doi: 10.17116/sudmed201558239-45

Химико-токсикологическое определение дилтиазема

Д. фарм. н., проф. В.К. ШОРМАНОВ[1], к. фарм. н. Л.Л. КВАЧАХИЯ[1], асп. Д.П. ШЕРБАКОВ[1], эксп. А.В. ЧАПЛЫГИН[2], эксп. В.Н. ЛЯМИН[2]

[1]ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» (ректор — проф. В.А. Лазаренко), Курск, Россия, 305041; [2]ЭКЦ УВД по Курской области (нач. — А.В. Положенков), Курск, Россия, 305000

The chemico-toxicological determination of dilthiasem

V.K. SHORMANOV, L.L. KVACHAKHIYA, D.P. SHCHERBAKOV, A.V. CHAPLYGIN, V.N. LYAMIN

Federal budgetary educational institution of higher professional education «Kursk State Medical University», Russian Ministry of Health, Kursk, Russia, 305041; Expert Criminalistic Centre, Kursk Regional Department of Internal Affairs, Kursk, Russia, 305000

Цель исследования — определение оптимальных условий изолирования дилтиазема, его очистки сочетанием методов экстракции и колоночной хроматографии и разработка универсальной методики определения дилтиазема в биологическом материале. Методами анализа являлись ТСХ, ГХ МС, экстракция, колоночная хроматография низкого давления и спектрофотометрия. Изучено сравнительное изолирование дилтиазема из биологического материала 12 изолирующими агентами органической природы, водой и водными растворами. Обосновано применение ацетона в качестве универсального изолирующего агента для извлечения дилтиазема из тканей трупных органов и биожидкостей. Показана возможность очистки анализируемого соединения от эндогенных веществ биоматериала сочетанием жидкость-жидкостной экстракции и хроматографии в колонке сорбента Силасорб С-18 30 мкм. Для идентификации и количественного определения дилтиазема в извлечениях из ткани трупной печени и крови предложены методы ТСХ, фотометрии и хромато-масс-спектрометрии (ГХ МС).

Ключевые слова: дилтиазем, изолирование, идентификация, определение.

The objective of the present study was to determine the optimal conditions for isolation of dilthiasem, its purification by the combination of the extraction and column chromatography techniques, and the development of the universal method for the detection of this compound in the biological material. Other research methods included thin layer chromatography (TLC), gas chromatography mass-spectrometry (GH-MS), extraction, low-pressure column chromatography, and spectrophotometry. The effectiveness of dilthiasem isolation from the biological material with the use of 12 organic substances, water, and aqueous solutions was compared. The use of acetone as the universal solvent for dilthiasem isolation from the tissues and biological fluids of the cadaveric organs was substantiated. It was shown that dilthiasem can be purified from endogenous substances contained in the biological materials by means of combined liquid-liquid extraction and chromatography on the 30 mcm Silasorb C-18 column. The new modifications of thin layer chromatography and gas chromatography mass-spectrometry (GH-MS) are proposed for the identification and quantitative determination of dilthiasem isolated from cadaveric blood and hepatic tissue.

Keywords: dilthiasem, isolation, identification, quantitative determination.

Дилтиазем — D-*цис*-3-Ацетокси-2,3-дигидро-5-[2-(диметиламино)этил]-2-(2-метоксифенил)-1,5-бензотиазепин-4(5Н)-она гидрохлорид — применяется как антагонист ионов кальция при стенокардии, ИБС и гипертонической болезни, а также обладает антиаритмической активностью [1, 2].

Это белый или не совсем белый кристаллический порошок с горьким вкусом, температура плавления 213 °С, легко растворим в воде, метаноле, дихлорметане, плохо растворим в этаноле [3, 4].

Дилтиазем обладает выраженными токсическими свойствами по отношению к теплокровным организмам и может вызывать отравление различной степени тяжести. Его LD_{50} при внутрижелудочном введении лабораторным животным колеблется от 190±14,61 до 140±14,23 мг/кг (p<0,05) [2]. Зафиксированы летальные отравления дилтиаземом людей на территории Российской Федерации и за рубежом [3, 5—7].

Широкое применение дилтиазема в медицинской практике, его токсические свойства, наличие случаев летального отравления делают его важным объектом судебно-химического анализа.

Для изолирования дилтиазема из трупного материала используют классические методы, которые не позволяют достичь высокой степени изолирования рассматриваемого вещества (степень извлечения 7—30%) и относительно малочувствительны [3, 8].

