

СОХРАНЯЕМОСТЬ ДИЛТИАЗЕМА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

В.К. Шорманов, Л.Л. Квачахия, Д.П. Щербakov

*ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации*

Проведено изучение особенностей сохраняемости дилтиазема в гнилостно разлагающемся биологическом материале (ткань печени) при трех температурных режимах сохранения: 18–22; 8–10; 1,5–2 °С. Исследуемое вещество изолировали из модельных смесей с биологическим материалом путем настаивания с ацетоном дважды по 30 минут. Очистку извлеченного соединения осуществляли хроматографией в колонке «Силасорб С-18» 30 мкм (элюент – «ацетонитрил-вода» (9,1:0,9 по объему)). Предложены оптимальные условия идентификации и количественного определения дилтиазема, извлеченного из гнилостно-измененной ткани печени методами тонкослойной хроматографии (ТСХ), газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ-МС) и спектрофотометрии в УФ- и видимой областях спектра. Установлено, что при уменьшении температуры от 22 до 1,5–2 °С продолжительность сохранения вещества увеличивается с 100 до 140 суток.

Ключевые слова: дилтиазем, изолирование, очистка, определение, сохраняемость, биологический материал, химико-токсикологический анализ.

DOI 10.19163/1994-9480-2019-4(72)-119-122

PRESERVATION OF DILTIHAZEM IN BIOLOGICAL MATERIAL

V.K. Shormanov, L.L. Kvachakhia, D.P. Shcherbakov

FSBEI HE «Kursk State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation

A study was made of the preservation features of diltiazem in putrid decaying biological material (liver tissue) under three temperature regimes: 18–22; 8–10; 1,5–2 °C. The test substance was isolated from the model mixtures with biological material by infusion with acetone twice for 30 minutes. Purification of the recovered compound was carried out by chromatography on a column of «Silasorb S-18» 30 µm (eluent – «acetonitrile-water» (9,1:0,9 by volume). Optimal conditions for identification and quantitative determination of diltiazem extracted from putrefied tissue liver by thin layer chromatography (TLC), gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) and spectrophotometry in the UV- and visible regions of the spectrum. It is established that with a decrease in temperature from 22 to 1,5–2 °C, the duration of the preservation of the substance increases from 100 to 140 days.

Key words: diltiazem, isolation, purification, determination, preservation, biological material, chemical-toxicological analysis.

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

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

Дилтиазем имеет токсические свойства по отношению к теплокровным организмам и может приводить к отравлениям различной степени тяжести. Его LD₅₀ при внутрижелудочном введении лабораторным животным колеблется от (190 ± 14,61) мг/кг до (140 ± 14,23) мг/кг ($p < 0,05$) [5]. Зафиксированы летальные отравления дилтиаземом людей на территории Российской Федерации и за рубежом [3, 9, 10].

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 описано использование классических методов, которые не позволяют достичь высокой степени изолирования рассматриваемого вещества (степень извлечения 7–30 %) и относительно малочувствительны [2, 3].

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 [2].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение особенностей сохраняемости дилтиазема в гнилостно-разлагающемся биологическом материале (ткань печени) при трех температурных режимах сохранения.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

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

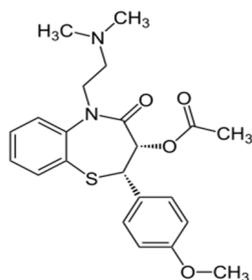


Рис. 1. Дилтиазема гидрохлорид

В качестве биоматериала была взята мелкоизмельченная (до размеров частиц 0,2–0,5 см) печень человека. Для эксперимента отбиралось 5 порций мелкоизмельченной печени по 500 г. В каждую из них вносили по 500 мг дилтиазема и тщательно перемешивали биологическую ткань с веществом. Для контрольного опыта брали 500 г мелкоизмельченной биологической ткани, не содержащей дилтиазем. Полученные модельные смеси и контрольные образцы сохраняли при следующих температурных режимах: 1,5–2 °С, 8–10 °С, 18–22 °С.

