

Рекомендована д.ф.н., професором В.М.Ковальовим

УДК 615.9:615.211:544.45

## ГАЗОХРОМАТОГРАФІЧНИЙ МЕТОД ВИЯВЛЕННЯ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КЕТОРОЛАКУ

В.С.Бондар, О.В.Болотова

Національний фармацевтичний університет

Розроблено методику ідентифікації та кількісного визначення кеторолаку методом газорідинної хроматографії (ГРХ) за продуктом його взаємодії зі спиртом метиловим. За допомогою тонкошарової хроматографії (ТШХ) та високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) встановлено, що значення  $R_f$  та відносний час утримання ( $t'_R$ ) одержаної сполуки та кеторолаку не співпадають. Встановлено, що в процесі етерифікації кеторолак практично на 100% переходить у продукт етерифікації кеторолаку (ПЕК).

Для ідентифікації кеторолаку — нового представника піроло-пірольної групи нестероїдних протизапальних засобів (НПЗЗ) запропоновано ряд хімічних та фізико-хімічних методів [1, 2, 14]. Виходячи з важливого хіміко-токсикологічного значення кеторолаку [4, 5, 8, 10, 11, 13, 15], ми встановили необхідність його подальшого дослідження з метою розробки нових методів виявлення та кількісного визначення, особливо з використанням чутливих і точних методів.

Одним з цих методів є ГРХ, який широко використовується при хіміко-токсикологічних дослідженнях [3, 6, 7, 9].

У результаті проведеного огляду літературних джерел та попередніх власних досліджень газохроматографічної поведінки кеторолаку встановлено, що препарат у вигляді кислоти методом ГРХ проаналізувати не вдається. Його виявлення та визначення за допомогою цього методу можливе тільки після попередньої дериватизації з діазопропаном [12].

Ми поставили собі за мету розробити ефективну методику виявлення та кількісного визначення кеторолаку за допомогою методу ГРХ.

### Експериментальна частина

Визначення кеторолаку методом ГРХ можливе тільки після одержання леткого продукту. Методика ідентифікації та кількісного визначення кеторолаку (органічної кислоти) з використанням ГРХ полягає у попередній взаємодії препарату зі спиртом метиловим при нагріванні в присутності каталізатора. Одержаний продукт етерифікації кеторолаку (ПЕК) визначали на газовому хромато-

графі фірми "Hewlett Packard" HP 6890 (США) з полум'яно-іонізаційним детектором. Умови хроматографування: колонка капілярна кварцева HP-1 розміром 25 м · 0,32 мм, покрита шаром нерухомої фази (метилсилоксаном) з товщиною шару 0,17 мкм; температура термостату колонки програмується — спочатку температуру 80°C підтримують протягом 2 хв, потім її підвищують зі швидкістю 40°C/хв до 300°C і цю температуру підтримують протягом 5 хв; температура інжектора — 320°C, температура детектора — 330°C; об'ємна швидкість газу-носія (гелію) — 2 мл/хв, розділення потоку — 1:2. Тому що використаний для аналізу прилад не забезпечений автосамплером, який дозволяє вводити пробу з абсолютною точністю, ми використовували для проведення аналізу метод внутрішнього стандарту. Як стандарт застосовували ментиловий ефір ізовалеріанової кислоти. Обрані умови хроматографування забезпечують повне розділення хроматографічних зон компоненту, який визначається, а також внутрішнього стандарту і розчинника.

**Методика отримання ПЕК.** Біля 0,01 г (точна наважка) кеторолаку поміщають у колбу ємністю 10 мл, додають 3,0 мл спирту метилового та 0,1 мл ацетилю хлористого (каталізатор), нагрівають на гліцериновій бані при температурі 100°C зі зворотним холодильником протягом 1 години. Отриманий розчин кількісно переносять у мірну колбу ємністю 10 мл, доводять об'єм розчину спиртом метиловим до мітки і перемішують (основний розчин ПЕК).

Цей розчин використовували для ідентифікації отриманої сполуки кеторолаку та кількісного визначення.

Ідентифікацію кеторолаку за отриманим продуктом взаємодії препарату зі спиртом метиловим за  $t'_R$  визначали при концентрації речовин 50 мкг/мл; отримані дані наведені на рис. 1.