Ряд известных вариантов исследования дилтиазема в биологическом (трупном) материале, основанных на изолировании метанолом и ацетонитрилом, не предусматривают достаточно высокой степени очистки, что не позволяет в полной мере использовать возможности современных высокочувствительных методов анализа [8].

Недостаточно высокая степень извлечения дилтиазема из биоматериала и очистки аналита от соэкстрактивных веществ биологических матриц характеризует уни-

© Коллектив авторов, 2015

[1]e-mail: R-WLADIMIR@yandex.ru; [2]e-mail: ekc@fitmail.ru

версальный метод пробоподготовки QuEChERS, а также метод, основанный на замораживании биологического объекта до температуры –70 °С с последующей ультразвуковой обработкой [9, 10].

Таким образом, несмотря на очевидное судебно-химическое значение дилтиазема, в химико-токсикологическом отношении он изучен недостаточно. Например, требуют дальнейшей разработки вопросы извлечения его из биоматериала, очистки и определения в извлечениях.

Цель настоящего исследования — определение оптимальных условий изолирования дилтиазема, его очистки сочетанием методов экстракции и колоночной хроматографии и разработка универсальной методики определения дилтиазема в биологическом материале.

Материал и методы

Объект исследования — субстанция дилтиазема гидрохлорида с содержанием основного вещества не менее 99,9%, соответствующая НД.

Изучали особенности изолирования дилтиазема из биологического материала 12 органическими растворителями, водой и водными растворами различной реакции. Для этого готовили модельные смеси дилтиазема (размер частиц 5—50 мкм) и мелкоизмельченной (размер частиц 0,2—0,5 мм) ткани печени с содержанием 12,5 мг вещества в 25 г биоматериала, которые выдерживали 1,5 ч при температуре 18—20 °С. Осуществляли двукратное (по 45 мин) изолирование дилтиазема при соотношении изолирующего агента и биоматериала 2:1 (по массе). Оба извлечения из каждой модельной смеси объединяли, часть объединенного извлечения хроматографировали на пластинах Сорбфил ПТСХ-АФ-В-УФ (подвижная фаза хлороформ—ацетон; 5:5 по объему). На хроматограммах в УФ-свете дилтиазем определялся в виде темного пятна с Rf 0,57±0,03. Вещество элюировали этанолом в течение 15 мин и идентифицировали по особенностям поглощения элюата в УФ-части спектра. По величине оптической плотности элюата, измеренной при длине волны 278 нм (спектрофотометр СФ-56, длина оптического пути 10 мм), определяли количество дилтиазема, используя уравнение градуировочного графика.

По наибольшему значению степени извлечения дилтиазема из биоматериала определяли оптимальный изолирующий агент. С помощью описанной схемы изолирования, очистки и определения дилтиазема исследовали зависимость величины степени его извлечения из биоматериала оптимальным изолирующим агентом от продолжительности контакта изолирующей жидкости с биоматериалом, кратности настаивания и количественного соотношения изолирующего агента и биологической ткани.

При моделировании условий очистки дилтиазема от соэкстрактивных веществ биологических матриц методом жидкость-жидкостной экстракции иссследовали особенности распределения дилтиазема в системах из двух несмешивающихся фаз (водная и органическая) в зависимости от природы органической фазы, pH водной среды, кратности экстракции, влияния насыщения водной фазы электролитами, природы электролита.

Определяя возможность очистки дилтиазема методом обращенно-фазовой колоночной хроматографии, изучали особенности его хроматографического поведения в колонке 120×11 мм, заполненной 7,5 г сорбента Силасорб С-18 30 мкм. Элюенты — полярные растворители (ацетонитрил, диоксан, ацетон) с различным содержанием воды. Элюаты собирали фракциями по 2 мл каждая. Дилтиазем обнаруживали во фракциях методом ТСХ [пластины Сорбфил ПТСХ-АФ-В-УФ, подвижная фаза ацетон—хлороформ (5:5), объем фракции, наносимый на пластину, 5—10 мкл].

Параллельно осуществляли контрольное хроматографирование на колонке извлечения из 25 г ткани печени. Фракции элюата, в которых теоретически возможно присутствие анализируемого вещества, объединяли, испаряли, растворяли остаток в 25 мл этанола и измеряли оптическую плотность раствора при 278 нм (растворитель и длина волны соответствуют условиям определения дилтиазема методом спектрофотометрии).

