

## ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, ФАРМАКОГНОЗИЯ (14.04.02)

УДК 340.67(612.1+612.46)

<https://doi.org/10.17816/2072-2354.2019.19.3.116-121>

### РАЗЛИЧНЫЕ МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕРАПАМИЛА В КРОВИ

**А.В. Воронин**

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара

Для цитирования: Воронин А.В. Различные методы количественного определения верапамила в крови // Аспирантский вестник Поволжья. – 2019. – № 5–6. – С. 116–121. <https://doi.org/10.17816/2072-2354.2019.19.3.116-121>

Поступила: 18.07.2019

Одобрена: 27.08.2019

Принята: 09.09.2019

Верапамил является лекарственным препаратом, имеющим токсикологическое значение. При диагностике острых отравлений и в судебно-химической экспертизе для количественного определения верапамила необходимы простые и информативные методы анализа. **Цель исследования** — сравнительная характеристика аналитических возможностей различных методов количественного определения верапамила в крови, используемых в химико-токсикологическом анализе и судебно-химической экспертизе. **Материалы и методы.** Объектом исследования были модельные образцы крови, содержащие верапамил. Идентификацию верапамила в образцах крови осуществляли методом хромато-масс-спектрометрии. Для количественного определения применяли метод тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией и УФ-спектрофотометрию. **Результаты.** В методе тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией использовали сканирование хроматограмм, обработку изображения и построение градуировочной зависимости в компьютерной программе. Градуировочная зависимость описывается уравнением полиномиальной (квадратичной) регрессии. В методе УФ-спектрофотометрии измеряли оптическую плотность исследуемых проб при длине волны 277 нм; в качестве раствора сравнения использовали извлечения из «холодных» проб крови. Пределы количественного определения в образцах крови для тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией и УФ-спектрофотометрии составили соответственно 300,0 и 6000,0 нг/мл. Показатели правильности и схожести в сериях параллельных определений для метода тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией не превышали 20,2 и 24,3 % соответственно; для метода УФ-спектрофотометрии — 27,5 и 7,4 %. **Заключение.** Тонкослойная хроматография с компьютерной денситометрией рекомендована для применения в судебно-химической экспертизе и экспресс-диагностике острых отравлений. УФ-спектрофотометрия позволяет определять верапамил в крови только на уровне летальных концентраций.

**Ключевые слова:** верапамил; градуировка; тонкослойная хроматография; компьютерная денситометрия; УФ-спектрофотометрия; хромато-масс-спектрометрия; количественное определение.

### TECHNIQUES OF QUANTITATIVE EVALUATION OF VERAPAMIL CONTENT IN WHOLE BLOOD

**A.V. Voronin**

Samara State Medical University, Samara, Russia

For citation: Voronin AV. Techniques of quantitative evaluation of Verapamil content in whole blood. *Aspirantskiy Vestnik Povolzhya*. 2019;(5-6):116-121. <https://doi.org/10.17816/2072-2354.2019.19.3.116-121>

Received: 18.07.2019

Revised: 27.08.2019

Accepted: 09.09.2019

Verapamil is a drug that can be toxic in pharmacological therapy and in case of misuse. Simple and informative methods of Verapamil quantification for forensic chemistry and hospital toxicology are needed. **Aim.** The objective of the study was to compare analytical potential of different methods for Verapamil quantification used in forensic chemistry and hospital toxicology. **Materials and methods.** The subject study was whole blood samples containing Verapamil. Verapamil in the blood samples was identified by gas chromatography-mass-spectrometry. Verapamil was quantified by thin-layer chromatography with videodensitometry and UV-spectrophotometry. **Results.** To quan-

tify Verapamil content, the plates were scanned, the chromatogram images were processed and calibration models were given by means of computer program. The calibration model is described by polynomial (square) regression. In UV-spectrophotometry absorbance of samples at the wavelength of 277 nm was measured; "blank" blood extracts as a zero reference were used. The limits of quantification for thin-layer chromatography with videodensitometry and UV-spectrophotometry were 300,0 and 6000,0 ng/ml respectively. The accuracy and precision for thin-layer chromatography with videodensitometry failed to exceed 20.2 и 24.3% respectively; for UV-spectrophotometry they were 27.5 и 7.4%. **Conclusion.** The ranges of quantification make it possible to use thin-layer chromatography with videodensitometry for forensic chemistry and hospital toxicology. UV-spectrophotometry can be used to quantify Verapamil content in blood samples at the lethal concentration range.