Кількісне визначення кеторолаку в модельних розчинах проводили за попередньо побудованим градувальним графіком (рис. 2).

### Методика побудови градувального графіка

1. Приготування розчину ментилового ефіру ізовалеріанової кислоти (внутрішній стандарт).

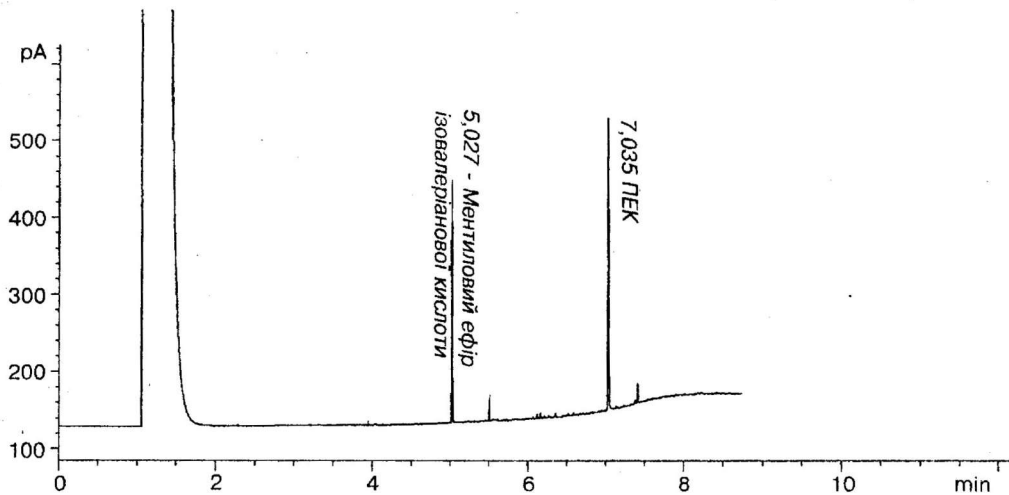


Рис. 1. ГРХ-хроматограма розчину ПЕК.

0,2 г Ментилового ефіру ізовалеріанової кислоти поміщають у мірну колбу ємністю 25 мл, доводять об'єм розчину спиртом метиловим до мітки і перемішують. 1,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу ємністю 25 мл, доводять об'єм розчину спиртом метиловим до мітки і перемішують.

2. Приготування розчинів для побудови градуувального графіка. 2,0 мл Основного розчину ПЕК (еквівалентного 1000 мкг/мл кеторолаку), приготування якого наведено вище, поміщають у мірну колбу ємністю 10 мл, доводять об'єм розчину спиртом метиловим до мітки і перемішують (200 мкг/мл). У ряд мірних колб ємністю 10 мл вносять по 5,0; 2,5; 0,5; 0,25; 0,05 мл розчину з концентрацією 200 мкг/мл і по 1,0 мл розчину ментилового ефіру ізовалеріанової кислоти (внутрішній стандарт), доводять об'єм розчину спиртом метиловим до мітки і перемішують.

По 2 мкл отриманих розчинів хроматографували за представлених вище умов. Згідно з отриманими даними будували градуувальний графік залежності відношення площ піків ПЕК до площ піків ментилового ефіру ізовалеріанової кислоти ( $S_1/S_0$ ) від відношення їх концентрацій у розчині ( $C_1/C_0$ ).

Метрологічні характеристики методики кількісного визначення кеторолаку, отримані на модельних розчинах, наведені у таблиці.

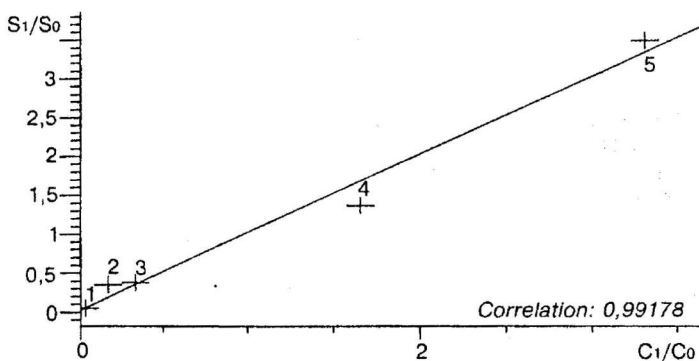


Рис. 2. Градуувальний графік залежності відношення площ піків ПЕК до площ піків ментилового ефіру ізовалеріанової кислоти ( $S_1/S_0$ ) від відношення їх концентрацій у розчині ( $C_1/C_0$ ).