Для предварительной идентификации дилтиазема изучили возможность применения нормально-фазной ТСХ. Вещество хроматографировали на пластинах Сорбфил ПТСХ-АФ-В-УФ в подвижной фазе ацетон—хлороформ (5:5). Для подтверждающей идентификации и количественного определения дилтиазема рассмотрена возможность применения фотометрических методов и хромато-масс-спектрометрии (вариант ГХ МС).

Изучали особенности светопоглощения дилтиазема в различных жидких средах органической и неорганической природы с применением спектрофотометра СФ-56 и кварцевых кювет (толщина рабочего слоя 10 мм).

Для фотометрических определений в видимой области вводили в структуру дилтиазема электрофильный заместитель (нитрогруппа) и получали аци-нитросоль образующегося нитропроизводного.

При определении дилтиазема методом ГХ МС использовали газовый хроматограф фирмы «Agilent Technologies» (США) модели 6890N с масс-селективным квадрупольным детектором модели 5973N («Agilent Technologies») и колонку DB-1MS («J&W Scientific», США) с неподвижной жидкой фазой диметилполисилоксан (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 вещества проводили в режиме регистрации по полному ионному току (диапазон сканирования 40—550 m/z).

Результаты и обсуждение

Как свидетельствуют полученные результаты, наибольшая степень извлечения достигается при использовании в качестве изолирующего агента ацетона **(рис. 1)**.

Для максимально эффективного извлечения дилтиазема ацетоном из ткани печени необходимо как минимум двукратное настаивание биоматериала с изолирующим агентом, если количество ацетона в каждом случае превышает количество биоматериала как минимум в 2 раза по массе, а продолжительность каждого настаивания составляет не менее 45 мин.

Изучение экстракции дилтиазема показало, что он в наибольшей степени извлекается гидрофобными растворителями из щелочных растворов, а оптимальным экстрагентом является диэтиловый эфир; коэффициент распределения (если r=1) равен 49—62,7 при pH 10,0—12,0. Введение электролитов (калия хлорид, декагидрат сульфата натрия, аммония сульфат) в водную фазу коэффициент распределения заметно не изменяет.

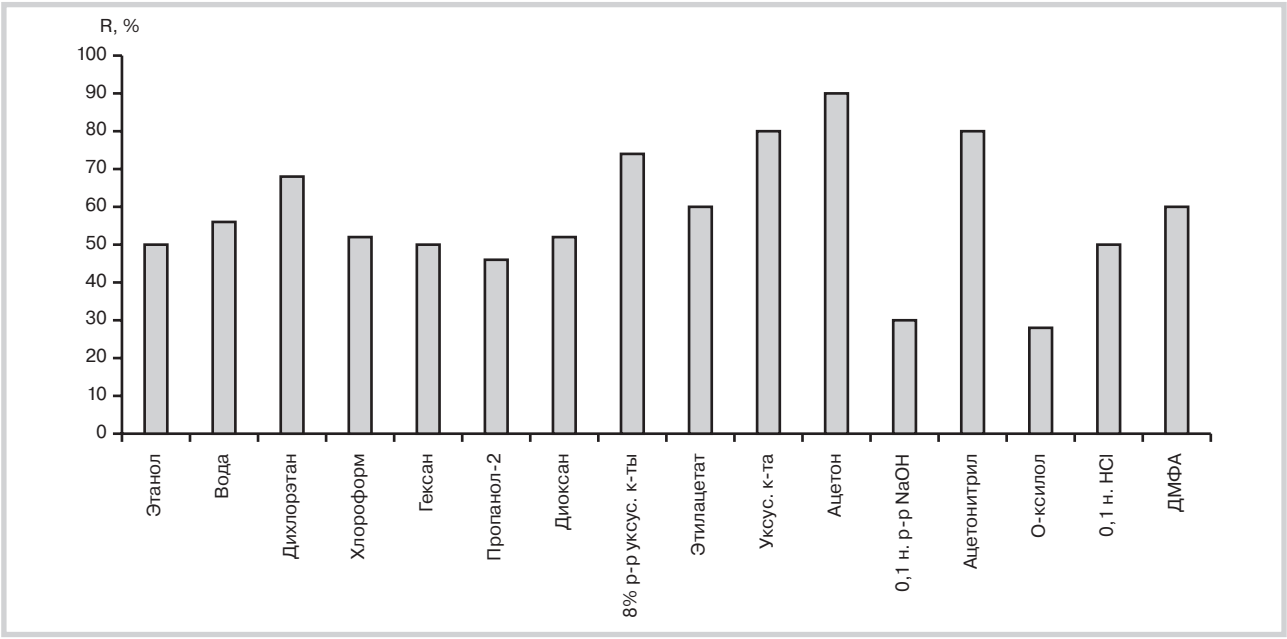

Рис. 1. **Результаты сравнительного изолирования дилтиазема из ткани печени различными растворителями.**

Результаты изучения хроматографического поведения дилтиазема в колонке обращенно-фазового сорбента приведены в **табл. 1**.