■ **Keywords:** Verapamil; thin-layer chromatography; videodensitometry; UV-spectrophotometry; gas chromatography-mass-spectrometry; quantification.

## Введение

Верапамил ( $\alpha$ -[3-([2-(3,4-диметоксифенил)-этил]метиламино)пропил]-3,4-диметокси- $\alpha$ -(1-метилэтил)бензоацетонитрил) является лекарственным препаратом группы блокаторов кальциевых каналов, имеющих токсикологическое значение [1]. При диагностике острых отравлений и в судебно-химической экспертизе для количественного определения верапамила используют ряд хроматографических методов, в том числе с масс-спектрометрическим детектированием, а также спектрофотометрию в УФ-диапазоне [2–4]. К используемым аналитическим методам определения верапамила в плазме крови предъявляются требования высокой чувствительности, селективности и соответствия рабочих диапазонов методик уровням терапевтической и токсической концентраций анализируемого вещества в плазме крови.

**Цель исследования** — сравнительная характеристика аналитических возможностей различных методов количественного определения верапамила в крови, используемых в химико-токсикологическом анализе и судебно-химической экспертизе.

## Материалы и методы

В работе использовали стандартный образец верапамила (в форме гидрохлорида) (LGC Standards, Великобритания). Модельные образцы крови готовили путем добавления расчетного количества стандартного образца (в виде метанольного раствора концентрации 10,0 мкг/мл в пересчете на основание) к образцам крови, не содержащим наркотических средств, психотропных и лекарственных веществ. Диапазон концентраций верапамила в пробах крови составлял 100,0–5000,0 нг/мл (для тонкослойной хроматографии (ТСХ) с компьютерной денситометрией) и 5,0–150,0 мкг/мл (для УФ-спектрофотометрии).

Пробоподготовку образцов крови осуществляли жидкость-жидкостной экстракцией. Объем пробы крови составлял 10 мл. Условия экстракции: хлороформ при pH 9–11; полученные экстракты упаривали до сухого остатка в токе теплого воздуха при температуре не более 40 °С. Сухой остаток растворяли в 50 мкл смеси хлороформ – этанол (1 : 1). При исследовании методом УФ-спектрофотометрии при жидкость-жидкостной экстракции увеличивали объем пробы крови до 50 мл, далее из аликвоты полученного хлороформного экстракта объемом 20 мл проводили реэкстракцию раствором кислоты хлористоводородной концентрации 0,1 моль/л.

Для идентификации верапамила в пробах крови использовали метод хромато-масс-спектрометрии. Исследование осуществляли на газовом хроматографе Agilent Technologies 6890 с масс-селективным детектором Agilent Technologies 5973N с использованием кварцевой капиллярной колонки HP5-MS (5 % фенилдиметилсилоксан) длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм с толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм. Режим программирования температуры колонки: начальная температура 170 °С (выдержка в течение 1 мин), повышение температуры со скоростью 15 °С/мин до 280 °С с выдержкой при конечной температуре 5 мин. В качестве газоносителя использовали гелий; скорость газоносителя — 1 мл/мин в режиме постоянного потока. Температура инжектора — 280 °С, температура аналитического интерфейса — 285 °С. Ввод пробы осуществляли с помощью автосамплера в режиме без деления потока со сбросом избытка через 1 мин в отношении потоков 1 : 15 (split/splitless); объем пробы — 1 мкл. Анализ исследуемых образцов проводили в режиме сканирования в диапазоне масс 39–550 а. е. м.

Условия анализа методом ТСХ: пробу объемом 50 мкл наносили микрошприцем на пластину для ТСХ «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ»

размером 10 × 15 см в виде полосы толщиной не более 1 мм и шириной не более 0,5 см, при нанесении зону первичной адсорбции высушивали теплым воздухом. В качестве систем растворителей (подвижных фаз) использовали смеси этилацетат – метанол – аммиак 25 % (17 : 2 : 1), а также метанол – аммиак 25 % (100 : 1,5). Насыщение камеры парами растворителей проводили в течение 30 мин. Детектирование хроматограмм — обработкой реактивом Драгендорфа, а также в УФ-свете при длине волны 254 нм.

