

Рекомендована д.ф.н., професором П.О.Безуглим

УДК 615.073:615.212.7

РОЗРОБКА ОПТИМАЛЬНИХ УМОВ АНАЛІЗУ АТЕНОЛОЛУ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ, ПРИДАТНИХ ДЛЯ ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

О.В.Дульцева, В.С.Бондар, О.О.Маміна

Національний фармацевтичний університет

Розроблені оптимальні умови розділення, ідентифікації та кількісного визначення атенололу методом вискоэффективної рідинної хроматографії. Встановлено, що розроблені умови ідентифікації можуть бути використані для виявлення атенололу в присутності ряду препаратів, які можуть застосовуватись разом з ним.

Атенолол — 1-пара-карбамоїлметилфенокси-3-ізопропіламіно-2-пропанол — β -адреноблокатор, який використовується в медичній практиці для лікування гіпертонії, стенокардії, серцевої аритмії та гострого інфаркту міокарда, але характеризується при передозуванні, сполученні з іншими ліками (клофеліном, метилдопою, резерпіном або діуретиками) токсичними ефектами (алергічними реакціями, набряками легень, серцевою недостатністю), тому розробка його хіміко-токсикологічного аналізу при застосуванні сучасних вискоэффективних та надійних методів дослідження є актуальною проблемою [1, 3, 4, 5].

Одним з таких методів є вискоэффективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), яка широко використовується в аналізі лікарських препаратів та отрут різної природи [2, 6-10].

Метою представленої роботи є розробка оптимальних умов проведення ідентифікації та кількісного аналізу атенололу ВЕРХ-методом, придатних для хіміко-токсикологічного дослідження як індивідуального препарату, так і при сумісній присутності його з іншими препаратами однакової фармакологічної дії.

Матеріали та методи

Досліджувані розчини готували із субстанції атенололу, яка відповідає вимогам ДФ XI [2].

Хроматографічний аналіз проводили на мікроколонульному рідинному хроматографі "Міліхром А-02" (Новосибірськ, АТ "Еконова") у зворотньо-фазному варіанті. Нерухома фаза — сорбент Nucleosil-100-5, С18 (колонка довжиною 75 мм та діаметром 2 мм). Рухома фаза — буферний роз-

чин, а саме 4 М розчин літію перхлорату в 0,2 М розчині кислоти ортофосфорної (після розведення в 20 разів водою для ін'єкцій рН розчину складає 2,8); органічний розчинник — ацетонітрил, який фільтрували через мембрану МФА-МАН-2 ("Владипор", розмір пор 0,15-0,25 мкм) та дегазували вакуумуванням. Швидкість подавання розчинника складала 100 мкл/хв; режим хроматографування — градієнтний (від 10% до 100% ацетонітрилу).

Препарати визначали за допомогою двопробного мультитихвильового УФ-спектрофотометричного детектора (190-360 нм) з точністю довжини хвилі 0,5 нм.

Температура колонки — 35°C; об'єм проби — 1 мкл [2, 6, 7].

Результати та їх обговорення

У результаті дослідження встановлено, що розроблені умови хроматографування атенололу при-

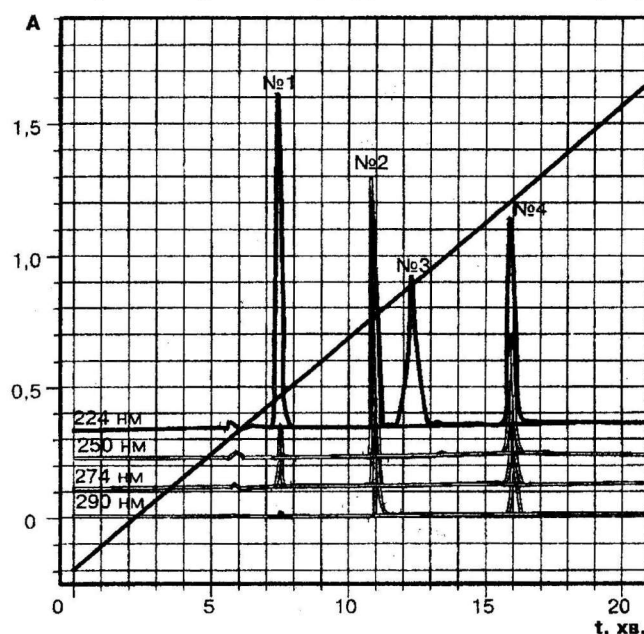


Рис. 1. Хроматографічне розділення суміші атенололу, тимололу, еналаприлу та фенігідину (t, хв — час утримування): №1 — атенолол (7,61±0,03); №2 — тимолол (11,01±0,03); №3 — еналаприл (12,49±0,02); №4 — фенігідин (16,17±0,03).