Как свидетельствуют полученные данные, подвижные фазы на основе ацетонитрила, диоксана и ацетона с содержанием 7—15% воды обеспечивают достаточно компактный выход вещества из колонки Силасорб С-18 30 мкм в фракциях №5—20 (10—40 мл) элюата. В качестве оптимальной для очистки дилтиазема выбрана подвижная фаза на основе ацетонитрила, содержащая 9% воды (соотношение ацетонитрил—вода 9,1:0,9). При ее применении дилтиазем элюируется фракциями №8—9 (4 мл).

В опытах с трупной тканью, не содержащей дилтиазема, установили, что фоновое поглощение раствора $^1/_4$ сухого остатка фракций, в которых возможно присутствие данного вещества, в этаноле незначительно и не превышает 0,009 при длине волны 278 нм.

На электронных спектрах дилтиазема в различных средах (хлороформ, 95% этанол, ацетонитрил, 0,1 н. раствор хлороводородной кислоты, вода и 0,1 н. раствор гидроксида натрия) обнаружили присутствие выраженных полос поглощения в области 205—210 нм (ε=37934,4—66037,7), 237—242 нм (ε=13545,9—50579,2) и в области 278—281 нм (ε=2531,4—4768,2). В дальнейшем средой для определения дилтиазема методом спектрофотометрии выбрали 95% этанол.

Установлено, что в реакции с нитратом калия в среде концентрированной серной кислоты дилтиазем при температуре 18—22 °С переходит в нитропроизводное, образующее в водно-щелочной среде окрашенный продукт (аци-нитросоль). Подчинение основному закону светопоглощения для реакции нитрования дилтиазема и последующего получения аци-нитросоли соответствует интервалу концентраций 2,5—200 мкг/мл. Градуировочный гра-

Таблица 1. **Результаты хроматографирования дилтиазема в колонке сорбента Силасорб С-18 30 мкм**

Подвижные фазы (элюенты)		Фракции элюата, в которых присутствует дилтиазем (объем каждой фракции — 2 мл)
органический компонент подвижной фазы	содержание воды в подвижной фазе (абс., %)	
Ацетонитрил	0	4—5
	3	4—6
	7	5—8
	9	8—9
	10	18—20
Диоксан	0	4—5
	5	5—6
	10	14—16
	15	17—19
	20	28—29
Ацетон	0	3—4
	5	4
	10	6—7
	15	15
	20	31

фик (коэффициент корреляции $r \geqslant 0{,}99$) имеет вид: A=0,010171·C+0,089425 (A — оптическая плотность, C — концентрация вещества в фотометрируемом растворе). При определении дилтиазема методом спектрофотометрии в субстанции относительная ошибка среднего результата не более 1,2%.

Для определения дилтиазема методом ГХ МС предложены условия, при которых начальная температура термостата колонки составляла 80 °С (задержка на 2 мин). Температуру программировали от 80 до 250 °С со скоростью 40 °С/мин с выдержкой при конечной температуре 6 мин. Температура инжектора составляла 280 °С, температура интерфейса — 300 °С. Газ-носитель — гелий, скорость подачи которого 39 см/с. Объем вводимой пробы 1 мкл, пробу вводили в режиме без деления потока, задержка 3 мин. В данных условиях на хроматограммах наблюдали пик (время удерживания 11,7 мин), соответствующий дилтиазему. Масс-спектр вещества, соответствующего данному пику, включает сигналы ряда осколков с характерными массами (58, 77, 104, 121, 150, 178). Основным, масса которого принимается за 100%, является осколок массой 58.

Сочетание сигналов характерных осколков в масс-спектре и времени удерживания в колонке обеспечивает достаточно высокую селективность идентификации рассматриваемого соединения методом ГХ МС. Открываемый минимум дилтиазема составляет при этом $0{,}2 \cdot 10^{-9}$ г в хроматографируемой пробе.