Анализ сохраняемых образцов на присутствие дилтиазема проводили через 24 часа и далее – по истечении 1, 20, 40, 60, 80, 100, 120 и 140 дней. В каждом случае параллельно анализировали по 25,0 г исследуемой и контрольной пробы. Исследование проводили по нижеприведенной методике.

Методика определения дилтиазема в биологическом материале

Изолирование. Изолирование дилтиазема из биологического материала осуществляли ацетоном в режиме двукратного настаивания при массовом соотношении изолирующего агента и биоматериала в каждом случае 2:1 и продолжительности отдельного настаивания 30 минут [6–8].

Изолирующий агент сливали с твердого остатка, а процесс настаивания повторяли. Извлечения объединяли в выпарительной чашке, растворитель испаряли.

Очистка извлечений. Сухой остаток подвергали обработке 2–3 мл системы растворителей ацетонитрил-вода (9,1:0,9), получаемый раствор вносили в макроколонку сорбента «Силасорб С-18» 30 мкм (размер колонки 120 × 11 мм). Аналит элюировали из колонки двухкомпонентным полярным элюентом ацетонитрил-вода (9,1:0,9). Фракции элюата, истекающего из макроколонки (по 2 мл каждая) собирали в градуированные пробирки. Серию фракций с 8 по 9 сливали в выпарительную чашку, а растворители удаляли из чашки в потоке воздуха комнатной температуры. После удаления растворителей остаток обрабатывали 5–7 мл этанола, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили этанолом до метки (исходный раствор).

В две фарфоровые выпарительные чашки (№ 1 и № 2) вносили по 1,0–4,5 мл исходного раствора и удаляли из него растворитель в потоке воздуха комнатной температуры.

Идентификация в тонком слое сорбента. Остаток, находящийся в чашке № 1, обрабатывали

небольшими порциями этанола по 0,2–0,3 мл, количественно перенося раствор в виде полосы на линию старта хроматографической пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-А-УФ. Рядом на линию старта наносили 5–10 мкл 0,04%-го раствора (в этаноле) вещества-свидетеля. Хроматографировали, используя элюент хлороформ-ацетон (5:5). Получаемые тонкослойные хроматограммы проявляли, облучая их УФ-светом с длиной волны 254 нм. Дилтиазем, идентифицировали по величине $R_f = 0,57 \pm 0,03$.

В дальнейшем анализируемое вещество элюировали из сорбента этанолом и идентифицировали по УФ спектру, а также проводили количественное определение по интенсивности поглощения в области длинноволнового максимума (278 нм).

Идентификация и количественное определение с использованием УФ-спектрофотометрии. Часть хроматограммы с находящимся на ней пятном исследуемого вещества вырезали, вносили в градуированную пробирку вместимостью 10 мл и элюировали вещество из сорбента в течение 15 минут 10 мл этанола в режиме периодического перемешивания. Полученный этанольный элюат отделяли в кварцевую кювету с длиной оптического пути 10 мм и проводили исследование его светопоглощения в диапазоне длин волн от 200 до 360 нм на спектрофотометре модели СФ-2000. В случае присутствия больших концентраций анализируемого вещества элюат предварительно разбавляли этанолом. Извлечения из контрольных образцов (без дилтиазема) также исследовали по вышеприведенной схеме.

Идентификация методом газовой хроматографии и масс спектрометрии (ГХ-МС). Сухой остаток, находящийся в выпарительной чашке № 2, обрабатывали 2 мл трихлорметана. 4 мкл, взятые из полученного раствора, вводили в хроматограф фирмы Agilent Technologies (США) модели 6890N с масс-селективным квадрупольным детектором модели 5973N (Agilent Technologies). Процесс хроматографирования осуществляли в колонке DB-1MS (J&WScientific, США) с неподвижной жидкой фазой диметилполисилоксан (длина колонки 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина пленки фазы 0,25 мкм). Начальная температура термостата колонки составляла 80 °С (задержка на 2 минуты). Температура программировалась от 80 до 250 °С со скоростью 40 °С в минуту с выдержкой при конечной температуре 6 минут. Температура инжектора составляла 280 °С, температура интерфейса – 300 °С. Газом-носителем являлся гелий. Подача газа-носителя производилась со скоростью 39 см/с. Проба вводилась в режиме без деления потока, задержка 3 мин. Фрагментация молекул аналита в ионизационной камере осуществлялась с использованием электронного удара (70 эВ). Обнаружение вещества проводилось в режиме регистрации по полному ионному току (диапазон сканирования 40–550 m/z). Анализируемое соединение идентифицировали как по значению времени удерживания,

так и по совпадению его масс-спектра с масс-спектром стандарта на 86 % и более.

