

УКРАЇНСЬКИЙ МЕДИЧНИЙ АЛЬМАНАХ

Том 15, № 5 (додаток), 2012

ЗАСНОВАНИЙ У 1998 РОЦІ

Адреса редакції:

91045, м. Луганськ, кв. 50 років
Оборони Луганська, 1

Телефон/факс:

(0642) 53-20-36

rector@lsmu.lg.ua

Телефон:

(0642) 63-02-55

**Літературні редактори
і коректори:**

Т.В. Сівач
Д.А. Астраханцева

**Художній редактор
і комп'ютерний дизайн,
оригінал-макет:**

А.В. Єршомін
Є.Ю. Шутов

Засновники:

Міністерство охорони здоров'я
України,
Луганський державний медичний
університет

Журнал зареєстрований
Міністерством інформації України
Свідоцтво про реєстрацію
КВ № 3006

Журнал зареєстрований
ВАК України:
"Бюлетень ВАК України"
№ 5, 2009 р.

Рекомендовано до друку Вченою
радою Луганського державного
медичного університету (протокол
№ 10 від 04.10.2012 р.)

Підписано до друку 05.10.2012 р.
Формат 60x84,8. Папір офсетний.
Наклад 350 прим.
Видавництво ЛДМУ
м. Луганськ

Підписний індекс 06487

Головний редактор:

В.К. Івченко (Луганськ)

Редакційна колегія:

А.А. Бабанін (Сімферополь), І.Р. Барияк (Київ), Ю.М. Вовк (Луганськ), Ю.М. Вороненко (Київ), В.Т. Германов (Луганськ), О.П. Гудзенко (Луганськ), Н.К. Казимірко (Луганськ), С.А. Кашенко (Луганськ), Л.Я. Ковальчук (Тернопіль), В.Г. Ковешніков (Луганськ), А. Książek (Люблін, Польща), В.М. Мороз (Вінниця), О.А. Орлова (Луганськ), В.П. Пішак (Чернівці), Ю.Г. Пустовий (Луганськ), Л.В. Савченкова (Луганськ), В.М. Фролов (Луганськ), В.П. Черних (Харків), В.О. Шаповалова (Харків), Є.Ю. Шутов (Луганськ) – відповідальний секретар

Редакційна рада:

Ю.Г.Бурмак (Луганськ), І.Б. Єршова (Луганськ), Л.М. Іванова (Луганськ), С.Є. Казакова (Луганськ), М.П. Ковальський (Київ), Ю.М. Колчін (Луганськ), І.О. Комаревцева (Луганськ), І.В. Лоскутова (Луганськ), В.Д. Лук'янчук (Луганськ), Т.В. Мироненко (Луганськ), М.П. Павловський (Львів), А.М. Петруня (Луганськ), Л.Л. Півський (Луганськ), М.С. Пономаренко (Київ), В.Г. Радіонов (Луганськ), О.С. Решетнікова (Луганськ), Л.Д. Савенко (Луганськ), В.В. Сімрок (Луганськ), Т.П.Тананакіна (Луганськ), С.О. Тихонова (Харків), В.М. Толочко (Харків), З.М. Третьякєвич (Луганськ), С.А. Усатов (Луганськ), В.В. Флетонтова (Луганськ), В.В. Шаповалов (Харків), В.М. Шимон (Ужгород), Л.О. Шкондія (Луганськ).



Журнал є фаховим виданням для публікації основних
результатів дисертаційних робіт у галузі медичних наук
(Постанова Президії ВАК України від 27 травня 2009 р. № 1-05/2) і
фармацевтичних наук (Постанова президії ВАК України від 10
лютого 2010 р. №1-05/1)

УДК: 615.218.2:543.857.6

© Болотов В.В., Мирошниченко Ю.О., Клименко Л.Ю., Ахмедов Е.Ю., 2012

ЗАСТОСУВАННЯ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ В АНАЛІЗІ КЕТОТИФЕНУ

Болотов В.В., Мирошниченко Ю.О., Клименко Л.Ю., Ахмедов Е.Ю.