Методика определения дилтиазема в биологическом материале

Изолирование. 25 г биологического объекта, содержащего дилтиазем, настаивали дважды по 45 мин с порциями ацетона массой 50 г каждая при перемешивании, затем объединяли извлечения. Объединенное извлечение пропускали через стеклянный фильтр диаметром 4 см со слоем безводного сульфата натрия толщиной 1,5—2,0 см, затем слой сульфата натрия промывали 20 мл изолирующего агента. Фильтраты объединяли, растворитель из объединенного фильтрата испаряли при комнатной температуре.

Очистка экстракцией. Остаток растворяли в 10 мл 0,1 М раствора хлороводородной кислоты, раствор фильтровали через бумажный фильтр, фильтр промывали 10 мл 0,1 М раствора хлороводородной кислоты. Фильтрат и промывную жидкость объединяли, доводили pH раствора 1 М раствором натрия гидроксида до 8,0—9,0 и экстрагировали диэтиловым эфиром дважды по 40 мл. Экстракты объединяли в выпарительной чашке и испаряли в токе воздуха до сухого остатка.

Очистка колоночной хроматографией. Остаток, полученный после очистки экстракцией, растворяли в 2 мл смеси ацетонитрил—вода (9,1:0,9) и вносили данную смесь в хроматографическую колонку размерами 120×11 мм, заполненную 7,5 г Силасорб С-18 30 мкм. Хроматографировали, используя элюент ацетонитрил—вода (9,1:0,9). Элюат собирали фракциями по 2 мл. Фракции №8 и №9 объединяли, испаряли в токе воздуха при температуре 20—22 °С. Остаток растворяли в 10 мл ацетона (исходный ацетоновый раствор). В две выпарительные чашки (№1 и №2) вносили соответственно 0,1—2,0 и 1,0—2,5 мл исходного ацетонового раствора и испаряли растворитель.

Идентификация методом ТСХ. Остаток в чашке №1 растворяли в незначительном объеме ацетона и количественно наносили на линию старта хроматографической пластины Сорбфил ПТСХ-АФ-В-УФ. Хроматографировали, применяя систему хлороформ—ацетон (5:5), в присутствии вещества-свидетеля. Хроматограммы детектировали в УФ-свете и идентифицировали анализируемое вещество по величине Rf, совпадающей с таковой вещества-свидетеля (0,57±0,03).

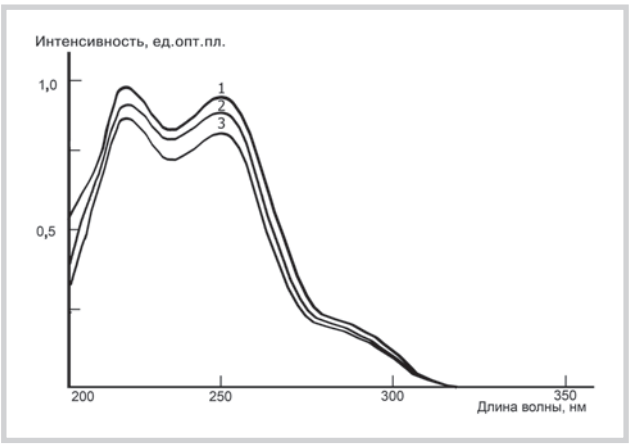

Рис. 2. **Спектральные кривые дилтиазема в этаноле.**

1 — раствор вещества, изолированного из печени; 2 — 0,01% раствор стандартного образца; 3 — раствор вещества, изолированного из крови.

Идентификация методом УФ-спектрофотометрии. После хроматографирования методом ТСХ пятно вещества вырезали из хроматограммы, помещали в пробирку, элюировали вещество из сорбента 95% этанолом в течение 15 мин и исследовали поглощение элюата в интервале длин волн от 200 до 360 нм. Соединение идентифицировали по форме спектральной кривой и положению максимумов поглощения (210, 242 и 278 нм). УФ-спектры в этаноле стандарта дилтиазема и дилтиазема, извлеченного из биоматериала, сравнивали: формы спектральных кривых и положения полос поглощения практически совпадают **(рис. 2)**.

Идентификация методом ГХ МС. Остаток в чашке №2 растворяли в 25 мл гексана. Затем 2—10 мкл полученного раствора вводили в испаритель газового хроматографа. 2 мкл полученного раствора вводили в хроматограф типа Agilent Technologies (США) модели 6890N с масс-селективным квадрупольным детектором модели 5973N («Agilent Technologies») и хроматографировали при описанных ранее условиях.