Таблиця 1

Параметри утримування атенололу, тимололу, еналаприлу та фенігідину

Препарат	$t_{абс}$ Препарату, хв	$t_{відн.}$ За тимо- лолом ($t_{абс.}$ препарату / $t_{абс.}$ тимололу)	$V_{абс.}$ Препара- ту, мкл $V_{абс.} = t_{абс.} * \omega$
Атенолол	7,61±0,03	0,69	761
Тимолол	11,01±0,03	—	1101
Еналаприл	12,49±0,02	1,13	1249
Фенігідин	16,17±0,03	1,47	1617

Примітка. * ω — об'ємна швидкість рухомої фази, мкл/хв.

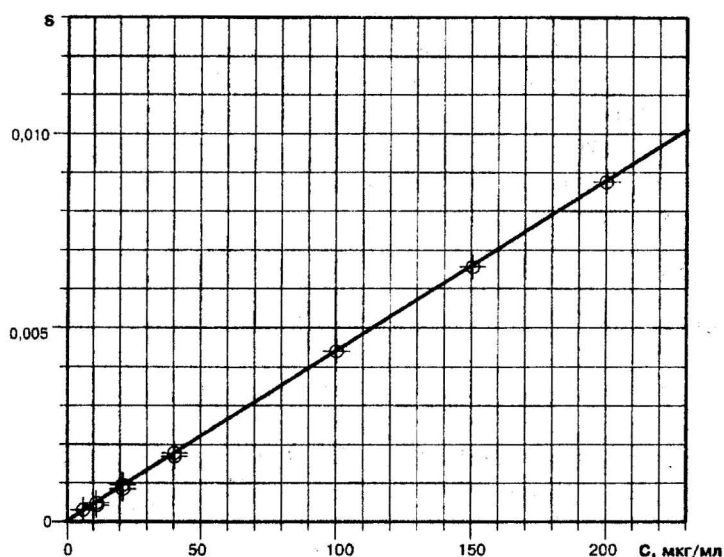


Рис. 2. Градувальний графік кількісного визначення атенололу методом високоефективної рідинної хроматографії.

датні для ідентифікації та кількісного визначення препарату в модельних розчинах та в біологічних об'єктах, а також для розділення суміші препаратів (атенолол, тимолол, еналаприл та фенігідин) (рис. 1).

Ідентифікацію препаратів проводили за абсолютним ($t_{абс}$) та відносним ($t_{відн}$) часом утримування, а також за абсолютним об'ємом утримування ($V_{абс}$) (табл. 1). Для розрахунку відносного

Таблиця 2

Спектральні характеристики досліджуваних препаратів

Препарат	Спектральні відношення			
	224 нм/ 224 нм	250 нм/ 224 нм	274 нм/ 224 нм	290 нм/ 224 нм
Атенолол	1	0,03336	0,13719	0,01239
Тимолол	1	0,39140	1,89081	3,82182
Еналаприл	1	0,07195	0,01072	0,01263
Фенігідин	1	0,56621	0,30578	0,29124

часу утримування препаратів як внутрішній стандарт використовували тимолол.

Крім того, ідентифікацію препаратів проводили за спектральними характеристиками, які отримували при детектуванні препаратів за чотирма довжинами хвиль — 224, 250, 274 та 290 нм в межах УФ-спектра атенололу. Спектральні характеристики розраховували в результаті ділення значень оптичної густини при 3 довжинах хвиль — від 250 до 290 нм — на значення оптичної густини при 224 нм (табл. 2).

Хроматографічне розділення суміші препаратів оцінювали за основними хроматографічними параметрами: ступенем розділення піків (R_s); селективністю (α); коефіцієнтом ємності (k'), які свідчать про ефективне розділення суміші атенололу, тимололу, еналаприлу та фенігідину (табл. 3).

Для кількісного аналізу атенололу в об'єктах досліджень використовували градувальний графік, побудований в координатах — площа піку атенололу ($S_{атенололу}$) — концентрація атенололу (C , мкг/мл) у стандартному розчині (вміст препарату — 200 мкг/мл). Встановлено, що чутливість методу складала 5 мкг/мл препарату, що було визначено як кількість речовини в пробі, яка відповідає сигналу, більшому ніж рівень шумів у хроматографі в 5 разів. Лінійність побудованого графіка спостерігалась в інтервалі концентрацій 5-200 мкг/мл атенололу (рис. 2).