Національний фармацевтичний університет

Вступ. Кетотифен – 4,9-дигідро-4-(1-метил-4-піперидилден-10Н)-бензо[4,5]-циклогепта[1,2-b]гіофен-10-он – препарат антигістамінної дії, що застосовується для лікування бронхіальної астми, алергійних бронхітів, сінної лихоманки, алергійних ринітів, алергійних шкірних реакцій. Проте, потрібно зазначити, що препарат може чинити виражену седативну дію, посилювати дію снодійних та антипсихотичних препаратів, алкоголю [10 – 14]. Відомі випадки отруєнь цим препаратом, проте методи його хіміко-токсикологічного аналізу розроблено недостатньо [4, 5, 7, 8].

На сьогодні для діагностики отруєнь у хіміко-токсикологічному аналізі широко використовують метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), який знайшов застосування і в аналізі кетотифену [3, 4, 6, 8, 14].

Недоліком традиційного застосування ВЕРХ є відсутність уніфікації, що призводить до розробки для кожної речовини своєї «унікальної методики» [9]. 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» [2].

Як хроматографічну систему в роботі, що цитується, запропоновано використовувати хроматограф «Міліхром А-02» (Новосибірськ, ЗАТ «ЕкоНова»), колонку розміром $\varnothing 2 \times 75$ мм з оберненою фазою ProntoSIL – 120 – 5 – C18 AQ («Bischoff Analysetechnik und Geräte GmbH», Німеччина), що має ефективність не менше 5000 теоретичних тарілок. Градієнтне елюювання виконують змішуванням двох елюентів: елюент А – [4 М LiClO₄ – 0,1 М HClO₄] – H₂O (5:95), елюент Б – ацетонітрил «для ВЕРХ». ВЕРХ-аналіз виконують в таких умовах: швидкість потоку – 100 мкл/хв.; елюювання – лінійний градієнт від 5% до 100% 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 пропорційні абсорбції речовини. Для кожної речовини розраховують 7 характерних но-

рмованих спектральних параметрів – відношення площі піків при довжинах хвиль $\lambda_2 - \lambda_8$ 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 [2].

У роботі поставлено за мету спробувати використати зазначену хроматографічну систему для ідентифікації та кількісного визначення кетотифену.

Матеріали та методи. В роботі використовували кетотифен фармакопейної чистоти. Як розчинник використовували 0,01 М розчин кислоти хлористоводневої.

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.

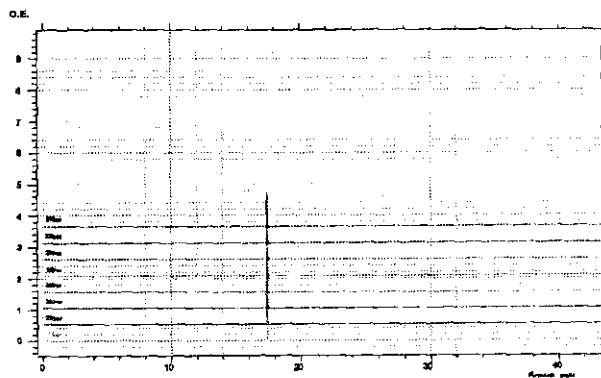


Рис. 1. Хроматограма розчину кетотифену, що отримана за методом ВЕРХ

Побудова градуовального графіка для кількісного визначення кетотифену методом ВЕРХ. 100 мг кетотифену вносили в мірну колбу місткістю 100,0 мл, розчиняли в 10,00 мл 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої 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 0,01 М розчином кислоти хлористоводневої 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 0,01 М розчином кислоти хлористоводневої 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 0,01 М розчином кислоти хлористоводневої 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 0,01 М розчином кислоти хлористоводневої (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 0,01 М розчином кислоти

хлористоводневої (розчин 7, концентрація 1 мкг/мл).

Розчини кетотифену 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.

Результати та їх обговорення. Основні хроматографічні параметри кетотифену при визначенні методом ВЕРХ за зазначеною методикою наведено в табл. 1, а типова хроматограма – на рис. 1.

Таблиця 1. Основні хроматографічні параметри кетотифену при визначенні методом ВЕРХ

| t _R | V _R | R (S ₁ / S ₂₁₀) | | | | | | | |
|----------------|----------------|--|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | 210нм 210нм | 220нм 210нм | 230нм 210нм | 240нм 210нм | 250нм 210нм | 260нм 210нм | 280нм 210нм | 300нм 210нм |
| 17,747 | 1774,7 | 1,00000 | 0,66715 | 0,59470 | 0,33463 | 0,18163 | 0,18300 | 0,42174 | 0,64478 |

