

Рекомендована д.ф.н., професором В.С.Бондарем

УДК 615.246.8:615.9:54.062.543.544.44

## ЗАСТОСУВАННЯ ТОНКОШАРОВОЇ ТА ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ І КОЛЬОРОВИХ РЕАКЦІЙ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ЛОПЕРАМІДУ ТА ЙОГО КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

В.В.Болотов, В.Г.Ткаченко

Національний фармацевтичний університет

Запропоновані методи тонкошарової, високоефективної рідинної хроматографії та кольорові реакції для визначення лопераміду, які дають можливість ідентифікувати препарат. Розроблена методика кількісного визначення лопераміду за методом високоефективної рідинної хроматографії. Методика дозволяє визначити препарат при його вмісті в пробі від 0,002 мкг/мл до 202 мкг/мл. Відносна помилка методу складає  $\pm 1,21\%$ .

Лоперамід (лопераміду гідрохлорид) — 4-[4-(4-хлорфеніл)-4-гідроксипіперидино]-N,N-диметил-2,2-дифенілбутирамід гідрохлорид [6] є  $\mu, \sigma$ -агоністом опіатних рецепторів і застосовується в якості симптоматичного засобу для лікування гострої та хронічної діареї [2, 4, 10]. Препарат належить до сильнодіючих засобів. При оральному застосуванні у щурів LD<sub>50</sub> лопераміду складає 249 мг/кг, у мишей — 149 мг/кг [14]. Описані численні випадки отруєння цим препаратом, особливо у дітей [3, 5, 7, 11-13]. Методи виявлення лопераміду, виділеного з біологічного матеріалу, розроблені недостатньо. У роботі [9] описано метод ВЕРХ лопераміду та його диметильованих метаболітів у плазмі і сечі з використанням мас-спектроскопічного детектора.

Метою нашої роботи є розробка умов виявлення лопераміду в присутності інших лікарських препаратів, які можуть застосовуватись разом з ним, за допомогою хроматографії в тонких шарах сорбенту (ТШХ), високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та кольорових реакцій, розробка умов кількісного визначення лопераміду методом ВЕРХ. Нами розроблена методика ВЕРХ для виявлення та кількісного визначення лопераміду з використанням УФ-детектора та інших умов хроматографування.

### Експериментальна частина

У ролі тонких шарів у методі тонкошарової хроматографії використовували пластинки для високоефективної тонкошарової хроматографії

(ВЕТШХ) виробництва Естонії (сорбент КСКГ, фракція —  $5\pm 20$  мкм, товщина шару —  $130\pm 25$  мкм, розмір пластинок —  $10 \cdot 10$  см), пластинки Силуфол UV-254, пластинки Сорбфіл (силікагель СТХ-1А, тип основи — ПТСХ-П-А), скляні пластинки фірми "Merck" (Німеччина) (силікагель GF-254, розмір пластинки —  $10 \times 10$  см).

Хроматографування проводили в камері об'ємом 500 см<sup>3</sup>, в яку вносили 50 мл систем розчинників. Камеру насичували протягом 30 хв. Пластинки активували нагріванням при 110°C протягом 30 хв. На лінію старту на відстані 2 см від краю пластинки наносили зразки лопераміду та інших препаратів (0,01% розчин у хлороформі), які містили від 1 мкг до 100 мкг препарату. Довжина шляху пробігу розчинників складала 8 см. У ролі проявників використовували пари йоду (бурі плями), послідовну обробку 0,3 М розчинами міді сульфату та калію йодиду (бурі плями). При застосуванні систем розчинників нейтрального характеру пластинки перед нанесенням досліджуваних розчинів спочатку обприскували 0,1 М розчином калію гідроксиду в метанолі.

ВЕРХ лопераміду гідрохлориду виконували на мікроколунковому рідинному хроматографі Hewlett-Packard з використанням наступних умов: колонка розміром 4,6X150 мм була заповнена сорбентом з оберненою фазою Eclipse XDB-C8, 5,0 мкм. Хроматографування проводили в ізократичному режимі. Рухома фаза: вода — ацетонітрил — триетиламін — кислота ортофосфорна (100:99:0,5:0,5); температура колонки — 30°C, швидкість рухомої фази — 1 мл/хв.; УФ-детектор — діодноматричний, довжина хвилі — 214 нм. Об'єм проби, що вводилась, складав 10 мкл.

