

УДК 615.214.24:543.857.6

ЗАСТОСУВАННЯ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ В АНАЛІЗІ ДОНОРМІЛУ

В.В.Болотов, І.М.Іванчук

Національний фармацевтичний університет,
61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. E-mail: anchem@ukrfa.kharkov.ua

Ключові слова: дономілу; хіміко-токсикологічний аналіз; високоефективна рідинна хроматографія

Запропоновані умови якісного аналізу дономілу методом ВЕРХ, встановлені його основні хроматографічні параметри. Розроблено методику кількісного визначення дономілу методом ВЕРХ; відносна невизначеність середнього результату не перевищує $\pm 0,81\%$.

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY APPLICATION IN THE ANALYSIS OF DONORMIL
V.V.Bolotov, I.M.Ivanchuk

The conditions for the qualitative analysis of donormil by HPLC method have been offered, its main chromatographic parameters have been determined. The method of the quantitative determination of donormil by HPLC method has been developed; a relative error of the method is $\pm 0,81\%$.

ПРИМЕНЕНИЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В АНАЛИЗЕ ДОНОРМИЛА

В.В.Болотов, И.М.Иванчук

Предложены условия качественного анализа дономила методом ВЭЖХ, установлены его основные хроматографические параметры. Разработана методика количественного определения дономила методом ВЭЖХ; относительная неопределенность среднего результата не превышает $\pm 0,81\%$.

Донорміл (доксиламін) — N,N-диметил-2-[1-феніл-1-(піридиніл)-етокси]етанамін — снодійний засіб, що в Україні належить до препаратів безрецептурного відпуску на відміну від інших препаратів, які застосовуються для лікування розладів сну, і тому вельми популярний серед усіх верств населення. Окрім цього дономілу виявляє антигістамінну та М-холінолітичну дію, а тому іноді входить до складу комплексних протизастудних препаратів [1, 2].

Препарат за даними наукової літератури викликає інтерес у хіміко-токсикологічному відношенні [3]. Описано 109 випадків отруєнь дономілом, також нерідко трапляються випадки суїцидів. Клінічна картина отруєнь дономілом та морфологічні зміни в організмі при цьому не є характерними та мають багато спільного з димедролом (димедрол та дономілу схожі як за фармакодинамікою, так і за хімічною структурою). Діагностика отруєнь цими препаратами, як і взагалі снодійними засобами, ускладнюється ще тим, що разом з ними застосовуються інші препарати [4-6].

На сьогодні для діагностики отруєнь у хіміко-токсикологічному аналізі широко використовують метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), який знайшов застосування і в аналізі дономілу [7-10].

Недоліком традиційного застосовування ВЕРХ є відсутність уніфікації, що призводить до розробки для кожної речовини своєї “унікальної методики” [11]. Альтернативним є підхід, сутність якого полягає в проведенні аналізу сполук із певного списку (від 20 до 500 речовин) з використанням однієї хроматографічної системи (колонка з оберненою фазою, градієнтне елюювання та УФ-детектування). При цьому складається “база даних” для масиву стандартних речовин, і в наступному ідентифікацію піків на хроматограмах досліджуваних зразків здійснюють шляхом порівняння їх часів утримування, а також спектральних відношень із зазначеною “базою даних” [12].

Як хроматографічну систему в роботі, що цитується, запропоновано використовувати хроматограф “Міліхром А-02” (Новосибірськ, ЗАТ “Еко-Нова”), колонку розміром $\varnothing 2 \times 75$ мм з оберненою фазою ProntoSIL — 120 — 5 — C18 AQ (“Bischoff Analysentechnik und Gerate GmbH”, Німеччина), що має ефективність не менше 5000 теоретичних тарілок. Градієнтне елюювання виконують змішуванням двох елюентів: елюент А — $[4M LiClO_4 - 0,1 M HClO_4] - H_2O$ (5:95), елюент Б — ацетонітрил “для ВЕРХ”. ВЕРХ-аналіз виконують за таких умов: швидкість потоку — 100 мкл/хв; елюювання — лінійний градієнт від 5% до 100%