При денситометрическом определении полученные хроматограммы фиксировали путем сканирования с оптическим разрешением 900 dpi в True Color режиме на планшетном сканере, сохраняли в виде файлов с расширением jpeg и обрабатывали с использованием программы «ТСХ-менеджер 4.0» [5].

При спектрофотометрическом определении верапамила исследовали реэкстракт из хлороформного извлечения, полученный раствором кислоты хлористоводородной концентрации 0,1 моль/л. Регистрировали спектр поглощения полученного реэкстракта в интервале длин волн 200–400 нм. Условия измерения: регистрирующий спектрофотометр СФ-56; шаг измерения — 1 нм; толщина рабочего слоя — 1 см; раствор сравнения — реэкстракт из «холостой» пробы крови, полученный в аналогичных условиях пробоподготовки.

Определение пределов обнаружения и количественного определения, диапазона определяемых концентраций, правильности и прецизионности проводили в соответствии с рекомендациями «Руководства по валида-

ции аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала» [6].

## Результаты и обсуждение

Определение верапамила в образцах крови включало два этапа: хромато-масс-спектрометрический скрининг (в режиме полного ионного тока) и последующее количественное определение методами с более низким уровнем селективности — ТСХ с компьютерной денситометрией или УФ-спектрофотометрией. Применение вышеуказанных методов позволяет уменьшить нагрузку на хромато-масс-спектрометрическое оборудование, а также снизить временные и экономические затраты на данное исследование.

При хромато-масс-спектрометрическом скрининге на хроматограммах образцов крови обнаруживался пик неметаболизированного верапамила (рис. 1).

Масс-спектр, соответствующий данному хроматографическому пику, позволял идентифицировать анализируемое вещество с вероятностью не менее 80 %, самым интенсивным ионом в масс-спектре является ион с массой 303 а. е. м. (рис. 2).

Для анализа верапамила методом ТСХ были использованы подвижные фазы и вариант детектирования на пластинке, наиболее часто используемые в практике судебно-химической экспертизы (табл. 1).

Для определения предела обнаружения верапамила были проанализированы модель-

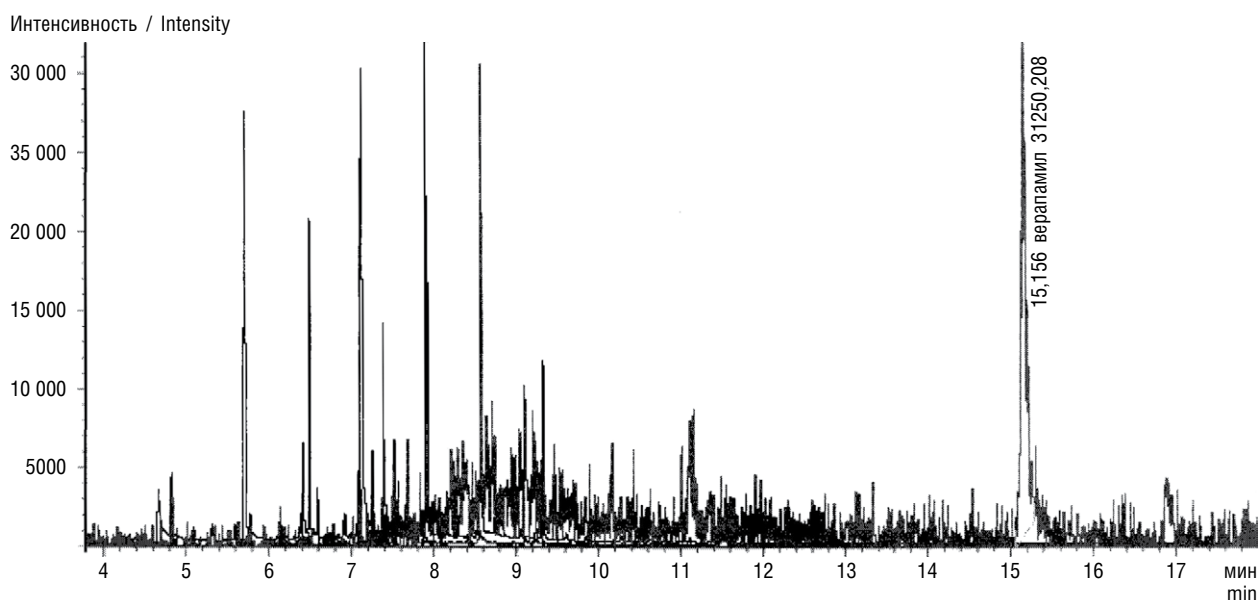


Рис. 1. Хроматограмма образца крови с содержанием верапамила 300,0 нг/мл

Fig. 1. Chromatogram of the whole blood sample with Verapamil concentration of 300,0 ng/ml