### Результати та їх обговорення

Результати хроматографічних досліджень наведені в табл. 1. Дані цієї таблиці свідчать, що для розділення лопераміду та вказаних вище препаратів найбільш підходять наступні системи розчинників для пластинок: Сорбфіл — 7, Силуфол — 1,3,7, Merck — 4 та ВЕТШХ — 7. Найчутливішим

Таблиця 1

Значення  $R_f \times 100$  для лоперамідів та деяких інших препаратів у системах розчинників на різних тонких шарах

Тонкі шари	Системи розчинників	Препарат				
		Лоперамід	Новокаїн	Димедрол	Галоперидол	Атропін
Сорбфіл	1	78	70	65	71	38
	2	79	75	81	80	43
	3	73	57	63	61	20
	4	52	37	52	46	9
	5	75	64	55	71	16
	6	55	33	48	50	31
	7	63	51	43	49	25
	8	70	39	35	67	24
	9	78	63	57	74	47
Силуфол	1	44	43	28	20	8
	2	43	36	46	40	9
	3	84	46	67	63	4
	4	41	15	33	31	3
	5	44	40	31	44	9
	6	19	10	16	18	16
	7	43	24	20	38	14
	8	81	24	49	86	16
	9	64	36	54	61	30
ВЕТШХ	1	76	74	70	73	44
	2	68	62	68	64	20
	3	82	72	78	80	24
	4	70	46	63	55	11
	5	72	65	54	67	15
	6	71	47	59	66	52
	7	71	56	34	64	30
	8	91	71	80	86	68
	9	79	64	60	70	53
Merck	1	83	71	64	77	32
	2	42	36	28	34	8
	3	80	55	61	72	9
	4	50	30	38	39	6
	5	64	52	36	64	9
	6	46	30	39	44	32
	7	63	48	36	59	22
	8	89	51	64	86	49

Примітка. Системи розчинників: 1 — метанол — аміак (100:1,5); 2 — хлороформ — метанол (90:10); 3 — хлороформ — гексан — етанол (1:1:1); 4 — хлороформ — гексан — етанол (1:2:1); 5 — етилацетат — метанол — ацетон — вода (25:10:10:5); 6 — хлороформ — метанол — кислота мурашина (50:50:1); 7 — метанол — ацетон — кислота мурашина (50:50:1); 8 — ізопропанол — кислота оцтова — етилацетат — вода (5:2:1:3); 9 — розчин амонію ацетату\* — діоксан — метанол (20:40:40).  
\*Розчин амонію ацетату готували за наступною методикою: 150,0 г в амонію ацетату розчиняли в 1,000 л води очищеної та додавали 3,0 мл льодяної оцтової кислоти.

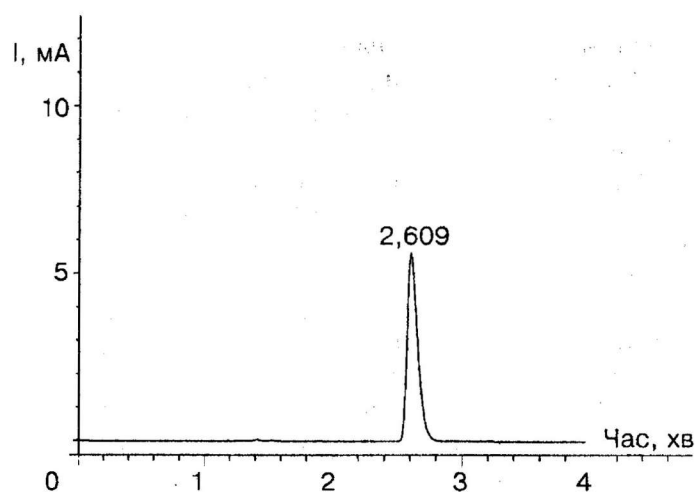


Рис. 1. Хроматограма лопераміду, отримана методом ВЕРХ.

проявником є реактив Драгендорфа, модифікований за Муньє, (межа виявлення на пластинках Сорбфіл і Мерск — 0,25 мкг).