Обнаружение дилтиазема проводили по специфическому набору характеристических положительно заряженных ионов (осколков бомбардированной электронами молекулы анализируемого вещества).

Количественное определение. По величине оптической плотности элюата в этаноле ($\lambda = 278$ нм) определяли количественное содержание дилтиазема, используя уравнение градуировочного графика.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При идентификации в тонком слое сорбента дилтиазем проявлялся на хроматограммах в УФ-свете в виде темных розово-фиолетовых пятен на более светлом общем фоне пластины. Анализируемое вещество идентифицировали на основе совпадения значения его абсолютной хроматографической подвижности (R_f) в тонком слое силикагеля со значением R_f вещества-стандарта ($0,57 \pm 0,03$).

В процессе идентификации методом электронной спектрофотометрии сравнение спектральных кривых дилтиазема, извлеченного из анализируемых образцов по вышеописанной схеме, со спектром чистого вещества в этаноле обнаруживалось совпадение формы спектральной кривой и положения точек экстремумов (в области 210, 254 и 278 нм). При исследовании извлечений из ткани трупной печени контрольных образцов установлено отсутствие в них данного вещества. Измеренное при 278 нм фоновое поглощение элюатов из участков контрольных хроматограмм не превышало 0,025 единицы оптической плотности (при условии, что в 1 мл фотометрируемого раствора присутствуют оставшиеся после очистки соэкстрактивные вещества из 1 г биологической ткани).

При идентификации методом ГХ-МС время удерживания дилтиазема совпадало с временем удерживания стандарта (11,7 мин) (рис. 2, 3).

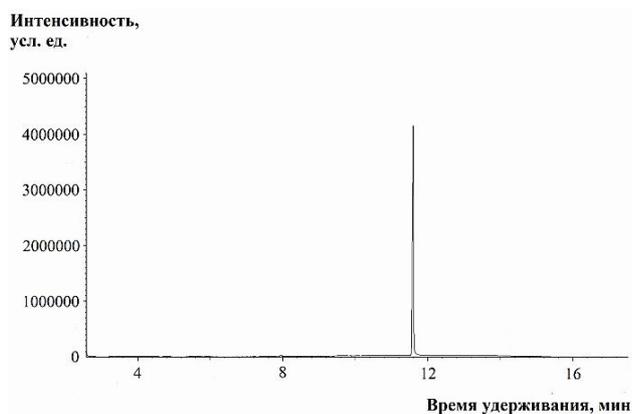


Рис. 2. Газо-жидкостная хроматограмма стандарта дилтиазема

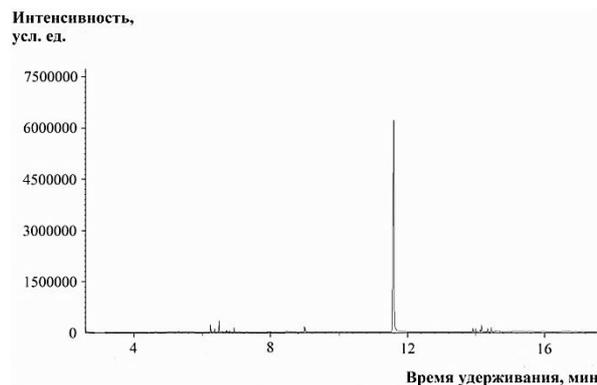


Рис. 3. Газо-жидкостная хроматограмма дилтиазема, выделенного из биологического материала (продолжительность сохранения – 60 дней)

В масс-спектрах присутствовали характерные осколки для молекулы дилтиазема с m/z 58, 71 и 121 (табл.).