Таблиця 1

Основні хроматографічні параметри донормілу при визначенні методом ВЕРХ

t _R	V _R	R (S _λ / S ₂₁₀)							
		210нм/210нм	220нм/210нм	230нм/210нм	240нм/210нм	250нм/210нм	260нм/210нм	280нм/210нм	300нм/210нм
11,849	1184,9	1,0000	0,4088	0,1750	0,1813	0,3783	0,7897	0,2977	0,0348

ацетонітрилу за 40 хв, потім 100% ацетонітрил протягом 3 хв; температура колонки — 40°C. УФ-детектування проводять одночасно при 8 довжинах хвиль: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 та 300 нм, тому кожній речовині на хроматограмі відповідає 8 піків з однаковим часом утримування, але з різними амплітудами, що прямо пропорційно абсорбції речовини. Для кожної речовини розраховують 7 характерних нормованих спектральних параметрів — відношення площ піків при довжинах хвиль λ_2 — λ_8 до площі піку при довжині хвилі $\lambda_1 = 210$ нм ($R = S_{\lambda} / S_{210}$). Сукупність цих спектральних відношень R разом з величиною об'єму утримування (V_R) використовують для ідентифікації піку речовини на хроматограмі.

Правильність методики аналізу періодично контролюють шляхом хроматографування спеціального контрольного багатокомпонентного розчину [12].

У роботі поставлено за мету спробувати використати зазначену хроматографічну систему для ідентифікації та кількісного визначення донормілу. Раніше [13] було показано можливість її використання для аналізу снодійного лікарського засобу зопіклону.

Основні хроматографічні параметри донормілу при визначенні методом ВЕРХ за зазначеною методикою наведені в табл. 1, а типова хроматограма — на рис. 1.

При цьому встановлено, що мінімальна концентрація донормілу в розчині, яку можна визна-

чити за допомогою наведеної методики, становить 1 мкг/мл, що відповідає вмісту речовин у введеному об'ємі проби 2 нг.

Можливості приладу “Міліхром А-02” дозволяють отримувати УФ-спектр речовини, що аналізується. УФ-спектр донормілу, отриманий таким чином, наведений на рис. 2.

Нами розроблено методику кількісного визначення донормілу методом ВЕРХ. З цією метою було виготовлено серію розчинів та проведено їх хроматографування за вказаних умов.

Для розрахунку вмісту донормілу в модельних розчинах використовували градувальний графік, використовуючи як робочу довжину хвилі 260 нм, якому відповідає рівняння прямої (1) виду $y = bx + a$, що має вигляд [14]:

$$S = 0,0003135 \cdot C + 0,0002224, \quad (1)$$

де: S — площа піку розчину донормілу;

C — концентрація розчину донормілу, мкг/мл.

Метрологічні характеристики отриманої градувальної залежності наведені в табл. 2.

Після перевірки значущості коефіцієнта а в рівнянні (1) був зроблений висновок про неможливість переходу до рівняння виду $y = b \cdot x$ [14].

Площа піку розчинів донормілу лінійно залежить від їх концентрації в діапазоні концентрацій від 1 мкг/мл до 400 мкг/мл, що відповідає вмісту речовин у пробі від 2 нг до 800 нг відповідно.