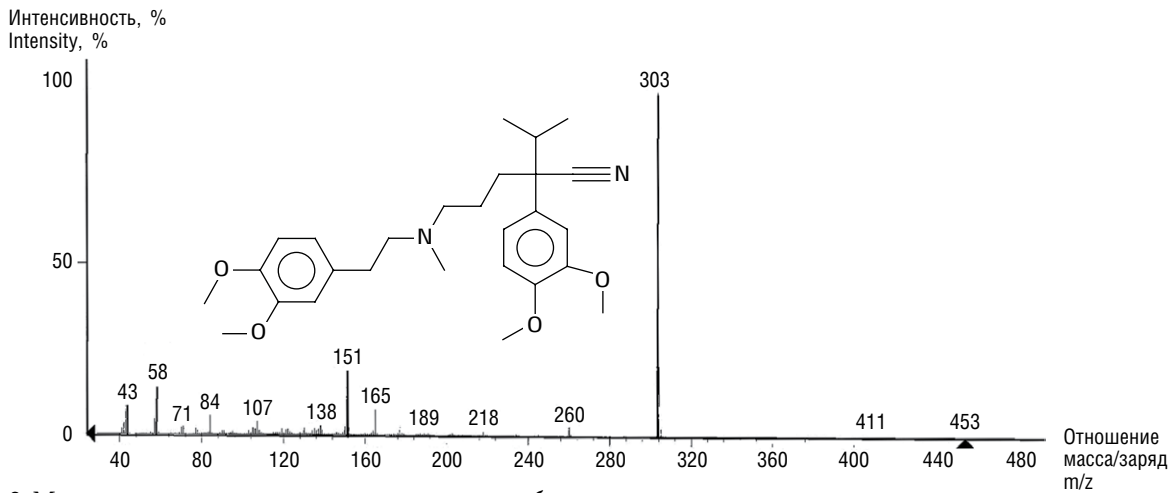


Рис. 2. Масс-спектр верапамила, выделенного из образца крови

Fig. 2. Mass-spectrum of Verapamil, isolated from the whole blood sample

Таблица 1 / Table 1

Параметры методики идентификации верапамила в крови методом тонкослойной хроматографии

Parameters for the identification of Verapamil content in whole blood by means of thin-layer chromatography method

Подвижная фаза	$R_f$	Детектирование	Предел обнаружения	
			$C$ , нг/мл	$m$ , мкг/проба
Этилацетат – метанол – аммиак 25 % (17 : 2 : 1)	$0,73 \pm 0,04$	Реактив Драгендорфа, УФ-свет, длина волны 254 нм	150,0	1,0
Метанол – аммиак 25 % (100 : 1,5)	$0,75 \pm 0,03$		150,0	1,0

ные образцы крови в диапазоне концентраций 100,0–5000,0 нг/мл.

Для пробоподготовки использовали образцы крови объемом 10 мл, а объем пробы, наносимой на хроматографическую пластину, составлял 50 мкл. При определении величины предела обнаружения использовали визуальную регистрацию обработанного изображения хроматограммы, для обработки изображения применяли программные средства «ТСХ-менеджер 4.0». Предел обнаружения верапамила в образцах крови — 150,0 нг/мл (1,0 мкг в пробе).

Влияние балластных веществ крови на результаты анализа учитывали путем исследования «холостых» проб крови в вышеуказанных условиях. При этом на пластинках в диапазоне значений  $R_f$  0,2–0,8 хроматографических зон не детектировали.

Определение характера зависимости аналитического сигнала — площади хроматографической зоны ( $S$ ) от концентрации определяемого вещества ( $C$ ) — показало, что при количестве верапамила свыше 5,0 мкг в пробе наблюдается отклонение от линейной зависимости.