Вказані умови хроматографування дозволили отримувати гострі симетричні піки лопераміду ( $K 1,294$  асиметрії). Типова хроматограма лопераміду представлена на рис. 1. За допомогою методу ВЕРХ нами також була розроблена методика кількісного визначення лопераміду. Градувальний графік, одержаний за методом абсолютної калібровки і представлений на рис. 2, свідчить, що пряма залежність між площею піку і концентрацією існує в межах від 0,002 мкг/мл до 202 мкг/мл.

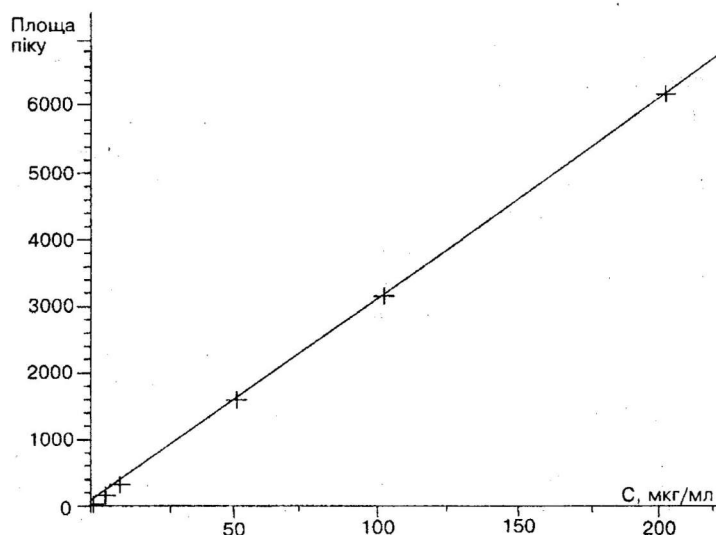


Рис. 2. Градувальний графік для кількісного визначення лопераміду в розчинах методом ВЕРХ.

Для розрахунку вмісту лопераміду в розчинах користувались градувальним графіком (рис.2) або рівнянням прямої, яке було розраховане за допомогою методу найменших квадратів [1]:  $Y=30,26C+95,36$ , де:  $Y$  — площа піку,  $C$  — вміст лопераміду в 1 мл розчину, мкг. Результати кількісного визначення лопераміду в розчинах за допомогою наведеної методики представлені в табл. 2. Дані цієї таблиці свідчать що, відносна помилка

Таблиця 2

Результати кількісного визначення лопераміду в розчинах методом ВЕРХ

Концентрація лопераміду в пробі, мкг/мл	Площа піку	Знайдено лопераміду		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
1,02	31,9	0,99	97,74	$\bar{X}=99,62$ $S=1,15$ $S_x=0,47$ $\Delta X=1,21$ $\varepsilon=1,21\%$ $\bar{X} \pm \Delta X = 99,62 \pm 1,21$
5,11	159,2	5,05	98,87	
10,22	321,2	10,22	100,00	
51,10	1599,3	51,01	99,81	
102,20	3157,8	103,18	100,96	
202,40	6197,6	203,13	100,36	

Таблиця 3

Кольорові реакції лопераміду та інших препаратів

Препарат	Забарвлення з реактивом (чутливість реакції, мкг)						
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	HNO <sub>3</sub>	Ердмана	Фреде	Манделіна	Маркі	Лібермана
Лоперамід	жовте (100)	—	жовте (100)	—	зелене (50)	—	буро-жовте (50)
Новокаїн	—	—	жовте (10)	—	червоне → жовто-коричневе (10)	—	—
Димедрол	оранжеве (5)	—	—	—	жовте (10)	жовте (10)	коричнево-оранжеве (10)
Галоперидол	—	—	—	—	—	—	коричневе (5)
Атропін	—	—	—	—	—	—	червоно-оранжеве (10)

Примітка. Знак → означає перехід забарвлення; (—) — відсутність забарвлення.

визначення середнього результату становить  $\pm 1,21\%$ .

Ми також вивчили метод визначення лопераміду за допомогою кольорових реакцій. Для пошуку таких реакцій використовували ряд реактивів, які часто застосовуються в аналізі алкалоїдів та азотовмісних органічних речовин [8]. Результати цих досліджень наведені в табл. 3.