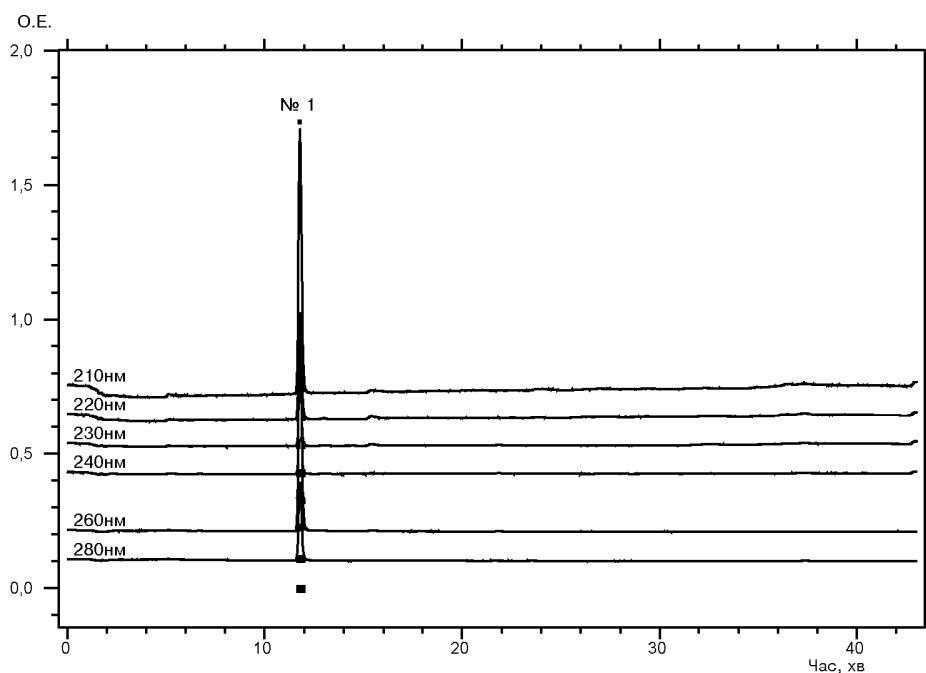


Рис. 1. Хроматограма розчину донормілу, отримана методом ВЕРХ.

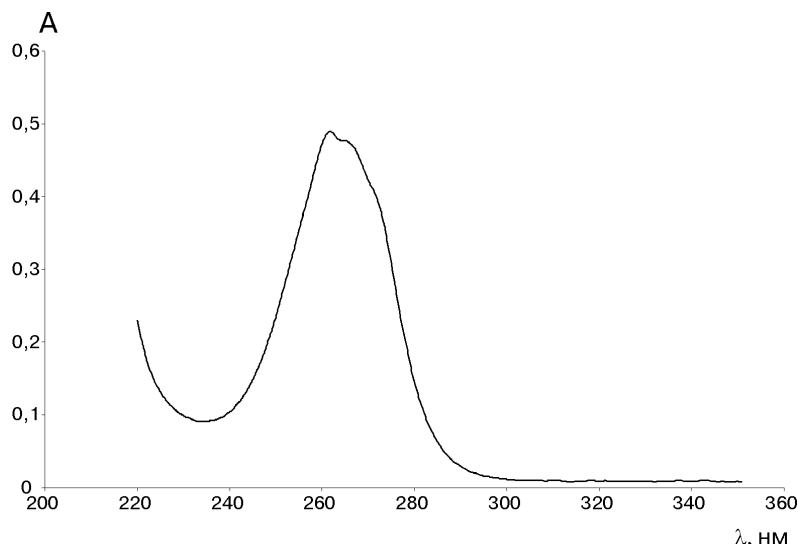


Рис. 2. УФ-спектр розчину дономілу (концентрація 10 мкг/мл).

Таблиця 2

Метрологічні характеристики градувальної залежності площі піку від вмісту дономілу ($y = bx + a$), отриманої методом ВЕРХ ($\lambda = 260$ нм; об'єм проби 2 мкл)

R^2	b	a	S^2	Δb	Δa
0,9999	0,0003135	0,0002224	0,0000002808	0,000004222	0,000714

Результати кількісного визначення дономілу в модельних розчинах за допомогою розробленої методики наведені в табл. 3.

З даних, наведених у табл. 3, випливає, що відносна невизначеність середнього результату при кількісному визначенні дономілу методом ВЕРХ не перевищує $\pm 0,81\%$.

Експериментальна частина

У роботі використовували дономілу фармакопейної чистоти. Як розчинник використовували воду очищену.

Роботу з хроматографом “Міліхром А-02” виконували на базі НВФ “Аналітика” (м. Харків). Обробку хроматограм проводили за допомогою програми “Аналітика — Chrom”, розробленої цією ж установою.

Побудова градувального графіка для кількісного визначення дономілу методом ВЕРХ. 100 мг дономілу вносили в мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняли в невеликій кількості води очищеної та

доводили об'єм розчину водою очищеною до позначки (стандартний розчин 1, концентрація 1000 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 40,00 мл стандартного розчину 1 і доводили об'єм розчину водою очищеною до позначки (стандартний розчин 2, концентрація 400 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 10,00 мл стандартного розчину 1 і доводили об'єм розчину водою очищеною до позначки (стандартний розчин 3, концентрація 100 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 10,00 мл розчину 2 і доводили об'єм розчину водою очищеною до позначки (стандартний розчин 4, концентрація 40 мкг/мл). У дві мірні колби місткістю 100,0 мл вносили 10,00 та 5,00 мл стандартного розчину 4 відповідно і доводили об'єми розчинів до позначки водою очищеною (розчини 5 та 6 відповідно, концентрація 4 та 2 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 100,0 мл вносили 10,00 мл розчину 3 і доводили об'єм розчину до позначки водою очищеною (розчин 7, концентрація 1 мкг/мл).