Для изучаемого лекарственного вещества была рассчитана градуировочная зависимость, которая описывается уравнением по-

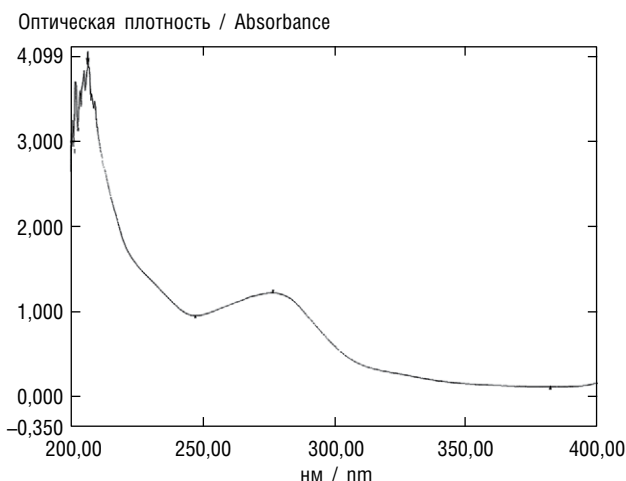
линомиальной (квадратичной) регрессии:  $S = 0,081 \cdot C^2 + 36,2 \cdot X - 501,3$ . Предел количественного определения составил 300,0 нг/мл, диапазон концентраций в крови, в которых возможно проводить количественное определение (рабочий диапазон методики) — 300,0–5000,0 нг/мл.

При спектрофотометрическом анализе выраженные максимумы в спектре поглощения регистрировали для экстракта с концентрацией верапамила 5,0 мкг/мл, в качестве аналитической использовали длину волны 277 нм (рис. 3).

Был экспериментально установлен линейный диапазон зависимости оптической плотности ( $D$ ) от концентрации ( $C$ ), который составил 10,0–160,0 мкг/мл — для фотометрируемых растворов верапамила, полученных из стандартного образца. Уравнение градуировочного графика имеет вид:  $D = 0,0090 \cdot C + 0,072$ ; величина коэффициента корреляции  $r$  составила 0,998.

При исследовании образцов крови предел количественного определения спектрофотометрическим методом составил 6,0 мкг/мл (6000,0 нг/мл), линейный диапазон — 6,0–100,0 мкг/мл (6000,0–100 000,0 нг/мл).

Для оценки правильности и прецизионности (сходимости) методик анализировали



**Рис. 3.** Спектр поглощения экстракта из образцов крови (содержание верапамила 5,0 мкг/мл)

**Fig. 3.** Absorbance spectrum of the whole blood extract (Verapamil concentration was 5,0 mkg/ml)

образцы крови с известными количествами верапамила трех уровней концентраций в пределах рабочих диапазонов каждой методики. Определяли сходимость результатов измерений (относительное стандартное отклонение), полученных в пяти разных аналитических циклах — между сериями параллельных определений в разные дни (табл. 2).

Относительные погрешности определения верапамила в крови методом ТСХ с компьютерной денситометрией, используемые для оценки правильности методики, для всех уровней концентраций не превышали значения  $\pm 20,0\%$ . Для спектрофотометрического метода оценка правильности производилась в области более высоких концентраций и погрешность для среднего и высокого уровня составляет соответственно 22,7 и 27,5 %.

Для спектрофотометрического метода анализа отмечается завышение содержания верапамила в образцах крови, связанное с неконтролируемым вкладом поглощения бал-

ластных веществ пептидной природы в оптическую плотность при длине волны 277 нм.

Сходимость результатов определений верапамила методом спектрофотометрии на всех уровнях концентраций не превышала 7,4 %. При анализе верапамила методом ТСХ с компьютерной денситометрией разброс результатов уменьшался от 24,3 % для нижнего уровня концентраций до 5,8 % — для верхнего уровня.

Диапазоны определяемых концентраций верапамила в крови при расчете методом ТСХ с компьютерной денситометрией соответствуют уровням токсической и летальной концентраций. Спектрофотометрическая методика позволяет определять верапамил только при летальных отравлениях, связанных с содержанием неметаболизированного верапамила в крови более 6,0 мкг/мл.

### Заключение

В условиях модельного эксперимента дана сравнительная характеристика аналитических возможностей методов ТСХ с компьютерной денситометрией и УФ-спектрофотометрии для определения верапамила в крови. Применение денситометрии для обработки хроматограмм в методе ТСХ позволило количественно определять содержание верапамила в пробах крови на более низком уровне концентраций по сравнению с диапазоном определяемых концентраций метода УФ-спектрофотометрии. Достоверность идентификации верапамила в образцах крови при использовании обеих методик обеспечивает хромато-масс-спектрометрический скрининг.

