 3302–3305.
9. Blomquist M. Fatal drug intoxications in Sweden 1970–1975 / M. Blomquist, P. Holmgren, G. Waernbaum // Svensk Farmaceutisk Tidskrift. – 1976. – V. 80. – P. 400–404.
10. Carlsten A. Suicides by drug poisoning among the elderly in Sweden 1969–1996 / A. Carlsten, M. Waern, P. Allebeck // Soc. Psychiatry Psychiatr. Epidemiol. – 1999. – V. 34. – P. 609–614.
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. Czarnecka E. Influence of captopril and enalapril on some central effects of ethanol / E. Czarnecka, B. Pietrzak // Acta Pol. Pharm. – 2002. – V. 59 (1). – P. 71–75.
13. Flanagan R. J. Recording acute poisoning deaths / R. J. Flanagan, C. Rooney // Forensic Sci. Int. – 2002. – V. 128. – P. 3–19.
14. 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.
15. Koski A. Interaction of alcohol and drugs in fatal poisonings / A. Koski, I. Ojanpera, E. Vuori // Hum. Exp. Toxicol. – 2003. – V. 22 (5). – P. 281–288.
16. Lahti R. A. Fatal alcohol poisoning: medicolegal practices and mortality statistics / R. A. Lahti, E. Vuori // Forensic Sci. Int. – 2002. – V. 126. – P. 203–209.
17. 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.
18. *Park H.* Suicide by captopril overdose / *H. Park, G.V. Purnell, H.G. Mirchandani* // *Clin. Tox.* – 1990. – V. 28. – P. 379–382.
19. Physico-chemical and analytical characteristics of captopril / *V. Caplar, S. Rendic, F. Kajfez, H. Hofman, J. Kuftinec* // *Acta Pharm. Jugosl.* – 1982. – V. 32 (2). – P. 125–136.
20. *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.
21. 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.
22. *Worm K.* Fatal cases of poisoning in Eastern Denmark over a 5-year period / *K. Worm, A. Steentoft, H. Christensen* // *Ugeskr. Laeger.* – 1988. – V. 150. – P. 1039–1043.
23. *Worm K.* Fatal poisonings in Eastern Denmark 1984 – 1991 / *K. Worm, A. Steentoft* // *Ugeskr. Laeger.* – 1994. – V. 156. – P. 3039–3043.
24. *Worm K.* Fatal poisonings during a 5-year period in Eastern Denmark / *K. Worm, A. Steentoft* // *Ugeskr. Laeger.* – 1999. – V. 161. – P. 6622–6625.

Відомості про авторів:

Шовкова З.В., асистент каф. токсикологічної хімії НФаУ.

Болотов В.В., д. хім. н., професор, зав. каф. аналітичної хімії НфаУ.

Мерзлікін С.І., д. фарм. н., професор каф. токсикологічної хімії НфаУ.

Клименко Л.Ю., к. фарм. н., асистент каф. аналітичної хімії НфаУ.

Адреса для листування:

Шовкова Зоя Віталіївна, м. Харків, пров. П'ятигорський, буд. 6, кв. 10.

Тел.: (057) 703 32 82, (0572) 67 91 92