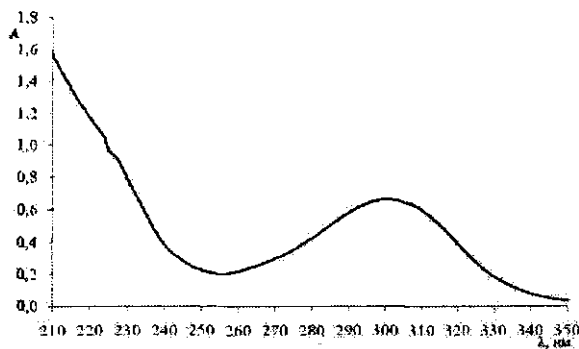


Рис. 2. УФ-спектр розчину кетотифену (концентрація 40 мкг/мл)

При цьому встановлено, що мінімальна концентрація кетотифену в розчині, що можна визначити за допомогою наведеної методики, становить 1 мкг/мл, що відповідає вмісту речовини у введеному об'ємі проби 2 нг.

Таблиця 2. Метрологічна характеристика градувальної залежності площі піку від вмісту кетотифену (y = bx + a), отриманої методом ВЕРХ (λ = 300 нм; об'єм проби 2 мкл)

| r | b | a | S ² | Δb | Δa |
|--------|-----------|------------|----------------|-------------|-----------|
| 0,9997 | 0,0002816 | 0,00004008 | 0,0000009818 | 0,000003476 | 0,0005878 |

Після перевірки значущості коефіцієнта a в рівнянні (1) було зроблено висновок про неможливість переходу до рівняння виду y = b'x [1].

Площа піку розчинів кетотифену лінійно залежить від їх концентрації в діапазоні кон-

центрацій від 1 мкг/мл до 400 мкг/мл, що відповідає вмісту речовини у пробі від 2 нг до 800 нг відповідно.

Результати кількісного визначення кетотифену [1] в модельних розчинах за допомогою розробленої методики наведено в табл. 3.

Метрологічну характеристику отриманої градувальної залежності наведено в табл. 2.

$$S = 0,0002816 \cdot C + 0,00004008, (1)$$

де S – площа піку розчину кетотифену;

C – концентрація розчину кетотифену, мкг/мл.

Таблиця 3. Результати кількісного визначення кетотифену методом ВЕРХ у модельних розчинах (λ = 260 нм; об'єм проби 2 мкл)

| Концентрація розчину кетотифену, мкг/мл | Площа піку | Знайдено кетотифену | | Метрологічна характеристика (n = 5; P = 0,95) |
|---|------------|---------------------|--------|--|
| | | мкг/мл | % | |
| 2,0 | 0,0005900 | 1,95 | 97,50 | X = 101,40 S = 3,19 S _x = 1,43 ΔX = 3,96 ε = ±3,91% X ± ΔX = 101,40 ± 3,96 |
| 4,0 | 0,001204 | 4,13 | 103,25 | |
| 40,0 | 0,01187 | 42,01 | 105,03 | |
| 100,0 | 0,02782 | 98,65 | 98,65 | |
| 400,0 | 0,1156 | 410,37 | 102,59 | |

З даних, наведених у табл. 3, випливає, що відносна невизначеність середнього результату при кількісному визначенні кетотифену методом ВЕРХ не перевищує $\pm 3,91\%$.

Висновки:

1. Встановлено основні хроматографічні параметри кетотифену – час та об'єм утримування, спектральні відношення. Встановлено,

що для аналізу кетотифену може бути застосована уніфікована методика з використанням ВЕРХ-аналізатора «Міліхром А-02».

2. Розроблено методику кількісного визначення кетотифену методом ВЕРХ, що можна застосовувати в діапазоні концентрацій від 1 мкг/мл до 400 мкг/мл; відносна невизначеність середнього результату не перевищує $\pm 3,91\%$.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Доерфель К. Статистика в аналитической химии / К. Доерфель; пер. с нем. под ред. В. В. Налимова. – М.: Мир, 1969. – 223 с.
2. Перспективы применения высокоэффективной жидкостной хроматографии в скрининговом анализе / Г. И. Барам, В. В. Болотов, Б. Н. Изотов, Г. П. Петюнин, Н. П. Молибога, В. Ф. Першин // Журнал хроматографического товариства. – 2004. – Т. IV, №1. – С. 11 – 20.
3. Alali F. Q. Determination of ketotifen in human plasma by LC-MS / F. Q. Alali, B. M. Tashtoush, N. M. Najib // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2004. – V. 34 (1). – P. 87 – 94.
4. Analysis of pharmaceutical preparations containing antihistamine drugs by micellar liquid chromatography / C. Martinez-Algaba, J. M. Bermudez-Saldana, R. M. Villanueva-Camanas, S. Sagrado, M.J. Medina-Hernandez // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2006. – Feb. 13. – V. 40 (2). – P. 312 – 321.
5. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals body fluids and postmortem material. – 2nd ed. – London: The Pharm. Press, 1986. – 1200 p.
6. Determination of ketotifen and its conjugated metabolite in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study / X. Chen, D. Zhong, D. Liu, Y. Wang, Y. Han, J. Gu // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2003. – V. 17 (22). – P. 2459 – 2463.
7. El-Kousy, N.M. Determination of some antihistamine drugs by atomic-absorption spectrometry and

