

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИМОДИПИНА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Л.Л. Квачахия, кандидат фармацевтических наук,
В.К. Шорманов*, доктор фармацевтических наук, профессор,
Г.С Мещерякова

Курский государственный медицинский университет;
Российская Федерация, 305041, Курск, ул. К. Маркса, д. 3

Введение. Нимодипин, селективный блокатор кальциевых каналов L-типа, широко используется в медицинской практике. Он достаточно токсичен для теплокровных животных и человека. Наличие случаев летального отравления нимодипином делают его объектом судебно-химического исследования.

Цель исследования – разработка методики идентификации и количественного определения нимодипина в биологическом материале.

Материал и методы. Для исследования готовили модельные смеси нимодипина с тканью печени. Предварительный анализ осуществляли хроматографически на пластинках «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ в системе гексан–ацетон (7:3). Для подтверждающей идентификации и количественного определения применяли газовую хромато-масс-спектрометрию и УФ-спектрофотометрию.

Результаты. Установлены оптимальный изолирующий агент и условия настаивания биологического объекта с экстрагентом. Изучены особенности хроматографирования нимодипина. Найдены оптимальные условия количественного определения. Предлагаемая методика позволяет определить до 85,46% нимодипина в печени с достаточной для биологических исследований воспроизводимостью и правильностью.

Заключение. Разработана методика идентификации и количественного определения нимодипина в извлечениях из трупного материала с использованием методов ТСХ, хромато-масс-спектрометрии и УФ-спектрофотометрии.

Ключевые слова: нимодипин, биологический материал, идентификация, количественное определение, хроматография, УФ-спектрофотометрия.

*E-mail: R-WLADIMIR@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

Нимодипин (2,6-диметил-3-изопропокси-карбонил-5-(2-метоксиэтоксикарбонил)-4-(3-нитрофенил)-4-(RS)-1,4-дигидропиридин), селективный блокатор кальциевых каналов L-типа, применяется при ишемических нарушениях мозгового кровообращения (в том числе при гипертоническом кризе), неврологических расстройствах вследствие спазма сосудов головного мозга, обусловленного субарахноидальным кровоизлиянием и при сенильной деменции [1, 2].

По физическим свойствам нимодипин (молярная масса 418,44) – желтый кристаллический порошок с температурой плавления 125°C, практически нерастворимый (0,012 мг/мл) в воде; рКа равно 5,41 [3]. Вещество растворимо в ацетоне, хлороформе, этиловом спирте.

Нимодипин достаточно токсичен для теплокровных животных и человека. LD₅₀ для крыс при внутрижелудочном введении – 2738 мг/кг, при внутривенном – 5 мг/кг [4]. По другим данным, LD₅₀ для крыс при введении в желудок составляет 2,5326 моль/кг [3]. При попадании в организм человека доз, значительно превышающих максимальные терапевтические, может наблюдаться заметное сниже-

ние артериального давления, тахикардия или брадикардия, тошнота, расстройства со стороны органов желудочно-кишечного тракта. Зафиксированы случаи отравления людей нимодипином, в том числе с летальным исходом [5, 6].

Токсические свойства, широкое применение рассматриваемого соединения, наличие случаев летального отравления делают его потенциальным объектом судебно-химического исследования. Вопросы идентификации и количественного определения нимодипина в биологическом материале разработаны недостаточно [7, 8].

Цель исследования – разработка методики идентификации и количественного определения нимодипина в биологическом материале.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования – нимодипин (2,6-диметил-3-изопропоксикарбонил-5-(2-метоксиэтоксикарбонил)-4-(3-нитрофенил)-4-(RS)-1,4-дигидропиридин) – стандарт фирмы LGC Standards с содержанием основного вещества ≥ 99,9 %.