Дилтиазем идентифицировали по сочетанию времени удерживания вещества в неподвижной фазе колонки и специфического набора сигналов характеристических заряженных частиц в его масс-спектре.

На **рис. 3 и 4** приведены хроматограммы и масс-спектры стандарта дилтиазема, а также дилтиазема, выделенного из трупной печени и крови.

Как свидетельствуют полученные данные, обнаруживается совпадение масс-спектров анализируемого и стандартного веществ на 86%.

Количественное определение. Этанольный элюат после идентификации методом УФ-спектрофотометрии упаривали в выпарительной чашке до сухого остатка, остаток 7,5 мин обрабатывали 0,5 мл 10% раствора нитрата калия в концентрированной серной кислоте. Реакционную массу разбавляли 1 мл воды, к полученной смеси добавляли 4,5 мл 20% раствора гидроксида натрия и измеряли оптическую плотность образующегося окрашенного раствора

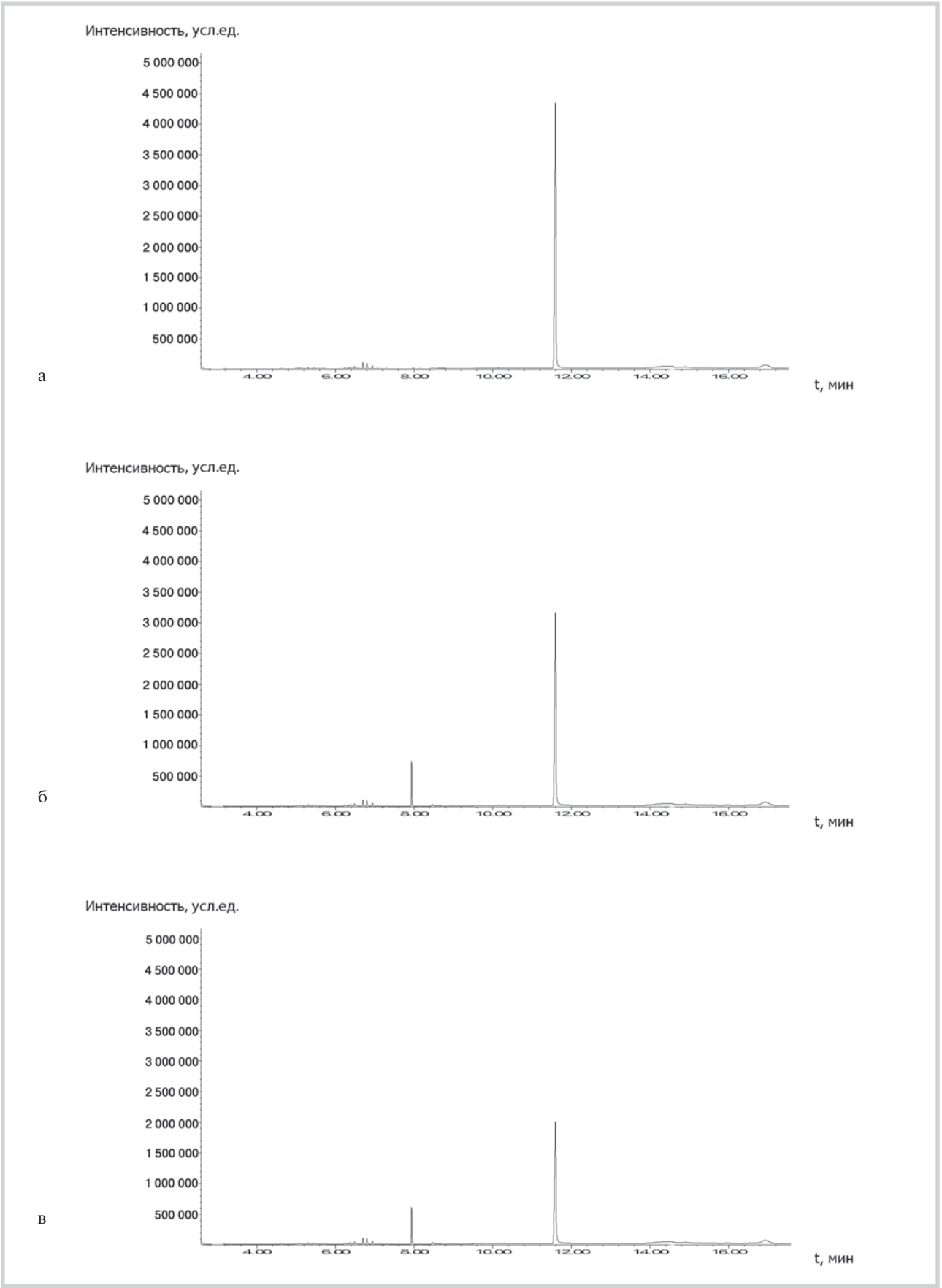

Рис. 3. **Хроматограммы (метод ГХ МС) дилтиазема.**

а — стандартного образца; б — вещества, изолированного из печени; в — вещества, изолированного из крови.