Крім того, були проведені дослідження отриманого ПЕК методами ТШХ та ВЕРХ у порівнянні зі стандартним розчином кеторолаку з концентрацією близько 450 мкг/мл. Дослідження методом ТШХ проводили на пластинках Silicagel 60 F254 ("Merck") з використанням рухомих систем розчинників хлористий метилен-ацетон-оцтова кислота (95:5:2) [1, 2]. Як проявник використовували УФ-світло, визначаючи значення  $R_f$  кеторолаку та отриманого продукту.

Дослідження за допомогою ВЕРХ проводили на рідинному хроматографі "Hewlett Packard" HP 1100 з діодно-матричним детектором на колонці Supelcosil ABZ розміром 250 · 4,6 мм з розміром часток 5 мкм. Як рухома фаза використовували систему ацетонітрил — 0,002 М розчин сірчаної кислоти (40:60), швидкість рухомої фази — 1,5 мл/хв. Температура термостату колонки — 30°C. Детектування проводили при довжині хвилі 312 нм. Вводили по 20 мкг стандартного розчину кеторолаку, розчину ПЕК (окремо) та суміш даних розчинів. На рис. 3 наведена ВЕРХ-хроматограма суміші розчинів кеторолаку та ПЕК.

**Результати та їх обговорення**

У результаті проведених досліджень кеторолаку методом ГРХ було розроблено методику ідентифікації та кількісного визначення препарату за

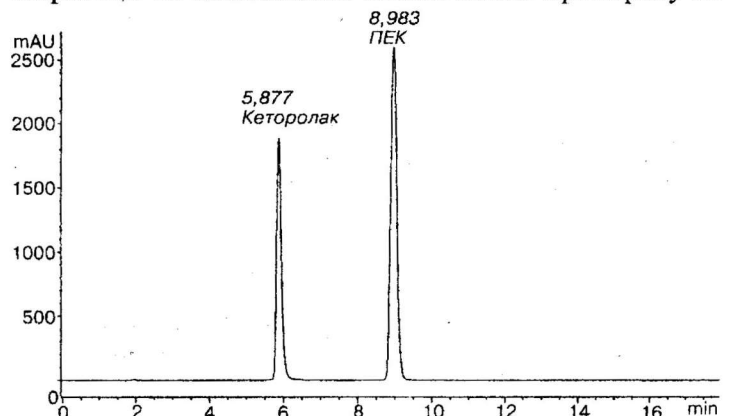


Рис. 3. ВЕРХ-хроматограма суміші розчинів кеторолаку та ПЕК.

Таблиця  
Результати кількісного аналізу  
кеторолаку методом ГРХ

Вміст кеторолаку в 1 мл розчину, мкг	Знайдено кеторолаку		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
1,00	1,02	102,0	$\bar{X}=100,23\%$ $S=1,43$ $S_{\bar{x}}=0,58$ $\Delta X=1,50$ $\epsilon=1,50\%$ $\bar{X} \pm \Delta X = 100,23 \pm 1,50\%$
5,00	4,98	99,60	
10,00	9,99	99,90	
20,00	20,05	100,25	
50,00	49,60	99,20	
100,00	100,44	100,44	

продуктом взаємодії його зі спиртом метиловим при нагріванні у присутності каталізатора, яка дозволяє визначати від 1 мкг до 100 мкг кеторолаку у 1 мл розчину.

Було встановлено, що межа визначення кеторолаку методом ГРХ становить 0,5 мкг/мл. Відносна помилка методики кількісного визначення препарату становить  $\pm 1,50\%$ .

Визначено відносний час утримання метилового ефіру кеторолаку, який становить близько 1,4 (час утримання ментилового ефіру ізовалеріанової кислоти прийнято за 1).