Відтворюваність та надійність результатів, отриманих за розробленою методикою, перевіряли

Таблиця 3

Основні хроматографічні параметри розділення піків наркотиків

Препарат	Коефіцієнт ємності $k' = V_R - V_0 / V_0$	Селективність $\alpha = k'2 / k'1$			Ступінь розділення піків $R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{M_{0,5}(1) + M_{0,5}(2)}$
Атенолол	4,07	—	—	—	—
Тимолол	6,34	1,56- $\alpha_{2,1}$	—	—	3,40- $R_{s2,1}$
Еналаприл	7,33	1,80- $\alpha_{3,1}$	1,16- $\alpha_{3,2}$	—	1,48- $R_{s3,2}$
Фенігідин	9,78	2,40- $\alpha_{4,1}$	1,54- $\alpha_{4,2}$	1,33- $\alpha_{4,3}$	3,68- $R_{s4,3}$

Примітка. t_{R1} , t_{R2} — абсолютний час утримування препаратів, хв; $M_{0,5}(1)$, $M_{0,5}(2)$ — ширина піків на половині висоти, мм; $k'1$, $k'2$ — коефіцієнти ємності препаратів; V_R — абсолютний об'єм утримування препарату, мкл; V_0 — вільний об'єм колонки, який дорівнює 150 мкл.

Таблиця 4

Результати кількісного аналізу атенололу в модельних розчинах методом рідинної хроматографії (середнє з п'яти визначень)

Взято атенололу, мкг/мл	Визначено атенололу		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
5	5,03	100,5	$\bar{X}=99,9$ $S^2=3,61$ $S=1,90$ $S_x=0,73$ $\Delta X=1,79$ $\epsilon=\pm 1,80\%$ $X\pm\Delta X=99,9\pm 1,8\%$
10	9,67	96,7	
20	19,86	99,3	
40	39,36	98,4	
100	101,20	101,2	
150	151,35	100,9	
200	204,60	102,3	

на модельних розчинах, при цьому відносна помилка не перевищувала $\pm 1,8\%$ (табл. 4).

Результати досліджень свідчать, що розроблені оптимальні умови проведення ідентифікації та кількісного аналізу атенололу методом високо-

ефективної рідинної хроматографії придатні для хіміко-токсикологічного аналізу атенололу, а також аналізу суміші препаратів однакової фармакологічної дії (атенололу, тимололу, еналаприлу та фенігідину).

ВИСНОВКИ

1. Розроблені оптимальні умови аналізу атенололу в модельних розчинах та атенололу в суміші з тимололом, еналаприлом та фенігідиним методом високоефективної рідинної хроматографії.

2. Визначені параметри утримування та спектральні характеристики для ідентифікації досліджуваних препаратів, розраховані хроматографічні параметри розділення піків препаратів.

3. Проведено кількісне визначення атенололу в модельних розчинах ВЕРХ-методом. Встановлено, що межа визначення препарату складає 5 мкг в 1 мл вихідного розчину. Розроблена методика хроматографічного аналізу надійна та дозволяє отримувати відтворювані результати (відносна помилка визначення препарату в модельних розчинах складає $\pm 1,8\%$).

ЛІТЕРАТУРА

1. Белоусов Ю.Б., Моисеев В.С., Лепахин В.К. Клиническая фармакология и фармакотерапия. — М.: Универсум Паблишинг, 1997. — 530 с.
2. Державна фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". — 1-е вид. — Х.: РИРЕГ, 2001. — 556 с.
3. Еремін С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В. Анализ наркотических средств. — М.: Мысль, 1993. — 259 с.
4. Катцунг Б.Г. Базисная и клиническая фармакология. — М.: Бином, 1998. — Т. 1. — 683 с.
5. Лекарственные препараты Украины 1999-2000. — Х.: "Препар", 1999. — Т. 1. — С. 209-210.
6. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. — Х.: Торсинг, 1997. — Т. 1. — С. 108.
7. Baram G.I. // J. Chromatogr. — 1996. — Vol. 728. — P. 387-399.
8. Clarke E.J.C. Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material. — London: The Pharm. Press, 1986. — 1226 p.
9. Kidwell D.A., Holland J.C., Athanaselis S. // J. Chromatogr. B. — 1998. — Vol. 713. — P. 111-135.
10. Moeller M.R., Steinmeyer S., Kraemer T. // J. Chromatogr. B. — 1998. — Vol. 713. — P. 9-109.
11. Wilson W. // J. Forens. Sci. Soc. — 1991. — №2. — P. 233-237.

УДК 615.073:615.212.7

РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ АНАЛИЗА АТЕНОЛОЛА МЕТОДОМ ВЕЖХ, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Е.В.Дульцева, В.С.Бондарь, Е.А.Мамина

Разработаны оптимальные условия разделения, идентификации и количественного определения атенолола методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Установлено, что разработанные условия идентификации могут быть использованы для определения атенолола в присутствии ряда препаратов, которые могут применяться вместе с ним.

UDC 615.073:615.212.7

THE ELABORATION OF OPTIMAL CONDITIONS OF ATENOLOL ANALYSIS BY MEANS OF HPLC METHOD, SUITABLE FOR CHEMICO-TOXICOLOGICAL RESEARCH

O.V.Dultseva, V.S.Bondar, O.O.Mamina

The optimal conditions for division, identification and quantitative determination of athenolol by means of highly-effective liquid chromatography method have been developed. Experimental results have been demonstrated that the worked out conditions allow us to determine athenolol in the presence of another preparations which can be used together with it.