Характеристики масс-спектров стандарта дилтиазема и дилтиазема, выделенного из биологического материала

№	Анализируемый объект	Характеристические осколки молекулы (положительно заряженные ионы)
1.	Стандарт дилтиазема	41, 56, 58, 71, 77, 96, 103, 121, 136, 150, 178
2.	Дилтиазем, выделенный из печени	41, 55, 58, 71, 77, 96, 104, 121, 136, 150, 178

Осколок, имеющий значение 58 m/z , соответствует молекулярной массе дилтиазема, и его интенсивность принята за 100 %.

Уравнение градуировочного графика для фотометрического определения дилтиазема по поглощению в УФ-области спектра имело вид:

$$A = 0,007448 \cdot C + 0,004183,$$

где A – оптическая плотность, C – концентрация анализируемого вещества в фотометрируемом растворе (мкг/мл). Коэффициент корреляции (r) составляет не менее 0,99.

Относительная ошибка среднего результата при определении дилтиазема методом спектрофотометрии составила 0,77 % ($n = 6$; $P = 0,95$).

Результаты изучения сохраняемости дилтиазема в трупном материале представлены на рис. 4.

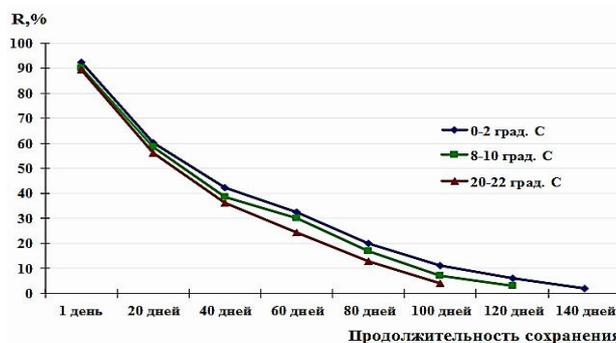


Рис. 4. Зависимость степени извлечения (R , %) дилтиазема из биоматериала от продолжительности и температурного режима сохранения

Как свидетельствуют полученные данные, устойчивость дилтиазема в биологическом материале уменьшается с ростом температуры. Сроки сохранения рассматриваемого соединения при температурах 1,5–2 °С, 8–10 °С и 18–22 °С составляют соответственно 140, 120 и 100 дней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Предложена методика определения дилтиазема в гнилостно-разлагающемся биологическом материале с использованием методов ТСХ, ГХ-МС и электронной спектродетекции.
2. Изучена сохранность дилтиазема в модельных смесях с тканью печени при трех температурных режимах.
3. Установлено, что при уменьшении температуры от 22 °С до 1,5–2 °С продолжительность сохранения вещества увеличивается с 100 до 140 суток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства. 16-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая волна, 2012. – 1216 с.
2. Медведева Ю.П., Бондарь В.С. Исследование эффективности методов изолирование дилтиазема из биологического материала // Медицинская химия. – 2004. – Т. 2, № 6. – С. 97–100.
3. Мингазов А.А., Мусина М.Г., Килин В.В. Изолирование дилтиазема из биоматериала и его идентификация // Актуальные вопросы судебной медицины и права. – 2011. – № 2. – С. 122–125.
4. Романов Б.К. Кальциевая регуляция активности лизосомальных ферментов миокарда // Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 51, № 6. – С. 634–642.
5. 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 // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2009. – № 6. – С. 63–67.
6. Шорманов В.К., Квачахия Л.Л. Распределение дилтиазема в организме теплокровных животных // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2017. – № 4. – С. 136–141.
7. Шорманов В.К., Квачахия Л.Л., Ртищев К.П. Определение верапамила в плазме крови // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2014. – № 2. – С. 107–113.
8. Шорманов В.К., Квачахия Л.Л., Щербakov Д.П., Чаплыгин А.В., Лямин В.Н. Химико-токсикологическое определение дилтиазема // Судебно-медицинская экспертиза. – 2015. – Т. 58, № 2. – С. 39–45.
9. Ayad M.M., Abdellatef H.E., Hosny M.M., Sharaf Y.A. Application of 4-chloro-7-nitrobenzofurazan for the analysis of propafenone and diltiazem hydrochlorides using kinetic spectrophotometric and spectrofluorimetric methods // European Journal of Chemistry. – 2013. – Vol. 4, № 1. – P. 35–43.