В ходе исследования подбирали оптимальный изолирующий агент, позволяющий достичь наибольшей степени извлечения нимодипина из биологического материала. Изучали зависимость степени извлечения от кратности настаивания, продолжительности

контакта изолирующей жидкости с биологическим материалом, количественного соотношения изолирующего агента и биологического объекта.

Модельные смеси нимодипина с тканью пещени выдерживали в течение 1,5 ч при температуре 16–18°C, после чего осуществляли процесс изолирования путем двукратного (каждый раз по 30 мин) настаивания с порциями ацетона, этилацетата или ацетонитрила. Объем каждого используемого экстрагента в 2 раза превышал по массе количество модельной смеси. В каждом случае 1-е и 2-е извлечения объединяли, часть объединенного извлечения подвергали хроматографированию (ТСХ) на пластинках «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ в системе гексан–ацетон (7:3). Хроматограммы детектировали в УФ-свете. Анализируемое вещество идентифицировали по величине R_f свидетеля ($0,56 \pm 0,03$) и элюировали с сорбента этиловым спиртом. По величине оптической плотности элюата, рассчитанной при длине волны 358 нм, определяли количественное содержание нимодипина, используя уравнение градуировочного графика [9, 10].

Для очистки нимодипина, выделенного из биоматериала, применяли хроматографию низкого давления на колонке размером 490×11 мм, заполненной сорбентом «Силасорб С-18» (размер частиц – 30 мкм). Элюентом служила смесь ацетонитрила и воды в объемном отношении 6:4. Элюат собирали отдельными фракциями по 2 мл каждая. Нимодипин во фракциях элюата обнаруживали методом ТСХ, используя пластины «Сорбфил» и систему гексан–ацетон (7:3).

Для подтверждающей идентификации нимодипина изучена возможность применения хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС). При определении нимодипина данным методом использовали газовый хроматограф Agilent Technologies 6890N с масс-селективным квадрупольным детектором модели 5973N. Хроматографирование осуществляли в колонке DB-1MS 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 содержащихся веществ проводилось в режиме регистрации по полному ионному току (диапазон сканирования – 40–550 m/z).

Для подтверждающей идентификации и количественного определения анализируемого соединения применяли метод УФ-спектрофотометрии, используя спектрофотометр СФ-56.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимальным изолирующим агентом для извлечения нимодипина из биологического материала (при содержании его в исследуемых образцах в коли-

чествах 0,02–0,3%) явился ацетон. Установлено, что достаточно полное извлечение анализируемого соединения из биологического материала может быть достигнуто при двукратном настаивании биологического материала с ацетоном в случае, если масса изолирующего агента каждый раз в 2 раза превышает массу биологического материала. Продолжительность контакта биологического объекта с изолирующей жидкостью при каждом настаивании должна составлять не менее 30 мин.

Как показали результаты изучения особенностей хроматографирования анализируемого вещества в колонке с сорбентом «Силасорб С-18» при подвижной фазе ацетонитрил–вода (6:4) нимодипин обнаруживается во фракциях 8–11 (15–22 мл). При определении нимодипина методом ГХ-МС объем вводимой пробы составлял 1 мкл. Проба вводилась в режиме без деления потока, задержка – 3 мин. В качестве газа-носителя использовали гелий, подаваемый со скоростью 39 $см^3/с$. Начальная температура термостата колонки 80°C выдерживалась в течение 2 мин, после чего в течение 6 мин осуществлялось нагревание до 250°C со скоростью 40°C/мин. Температура инжектора составляла 280°C, температура интерфейса детектора – 300°C. В предлагаемых условиях на газо-жидкостной хроматограмме анализируемого соединения обнаруживался пик с временем удерживания 19,9 мин. Масс-спектр вещества, соответствующего данному пику, включает сигналы ряда осколков с характерными массами (59, 106, 151, 196, 227, 254, 296, 359). Основным (масса которого принимается за 100%) является осколок с массой 296. Подобное сочетание характерных осколков вещества с временем удерживания 19,9 мин позволяет с достаточной степенью селективности идентифицировать анализируемое вещество как нимодипин методом ГХ-МС.