- colorimetric methods / N. M. El-Kousy, L. I. Bebawy // J. Pharm. Biomed. Anal. – 1999. – Vol. 20. – P. 671 – 679.
8. Elsayed, M.M. Development and validation of a rapid HPLC method for the determination of ketotifen in pharmaceuticals / M. M. Elsayed // Drug Dev. Ind. Pharm. – 2006. – V. 32 (4). – P. 457 – 461.
9. European Pharmacopoeia / Council of Europe. – 4th ed. – Strasbourg, 2002. – 2416 p.
10. Jonsson A. Fatal intoxication in a Swedish forensic autopsy material during 1992 – 2002 / A. Jonsson, P. Holmgren, J. Ahlner // Forensic Sci. Int. – 2004. – V. 143. – P. 53 – 59.
11. Koski A. Interaction of alcohol and drugs in fatal poisonings / A. Koski, I. Ojanpera, E. Vuori // Hum. Exp. Toxicol. – 2003. – May. – V. 22 (5). – P. 281 – 288.
12. Lahti R.A. Fatal alcohol poisoning: medicolegal practices and mortality statistics / R. A. Lahti, E. Vuori // Forensic Sci. Int. – 2002. – V. 126. – P. 203 – 209.
13. Lahti R.A. Fatal drug poisoning: medico-legal reports and mortality statistics / R. A. Lahti, E. Vuori // Forensic Sci. Int. – 2003. – V. 136. – P. 35 – 46.
14. Quantitation of antihistamines in pharmaceutical preparations by liquid chromatography with a micellar mobile phase of sodium dodecyl sulfate and pentanol / M. Gil-Agusti, L. Monferrer-Pons, J. Esteve-Romero, M. C. Garcsa-Alvarez-Coque // J. AOAC Int. – 2001. – Nov. – Dec. – V. 84 (6). – P. 1687 – 1694.

Болотов В.В., Мирошниченко Ю.О., Клименко Л.Ю., Ахмедов Е.Ю. Застосування високоєфективної рідинної хроматографії в аналізі кетотифену // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 5 (додаток). – С 40 – 42.

Запропоновано умови якісного аналізу кетотифену методом ВЕРХ, встановлено його основні хроматографічні параметри. Розроблено методику кількісного визначення кетотифену методом ВЕРХ; відносна невизначеність середнього результату не перевищує $\pm 3,91\%$.

Ключові слова: кетотифен, хіміко-токсикологічний аналіз, високоєфективна рідинна хроматографія

Болотов В.В., Мирошниченко Ю.А., Клименко Л.Ю., Ахмедов Э.Ю. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в анализе кетотифена // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 5 (додаток). – С 40 – 42.

Предложены условия качественного анализа кетотифена методом ВЭЖХ, установлены его основные хроматографические параметры. Разработана методика количественного определения кетотифена методом ВЭЖХ; относительная неопределенность среднего результата не превышает $\pm 3,91\%$.

Ключевые слова: кетотифен, химико-токсикологический анализ, высокоэффективная жидкостная хроматография

Bolotov V.V., Miroshnichenko Yu.O., Klimenko L.Yu., Ahmedov E.Yu. Application of high-performance liquid chromatography in the analysis of ketotifen // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 5 (додаток). – С 40 – 42.

The conditions for the qualitative analysis of ketotifen by HPLC method have been offered, its main chromatographic parameters have been determined. The method of the quantitative determination of ketotifen by HPLC method has been developed; a relative error of the method is $\pm 3,91\%$.

Key words: ketotifen, химико-токсикологический анализ, high-efficiency liquid chromatography