При проведенні кольорових реакцій використовували білі порцелянові чашки або пластинки із заглибленнями, в які вносили хлороформні розчини лопераміду та інших речовин, які містили від 1 мкг до 100 мкг препаратів у пробі. Розчинник повністю випарювали (див. табл. 3), за допомогою скляної палички додавали краплю відповідного реактиву, розчин перемішували і спостерігали забарвлення. Крім того, для виконання кольорових

реакцій використовували пластинки для тонкошарової хроматографії, на які наносили розчин лопераміду та інших лікарських препаратів (0,1-10 мкг).

Чутливість кольорових реакцій на пластинках для ТШХ збільшується (можна визначити 0,5 мкг препарату в плямі).

#### ВИСНОВКИ

1. Вивчені умови виявлення лопераміду за допомогою хроматографії в різних тонких шарах сорбенту та кольорових реакцій.

2. Розроблені умови та проведено якісне та кількісне визначення лопераміду методом ВЕРХ.

3. Доведено, що зазначені умови можуть бути використані для виявлення лопераміду в присутності ряду лікарських препаратів, які можуть застосовуватись разом з ним.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Алесковский В.Б., Бардин В.В., Бойчинова Е.С. *Физико-химические методы анализа*. — Л.: Химия, 1988. — 376 с.
2. Машковский М.Д. *Лекарственные средства: Пособие по фармакотерапии для врачей в 2-х ч.* — Х.: Торсинг, 1997. — Т. 1. — 544с.
3. Anon A. // *Lancet*. — 1990. — Vol. 335. — P. 1394.
4. Awouters F., Megens A., Verlinden M. et al. // *Dig. Dis. Sci.* — 1993. — Vol. 38, №6. — P. 977-995.
5. Bhutta T.I., Tachir K.I. // *Lancet*. — 1990. — Vol. 335. — P. 363.
6. *British Pharmacopoeia*. — London, 1999. — Vol. 1. — P. 883.
7. Chow C.B., Li S.H., Leung N.K. // *Acta. Pediatr. Scand.* — 1986. — Vol. 75, №3. — P. 1034-1036.
8. *Clarcke's isolation and identification of drugs in pharmaceutical body fluids and post-mortem material*. — London: The Pharm. Press, 1986. — 1223 p.
9. Ganssmann B., Klingmann A., Burhenne J. et al. // *J. Chromatographia*. — 2001. — Vol. 53, №11/12. — P. 656-660.
10. Giagnoni G., Casiraghi L., Senini L. et al. // *Life Sci.* — 1983. — Vol. 33, №9. — P. 315-318.
11. Minton N.A., Smith P.G. // *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)*. — 1987. — Vol. 294. — P. 1383.
12. Saunders Ph. // *Lancet*. — 1991. — Vol. 338. — P. 438.
13. Shwartz R.H., Rodrigues W.J. // *J. Paediatr.* — 1991. — Vol. 118, №10. — P. 56-57.
14. Sohji Y., Kawashima K., Nakamura H., Shimizu M. // *Nippon Yakurigaku Zasshi*. — 1978. — Vol. 74, №1. — P. 145-154.

УДК 615.246.8:615.9:54.062.543.544.44

ПРИМЕНЕНИЕ ТОНКОСЛОЙНОЙ И ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ, ЦВЕТНЫХ РЕАКЦИЙ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛОПЕРАМИДА

В.В.Болотов, В.Г.Ткаченко

Предложены методы тонкослойной, высокоэффективной жидкостной хроматографии и цветных реакций для определения лоперамида, которые дают возможность идентифицировать препарат. Разработана методика количественного определения лоперамида методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Методика позволяет определить препарат при его содержании в пробе от 0,002 мкг до 202 мкг. Относительная ошибка метода составляет  $\pm 1,21\%$ .

UDC 615.246.8:615.9:54.062.543.544.44

APPLICATION OF THIN LAYER AND HIGHLY EFFECTIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY, COLORED REACTIONS FOR OBTAINING AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF LOPERAMIDE

V.V.Bolotov, V.G.Tkachenko

The methods of thin-layer highly effective liquid chromatography and colored reactions for determination of loperamide have been suggested. We have worked out the method of loperamide quantitative determination highly effective liquid chromatography method. The method allows us to determine the preparation in a sample with its content from 0,002 mkg to 202 mkg. The relative error of the method is  $\pm 1,21\%$ .