Исследование особенностей светопоглощения нимодипина в УФ- и видимой областях показало, что оптимальные условия определения могут быть достигнуты при использовании в качестве растворителя этилового спирта. Поглощение нимодипина в данной системе характеризуется наличием 4 полос с максимумами при 206, 236, 270–275 (скрытая полоса) и 358 нм. Соответствующие данным максимумам значения удельного коэффициента поглощения составляют 737, 655, 142, 127, значения молярного коэффициента – 39088, 34728, ≈ 7500 , 6754. Для количественного определения нимодипина измерения осуществляли в области наиболее длинноволнового максимума (358 нм). Открываемый минимум нимодипина спектрофотометрическим методом составлял 1,5 мкг в 1 мл фотометрируемого раствора.

На УФ-спектрах нимодипина, выделенного из биологического материала, по сравнению с тако-

вым вещества-стандарта (см. рисунок) не обнаруживаются дополнительные полосы или заметное увеличение фонового поглощения. При этом основные оптические характеристики нимодипина, выделенного из биоматериала, совпадают с соответствующими параметрами стандартного вещества. Установлено наличие линейной зависимости между оптической плотностью (А) и содержанием нимодипина в фотометрируемом растворе (С, мкг/мл) в интервале концентраций 2,5–80,0 мкг/мл. Уравнение калибровочного графика в данном случае имеет вид: $A=0,016131 \cdot C+0,002479$. Относительная ошибка среднего результата при определении нимодипина методом спектрофотометрии не превышала 1% ($n=6$; $p=0,95$). На основе результатов предварительных исследований разработана методика определения нимодипина в биологическом материале.

Методика определения нимодипина в биологическом материале. *Изолирование нимодипина.* К 25 г биологического материала (мелкоизмельченной ткани печени), содержащего определенное количество анализируемого вещества, прибавляли 50 г ацетона и выдерживали в течение 30 мин при перемешивании. Полученное извлечение отделяли, а процесс настаивания повторяли. Отдельные извлечения объединяли в выпарительной чашке и испаряли растворитель в токе воздуха до получения сухого остатка.

Очистка извлечения. Сухой остаток растворяли в 2–3 мл смеси растворителей ацетонитрил–вода (6:4), вносили в стеклянную хроматографическую колонку размером 490×11 мм, предварительно за-

полненную 7,5 г сорбента «Силасорб С-18» (размер частиц – 30 мкм). При хроматографировании в качестве элюента использовали систему растворителей ацетонитрил–вода (6:4). Элюат собирали отдельными фракциями по 2 мл каждая. Фракции с 8 по 11 включительно объединяли, испаряли в токе воздуха при температуре 16–22°С. Остаток растворяли в 5 мл этилового спирта.

В 2 выпарительные чашки вносили соответственно 0,1–2,0 мл, и 1,0–2,5 мл исходного этанольного раствора, растворитель затем испаряли.

Предварительная идентификация методом ТСХ. Остаток в чашке 1 растворяли в небольшом количестве этилового спирта, количественно переносили раствор на линию старта хроматографической пластины «Сорбфил» и осуществляли процесс хроматографирования с применением элюента гексан–ацетон (7:3) в присутствии вещества-свидетеля. Анализируемое вещество идентифицировали по величине $R_f = 0,56 \pm 0,03$.