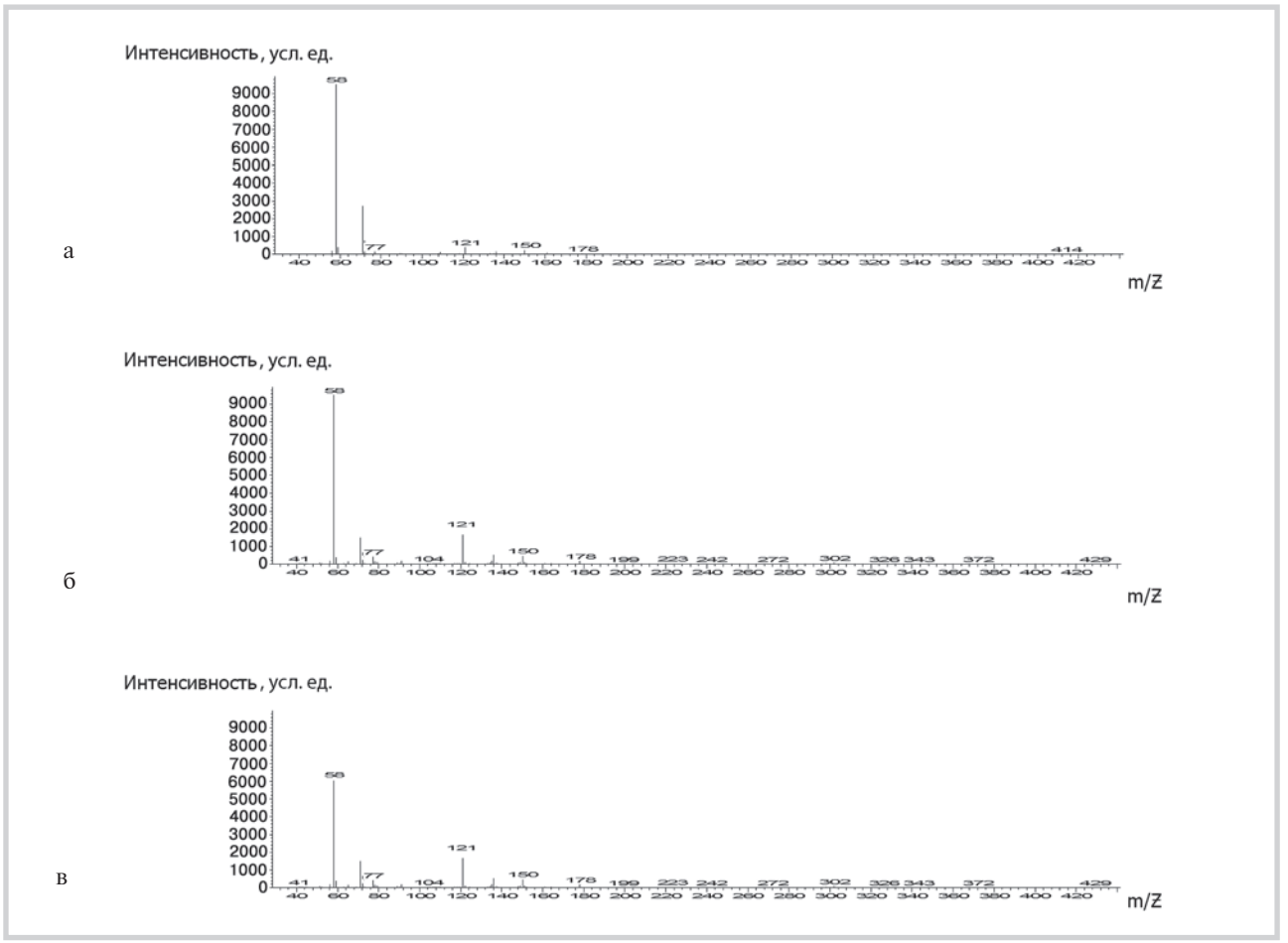

***Рис. 4*. Масс-спектры дилтиазема.**

а — стандартного образца; б — вещества, изолированного из печени; в — вещества, изолированного из крови.