10. Kalin J.R., Wood K.M., Lee A.J. A possible suicide by diltiazem overdose // J. Anal. Toxicol. – 1994. – Vol. 18, № 3. – P. 180–182.

REFERENCES

1. Mashkovskij M.D. Lekarstvennye sredstva [Medicines]. 16-e izd., pererab., ispr. i dop. Moscow: Novaya volna, 2012. 1216 p.
2. Medvedeva YU.P., Bondar' V.S. Issledovanie effektivnosti metodov izolirovanie diltiazema iz biologicheskogo materiala [Investigation of the effectiveness of isolating diltiazem from biological material]. *Medicinskaya himiya* [Medical chemistry], 2004, vol. 2, no. 6, pp. 97–100. (In Russ.; abstr. in Engl.).
3. Mingazov A.A., Musina M.G., Kilin V.V. Izolirovanie diltiazema iz biomateriala i ego identifikaciya [Isolation of diltiazem from biomaterial and its identification]. *Aktual'nye voprosy sudebnoj mediciny i prava* [Actual problems of forensic medicine and law], 2011, no. 2, pp. 122–125. (In Russ.; abstr. in Engl.).
4. Romanov B.K. Kal'cievaya regulyaciya aktivnosti lizosomal'nyh fermentov miokarda [Calcium regulation of the activity of lysosomal myocardial enzymes]. *Biomedicinskaya himiya* [Biomedical chemistry], 2005, vol. 51, no. 6, pp. 634–642. (In Russ.; abstr. in Engl.).
5. Usanova A.A., Aleksandrovskij A.A., Zor'kina A.V., Kiseleva O.M. Vliyanie enalapriila, digoksina, atenolola i diltiazema na perekisnoe okislenie lipidov pri sochetannyh metabolicheskikh narusheniyah [Effect of enalapril, digoxin, atenolol and diltiazem on lipid peroxidation with combined metabolic disorders]. *Racional'naya farmakoterapiya v kardiologii* [Rational pharmacotherapy in cardiology], 2009, no. 6, pp. 63–67. (In Russ.; abstr. in Engl.).
6. Shormanov V.K., Kvachahiya L.L. Raspredelenie diltiazema v organizme teplokovnykh zhivotnykh [Distribution of diltiazem in the body of warm-blooded animals]. *Kurskij nauchno-prakticheskij vestnik «Chelovek i ego zdorov'e»* [Kursk scientific and practical bulletin «Man and his health»], 2017, no. 4, pp. 136–141. (In Russ.; abstr. in Engl.).
7. Shormanov V.K., Kvachahiya L.L., Rtishchev K.P. Opredelenie verapamila v plazme krovi [Definition of verapamil in blood plasma]. *Kurskij nauchno-prakticheskij vestnik «Chelovek i ego zdorov'e»* [Kursk scientific and practical bulletin «Man and his health»], 2014, no. 2, pp. 107–113. (In Russ.; abstr. in Engl.).
8. Shormanov V.K., Kvachahiya L.L., Shcherbakov D.P., Chaplygin A.V., Lyamin V.N. Himiko-toksikologicheskoe opredelenie diltiazema [Chemical-toxicological definition of diltiazem]. *Sudebno-medicinskaya ekspertiza* [Forensic medical examination], 2015, vol. 58, no. 2, pp. 39–45. (In Russ.; abstr. in Engl.).
9. Ayad M.M., Abdellatef H.E., Hosny M.M., Sharaf Y.A. Application of 4-chloro-7-nitrobenzofurazan for the analysis of propafenone and diltiazem hydrochlorides using kinetic spectrophotometric and spectrofluorimetric methods. *European Journal of Chemistry*, 2013, vol. 4, no. 1, pp. 35–43.
10. Kalin J.R., Wood K.M., Lee A.J. A possible suicide by diltiazem overdose. *J. Anal. Toxicol.*, 1994, vol. 18, no. 3, pp. 180–182.

Контактная информация

Шорманов Владимир Камбулатович – д. фарм. н., профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии, Курский государственный медицинский университет, e-mail: R-WLADIMIR@yandex.ru