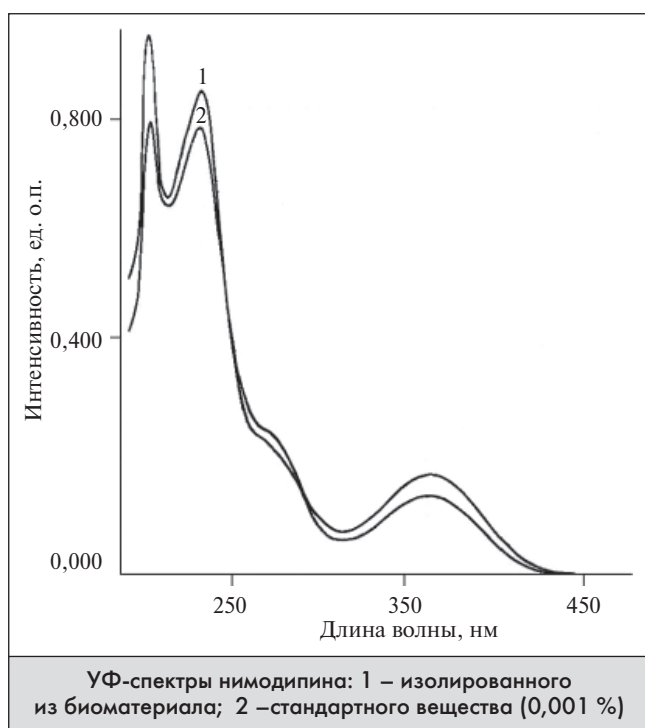
Подтверждающая идентификация методом ГХ-МС. Остаток в чашке 2 растворяли в 2 мл этилового спирта. 1 мкл полученного раствора вводили в хроматограф «Agilent Technologies» 6890N с масс-селективным квадрупольным детектором модели 5973N. Пробу вводили без деления потока и хроматографировали в вышеописанных условиях.

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

Подтверждающая идентификация и количественное определение методом электронной спектрофотометрии. После предварительного хроматографирования методом ТСХ по вышеуказанной схеме участок хроматограммы с анализируемым веществом вырезали и элюировали вещество 5–10 мл этанола. Поглощение полученного элюата исследовали в интервале длин волн 200–400 нм, используя спектрофотометр СФ-56, в кюветках с толщиной рабочего слоя 10 мм. Измерения проводили на фоне раствора, полученного в контрольном опыте.

Определяемое вещество идентифицировали по форме спектральной кривой и положению максимумов полос поглощения. Количественное содержание вещества рассчитывали по величине оптической плотности, измеренной при длине волны 358 нм, используя уравнение калибровочного графика, и пересчитывали на навеску анализируемого вещества, внесенную в биологический материал. Результаты количественного определения нимодипина представлены в таблице.

Как свидетельствуют полученные данные, предлагаемая методика позволяет определить до 85,46% нимодипина в печени с достаточной для биологи-



**ЗАВИСИМОСТЬ СТЕПЕНИ ИЗВЛЕЧЕНИЯ (R,%) НИМОДИПИНА ИЗ ТКАНИ ПЕЧЕНИ
ОТ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СООТНОШЕНИЯ АНАЛИЗИРУЕМОГО ВЕЩЕСТВА
И БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА (n=5; p=0,95)**

Внесено нимодипина, мг в 25 г биоматериала	Найдено, %				
	\bar{x}	S	$S_{\bar{x}}$	$\Delta\bar{x}$	$S_p, \%$
50,0	85,46	2,28	1,02	2,84	2,67
25,0	85,11	2,57	1,15	3,19	3,02
10,0	84,72	2,82	1,26	3,51	3,33
2,5	83,35	3,20	1,43	3,98	3,84
1,25	82,24	3,51	1,57	4,37	4,27

ческих исследований воспроизводимостью и точностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана методика идентификации и количественного определения нимодипина в извлечениях из трупного материала методами тонкослойной хроматографии, хромато-масс-спектрометрии и УФ-спектрофотометрии. Для изолирования нимодипина из биологического материала предложено настаивание с ацетоном. Очистка анализируемого соединения, изолированного из биологических объектов, проводится методом хроматографии низкого давления в колонке с сорбентом «Силасорб С-18» (размер частиц – 30 мкм).