Таблиця 3

Результати кількісного визначення дономілу методом ВЕРХ у модельних розчинах ($\lambda = 260$ нм; об'єм проби 2 мкл)

Концентрація розчину дономілу, мкг/мл	Площа піку	Знайдено дономілу		Метрологічні характеристики
		мкг/мл	%	
2,0	0,0008500	1,99	99,50	$\bar{X} = 100,39$ $S = 0,6529$ $S_{\bar{X}} = 0,292$ $\Delta X = 0,812$ $\varepsilon = 0,81 \pm \%$ $\bar{X} \pm \Delta \bar{X} = 100,39 \pm 0,812$
4,0	0,001483	4,02	100,50	
40,0	0,01287	40,34	100,85	
200,0	0,06362	202,24	101,11	
400,0	0,1256	399,92	99,98	

Розчини донормілу 2, 3, 4, 5, 6 та 7 хроматографували за вищезазначених умов; об'єм проби для хроматографування становить 2 мкл. Хроматографування кожного розчину проводили тричі. За результатами експерименту будували градувальний графік.

Висновки

1. Встановлені основні хроматографічні параметри донормілу — час та об'єм утримування,

спектральні відношення. Встановлено, що для аналізу донормілу може бути застосована уніфікована методика з використанням ВЕРХ-аналізатора “Міліхром А-02”.

2. Розроблено методику кількісного визначення донормілу методом ВЕРХ, яку можна застосовувати в діапазоні концентрацій від 1 мкг/мл до 400 мкг/мл; відносна невизначеність середнього результату не перевищує $\pm 0,81\%$.

Література

1. Eccles R., Van Cauwenberge P., Tetzloff W. // *J. Pharm. Pharmacol.* — 1995. — Dec., №47 (12A). — P. 990-993.
2. Supiyaphun P., Kerekhanjanarong V., Saengpanich S. // *J. Med. Assos. Thaj.* — 2003. — Jun., №86 (2). — P. 362-372.
3. Siek T.J., Dunn W.A. // *J. Forensic Sci.* — 1993. — May, №38 (3). — P. 713-720.
4. Levine B., Klette K., Radentz S. // *Forensic Sci. Int.* — 1996. — Jul., 31, № 81 (1). — P. 73-76.
5. Koppel C., Tenczer J., Ibe K. // *Hum. Toxicol.* — 1987. — Sep., №37 (9). — P. 355-359.
6. Bockholdt B., Klug E., Schneider V. // *Forensic Sci. Int.* — 2001. — Jun., 1, № 119 (1). — P. 138-140.
7. Ganes D.A., Midha K.K. // *Xenobiotica.* — 1987. — Aug., №17 (8). — P. 993-999.
8. Lay J.O., Korfmacher W.A., Miller D.W. // *Biomed. Environ Mass Spectrom.* — 1986. — Nov., №13 (11). — P. 627-632.
9. Holder C.L., Korfmacher W.A., Slikker W.J. // *Biomed. Mass Spectrom.* — 1986. — Apr., №12 (4). — P. 151-158.
10. Gil-Agusti M., Monferrer-Pons L., Esteve-Romero J. // *J. AOAC Int.* — 2001. — Nov. — Dec., №84 (6). — P. 1687-1694.
11. *European Pharmacopea.* — 4 ed. — Council of Europe. — Strasbourg, 2002. — 2416 p.
12. Барам Г.И., Рейхарт Д.В., Гольдберг Е.Д. и др. // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* — 2003. — Т. 135, №1. — С. 75-79.
13. Болотов В.В., Клименко Л.Ю. // *ЖОФХ.* — 2005. — Т. 3, №4 (12). — С. 77-81.
14. Дорфель К. *Статистика в аналитической химии / Пер. с нем. под ред. В.В.Налимова.* — М.: Мир, 1969. — 223 с.

Надійшла до редакції 28.03.2006 р.