Спектрофотометрическая методика позволяет определять верапамил в крови только на уровне летальных концентраций, показатели правильности превышают  $\pm 20,0\%$ . Определение верапамила в крови методом ТСХ с компьютерной денситометрией харак-

Таблица 2 / Table 2

**Результаты оценки правильности и прецизионности количественного определения верапамила в крови методами тонкослойной хроматографии с компьютерной денситометрией и УФ-спектрофотометрии**

**The evaluation of accuracy and precision of Verapamil quantification method in whole blood by thin-layer chromatography with the use of videodensitometry and UV-spectrophotometry**

Метод анализа	Уровни концентраций в образцах крови, нг/мл	Правильность, %	Сходимость между сериями параллельных определений, %
ТСХ с компьютерной денситометрией	Нижний 500,0	16,4	24,3
	Средний 2000,0	14,8	10,5
	Высокий 4000,0	20,2	5,8
УФ-спектрофотометрия	Нижний 10000,0	12,4	5,4
	Средний 40000,0	22,7	5,8
	Высокий 80000,0	27,5	7,4

теризуется показателями правильности и прецизионности, не превышающими значения  $\pm 24,0\%$ , и может быть рекомендовано для применения в судебно-химической экспертизе и экспресс-диагностике острых отравлений.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Литература

1. 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. [Shormanov VK, Kvachahiya LL, Rtishchev KP. Verapamil determination in blood plasma. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik "Chelovek i ego zdorov'e"*. 2014;(2):107-113. (In Russ.)]
2. Мельников Е.С., Белова М.В., Родина Т.А., Раменская Г.В. Определение некоторых гипотензивных лекарственных веществ в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии/тандемной масс-спектрометрии при анализе острых отравлений // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2015. – Т. 15. – № 2. – С. 257–268. [Mel'nikov ES, Belova MV, Rodina TA, Ramenskaya GV. Determination of some antihypertensive drugs in blood plasma by high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry in the analysis of acute poisonings. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2015;15(2):257–268. (In Russ.)]
3. Квачахия Л.Л., Шорманов В.К. Выявление верапамила в биологических жидкостях // Фармация. – 2015. – № 2. – С. 19–22. [Kvachakhia LL, Shormanov VK. Determination of verapamil in biological fluids. *Pharmacy*. 2015;(2):19–22. (In Russ.)]
4. Gonzalez O, Alonso RM, Ferreirós N, et al. Development of an LC-MS/MS method for the quantitation of 55 compounds prescribed in combined cardiovascular therapy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2011;879(3-4):243-252. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.12.007>.
5. Кормишин В.А. Денситометрическое определение некоторых наркотических средств и психотропных веществ в химико-токсикологических исследованиях: Дис. ... канд. фарм. наук. — Самара, 2014. [Kormishin VA. Densitometricheskoe opredelenie nekotoryh narkoticheskikh sredstv i psihotropnyh veshhestv v himiko-toksikologicheskikh issledovaniyakh. [dissertation] Samara; 2014. (In Russ.)]. Доступно по: <http://www.dslib.net/farmakognozia/densitometricheskoe-opredelenie-nekotoryh-narkoticheskikh-sredstv-i-psihotropnyh.html>. Ссылка активна на 23.08.2019.
6. Барсегян С.С., Саломатин Е.М., Плетенева Т.В., и др. Методические рекомендации по валидации аналитических методик, используемых в судебно-химическом и химико-токсикологическом анализе биологического материала. – М., 2014. – 73 с. [Barsегyan SS, Salomatин EM, Pleteneva TV, et al. Metodicheskie rekomendacii po validacii analiticheskikh metodik, ispol'zuemykh v sudebno-himicheskom i himiko-toksikologicheskome analize biologicheskogo materiala. Moscow; 2014. 73 p. (In Russ.)]

### ■ Информация об авторе

Александр Васильевич Воронин — кандидат фармацевтических наук, доцент, заведующий кафедрой химии фармацевтического факультета, ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Самара. E-mail: dimmu2000@mail.ru.

### ■ Information about the author

Alexander V. Voronin — Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Chemistry of Pharmaceutical Faculty, Samara State Medical University, Samara, Russia. E-mail: dimmu2000@mail.ru.