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Aburto-Murrieta Y., Marquez-Romero J.M., Bonifacio-Delgadillo D., López I., Hernández-Curiel B. Endovascular Treatment Balloon Angioplasty Versus Nimodipine Intra-arterial for Medically Refractory Cerebral Vasospasm Following Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Vasc. Endovascular Surg.* 2012; 46 (6): 460–5.
2. Cho W-S., Kang H-S., Kim J.E., Kwon O-K. et al. Intra-Arterial Nimodipine Infusion for Cerebral Vasospasm in Patients with Aneurysmal Subarachnoid. *Interv. Neuroradiol.*, 2011;17 (2):169–78.

3. Nimodipine. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00393>. Accessed April 22, 2015.
4. Ganellin C.R., Triggle D.J. *PharmaSource Dictionary of Pharmacological Agents on CDROM*. New York: CRC Press; 1997.
5. Aschenbrenner D.S. Oral Nimodipine Given Intravenously Can Be Fatal. *American Journal of Nursing.* 2010; 110 (12): 27–8.
6. Take steps to avoid inadvertent IV administration of nimodipine. https://www.ismp.org/newsletters/acutecare/articles/20050728_1.asp. Accessed April 22, 2015.
7. Zhao Y., Zhai D., Chen X., Yu Q. et al. Determination of nimodipine in human plasma by HPLC-ESI-MS and its application to a bioequivalence study. *J. Chromatogr. Sci.* 2010; 48(2):81–5.
8. Qiu F, Chen X, Li X, Zhong D. Determination of nimodipine in human plasma by a sensitive and selective liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2004; 802 (2): 291–7.
9. Квачахия Л.Л., Шорманов В.К. Идентификация нифедипина в биологических жидкостях. *Фармация*, 2013; 62 (8): 16–9. (Kvachakhia L.L., Shormanov V.K. Identification of nifedipine in biological fluids. *Farvatsiya*, 2013; 62 (8): 16–9. (in Russian)).
10. Шорманов В.К., Квачахия П.П., Ртищев К.П. Определение верапамил в плазме крови. *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*, 2014;(2):107–13. (Shormanov V.K., Kvachakhia L.L., Rtishev K.P. Definition of verapamil in blood plasma. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestrnik «Chelovek i ego zdorovie»*, 2014; 2: 107–13. (in Russian).)

Поступила 5 мая 2016 г.

DETERMINATION OF NIMODIPINE IN BIOLOGICAL MATERIAL

L.L. Kvachakhia, PhD; Professor V.K. Shormanov, PhD; G.S. Meshcheryakova
Kursk State Medical University; 3, K. Marx St., Kursk 305041, Russian Federation

SUMMARY

Introduction. Nimodipine, an L-type selective calcium channel blocker, is commonly used in medical practice. It is quite toxic to warm-blooded animals and human beings. Cases of fatal poisoning caused by nimodipine make it the subject of a forensic chemical examination.

Objective: to devise a procedure for the identification and quantification of nimodipine in biological material.

Material and methods. Model mixtures of nimodipine and liver tissue were prepared for the investigation. A preliminary analysis was carried out chromatographically using Sorbfil PTCC-AF-B-UF plates in the hexane–acetone (7:3) system. Gas chromatography-mass spectrometry and UV spectrophotometry were employed for confirming identification and quantification.

Results. The optimal isolating agent and conditions for infusing a biological object with an extractant were established. The chromatographic characteristics of nimodipine were studied. The optimal conditions for its quantification were found. The proposed procedure can determine as high as 85.46% of nifedipine in the liver, with the reproducibility and accuracy being sufficient for biological tests.

Conclusion. A procedure has been devised to identify and quantify nimodipine in the extracts from autopsy material, by applying thin layer chromatography, chromatographic-mass spectrometry, and UV spectrophotometry.

Key words: nimodipine, biological material, identification, quantification, chromatography, UV spectrophotometry.