Проведеними дослідженнями отриманого продукту взаємодії кеторолаку зі спиртом метиловим методами ТШХ встановлено, що значення  $R_f$  для кеторолаку складає 0,29, а для отриманої сполуки — 0,56. За результатами ВЕРХ-хроматографування індивідуальних речовин та суміші розчинів кеторолаку та ПЕК встановлено, що час утримання кеторолаку становить 5,9 хв, а отриманої сполуки — 9,0 хв. Все це доводить, що отримана у результаті взаємодії препарату зі спиртом метиловим сполука не є кеторолаком.

При використанні хроматографічних методів дослідження (за показниками  $R_f$  та  $t'_R$ ) встановлено, що в процесі етерифікації кеторолак практично на 100% переходить в ПЕК.

#### ВИСНОВКИ

1. Розроблено методику ідентифікації та кількісного визначення кеторолаку методом ГРХ за продуктом його взаємодії зі спиртом метиловим, яка дозволяє визначати від 1 мкг до 100 мкг кеторолаку в 1 мл розчину. Відносна помилка визначення складає  $\pm 1,50\%$ , а межа визначення становить 0,5 мкг/мл.

2. За допомогою ТШХ та ВЕРХ встановлено, що значення  $R_f$  та  $t'_R$  одержаної сполуки та кеторолаку не співпадають. Встановлено, що в процесі етерифікації кеторолак практично на 100% переходить в ПЕК.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Бондар В.С., Болотова О.В. // Вісник фармації. — 2002. — №3 (27). — С. 30-33.
2. Бондар В.С., Болотова О.В. // Фізіологічно активні речовини. — 2002. — №2 (34). — С. 41-44.
3. Еремін С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В. Анализ наркотических средств. — М.: Мысль, 1993. — 272 с.
4. Лебедева Р.Н., Никода В.В., Петров Р.О. // Анестезиология и реаниматология. — 1995. — №1. — С. 29-31.
5. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Пособие в 2-х частях. — Х.: Торсинг, 1997. — Т. 1. — 590 с.
6. Пецев Н., Коцев Н. Справочник по газовой хроматографии. — М.: Мир, 1987. — 260 с.
7. Bobbit J.M., Schwarting A.R. Introduction to Chromatography. — New-York, 1980. — 201 p.
8. Brandl M., Conley D., Johnson D. // J. Pharm. Sci. — 1995. — №84 (9). — P. 1045-1048.
9. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. // Ed. — London: The pharmaceutical Press, 1986. — 1223 p.
10. Gales B.I., Gales M.A. // Ann. Pharmacother. — 1995. — №29 (12). — 1299 p.
11. Granados-Soto V., Flores-Murrieta F.J. // Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. — 1995. — №17 (8) — P. 535-538.
12. Logan B.K., Friel P.N., Peterson K.L., Predmore D.B. // J. Anal. Toxicol. — 1995. — №19 (2). — P. 61-64.
13. Strom B.L., Berlin I.A., Kinman I.I. et al. // JAMA. — 1996. — №275 (5). — P. 376-382.
14. USP 23. The United States Pharmacopoeia. Official from 1.01.95. — The United States Pharmacopoeia Convention // NC. — 1994. — 2391 p.
15. Vakily M., Corrigan B., Jamali F. // Pharm. Res. — 1995. — №12 (11). — P. 1652-1657.

УДК 615.9:615.211:543.544.45

ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД ОБНАРУЖЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЕТОРОЛАКА  
В.С.Бондарь, О.В.Болотова

Разработана методика идентификации и количественного определения кеторолака методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) по продукту его взаимодействия со спиртом метиловым. С помощью хроматографии в тонких слоях сорбента (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) установлено, что значения  $R_f$  и относительное время удерживания ( $t'_R$ ) полученного соединения и кеторолака не совпадают. Установлено, что в процессе этерификации кеторолак практически на 100% переходит в продукт этерификации кеторолака (ПЭК).

UDC 615.9:615.211:543.544.45

GAS CHROMATOGRAPHIC DETECTION METHOD AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF KETOROLAC  
V.S.Bondar, O.V.Bolotova

The technique for identification and quantitative determination of ketorolac by gas-liquid chromatographic (GLC) method on a product of its interaction with methyl alcohol has been developed. With the help of thin layers chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC) have been established that the meanings of  $R_f$  and retention time ( $t'_R$ ) of the received compound and ketorolac do not coincide. We have underlined that in etherification process ketorolac practically on 100% changes in a product of ketorolac etherification (PKE).