при длине волны 303 нм на фоне раствора, полученного в контрольном опыте. Количественное содержание дилтиазема определяли, используя уравнение градуировочного графика, и пересчитывали на навеску анализируемого вещества, внесенную в биоматериал. Результаты представлены в **табл. 2**.

Согласно полученным данным, изменение содержания дилтиазема в модельных смесях от 2,5 до 50,0 мг при постоянных массах навесок биоматериала (25 г) сопровождается изменением среднего значения степени извлечения, не превышающим 1,7%. При содержании дилтиазема в количестве 25 мг в 25 г биоматериала разработанная методика позволяет определить в ткани печени 90,71%, в крови 90,91% данного вещества. Открываемый минимум методики (в 100 г биологического объекта) составляет 0,5 мг вещества в печени и 0,4 мг в крови.

***Таблица 2.* Результаты количественного определения дилтиазема в модельных смесях с биологическими объектами**

Внесено дилтиазема (мг в 25 г биологического объекта)	Найдено, % (n=5; p=0,95)			
	$\bar{x}$	S	$S\bar{x}$	$\Delta\bar{x}$
		В печени		
2,50	89,24	3,54	1,47	4,35
5,00	90,02	3,18	1,36	3,92
12,50	90,42	2,78	1,14	3,41
25,00	90,71	2,42	1,08	3,05
50,00	90,94	2,39	1,06	2,96
		В крови		
2,5	89,61	3,57	1,54	4,05
5,0	90,23	3,27	1,41	3,68
12,5	90,73	2,86	1,22	3,21
25,0	90,91	2,69	1,19	2,89
50,0	91,25	2,58	1,17	2,67

Таким образом, разработанная методика может быть применена при исследовании тканей трупных органов и биожидкостей на присутствие в них дилтиазема.

Выводы

1. Обоснована целесообразность и определены оптимальные условия применения ацетона в качестве изолирующего агента для извлечения дилтиазема из биологического материла.

2. Показана возможность очистки дилтиазема, извлекаемого из биологических объектов, сочетанием жидкость-жидкостной экстракции и хроматографии в колонке сорбента Силасорб С-18 30 мкм.

3. Разработана универсальная методика определения дилтиазема в тканях трупных органов и крови на основе изолирования рассматриваемым растворителем.

4. Для идентификации и оценки количественного содержания исследуемого вещества в биологических объектах предложены методы ТСХ, спектрофотометрии и ГХ МС.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства. Изд. 16-е. М: Новая волна 2012.
2. *Усанова А.А., Александровский А.А., Зорькина А.В., Киселева О.М.* Влияние эналаприла, дигоксина, атенолола и дилтиазема на перекисное окисление липидов при сочетанных метаболических нарушениях. Рац фармакотер в кардиол 2009; 6: 63—67.
3. *Мингазов А.А., Мусина М.Г., Килин В.В.* Изолирование дилтиазема из биоматериала и его идентификация. В кн.: Актуальные вопросы судебной медицины и права. Казань 2011; 2: 122—125.
4. Clarke's Isolation and Identification of Drugs. Eds. A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop. London: Pharmaceutical Press 2005.
5. *Азарова И.Н., Барсегян С.С., Барам Г.И.* Новые возможности высокоэффективной жидкостной хроматографии: Базы данных «ВЭЖХ-УФ». Хроматография на благо России. Сборник статей по хроматографии. Под ред. А.А. Курганова. М: Граница 2007; 653—665.
6. *Kalin J.R., Wood K.M., Lee A.J.* A possible suicide by diltiazem overdose. J Anal Toxicol 1994; 18: 180—182.
7. *DeWitt C.R., Waksman J.C.* Pharmacology, pathophysiology, and management of calcium channel blocker and beta-blocker toxicity. Toxicol Rev 2004; 23: 2: 23—38.
8. *Медведева Ю.П., Бондарь В.С.* Исследование эффективности методов изолирования дилтиазема из биологического материала. Мед химия 2004; 2: 6: 97—100.
9. *Романов Б.К.* Кальциевая регуляция активности лизосомальных ферментов миокарда. Биомед химия 2005; 51: 6: 634—642.
10. *Sun H., Ai L., Wang F.* Quantitative Analysis of Sulfonamide residues in Natural Animal Casings by HPLC. Chromatographia 2007; 66: 5—6: 333—337.