



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61040 (13) U
(51) МПК
G01N 30/02 (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ДОКСАЗОЗИНУ МЕТОДОМ ГАЗОРІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

1

(21) u201013843

(22) 22.11.2010

(24) 11.07.2011

(46) 11.07.2011, Бюл.№ 13, 2011 р.

(72) КОВАЛЬСЬКА ОЛЕНА ВАСИЛІВНА, МАМІНА
ОЛЕНА ОЛЕКСАНДРІВНА, БЕЗУГЛИЙ ПЕТРО
ОВКСЕНТІЙОВИЧ, БОНДАРЕНКО ЄВГЕН ЛЕОНІ-
ДОВИЧ

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІ-
ВЕРСИТЕТ

(57) 1. Спосіб визначення доксазозину методом
газорідинної хроматографії, що включає прове-
дження методу у відповідності з заданою темпера-
турною програмою, який **відрізняється** тим, що як

2

нерухому рідинну фазу використовують суміш 5 %
фенілдиметилполісилоксану, HP-5 0,25 мкм, а те-
мпературу колонки лінійно програмують наступним
чином: 180 °С протягом 2 хвилин з подальшим
зростанням температури до 220 °С зі швидкістю 10
°С у хвилину протягом 4 хвилин і витримуванням
220 °С протягом 2 хвилин, причому температура
випарника і детектора не перевищує 250 °С.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як
рухоому фазу використовують газ-носієй гелій зі
швидкістю подання у колонку 45,0 мл/хв.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що ана-
лізують водний розчин доксазозину з концентраці-
єю 1,25-10,0 мкг/мл.

Корисна модель відноситься до аналітичної
хімії, а саме до способів визначення доксазозину
методом газорідинної хроматографії і може засто-
совуватися для визначення зазначеної речовини у
фармацевтичному аналізі та при хіміко-
токсикологічних дослідженнях.

У сучасного населення України відмічається
зростання кількості захворювань серцево-судинної
системи. За даними МОЗ у 2010 році - 11 мільйонів
громадян вражені артеріальною гіпертензією, з
них 30 % - люди працездатного віку, що обумов-
лює підвищення вживання гіпотензивних препара-
тів.

Блокатори α_1 -адренорецепторів (доксазозин,
празозин, альфузазин та теразозин) широко за-
стосовуються у медичній практиці при лікуванні
артеріальної гіпертензії та гіпертрофії простати,
проте при передозуванні, самолікуванні ці препа-
рати можуть вражати серцево-судинну систему,
порушувати функції печінки та нирок, викликати
інтоксикацію організму, тому вибір високочутливих
методів дослідження доксазозину та інших блока-
торів α_1 -адренорецепторів, придатних для аналізу
фармацевтичних препаратів та біологічних об'єктів
на зазначені речовини, є актуальною пробле-
мою[1-3].

Існують способи визначення азотовмісних лі-
карських речовин, до яких належить доксазозин,
методом газорідинної хроматографії, але вони

мають певні недоліки, обумовлені використанням
різноманітних умов (колонок з сорбентом-носієм,
температурних режимів колонки, детектора і випа-
рника та швидкості надання газа-носія у колонку),
які не враховують індивідуальні властивості дослі-
джуваної речовини.

Відомий, наприклад, спосіб визначення нарко-
тичних речовин, похідних амфетаміну та бензодіа-
зепіну методом газорідинної хроматографії з вико-
ристанням газового хроматографу «Цвет 530»;
полум'яно-іонізаційного детектору; капілярної ко-
лонки з нерухомою рідинною фазою - SE-52 (полі-
силоксан). Температуру колонки згідно з відомим
способом лінійно програмують від 130 до 285°С зі
швидкістю 10°С у хв., при 285°С температурний
режим зберігається протягом 3 хв., а температура
випарника становить 270°С, детектора - 290°С [4].

До недоліків способу можна віднести високі
температури колонки та детектора, які не врахо-
вують температуру розкладу доксазозину - 289-
290°С, тому параметри ідентифікації та кількісного
визначення фрагментів доксазозину не будуть
відповідати результатам аналізу доксазозину у
нативній формі.

Відомий також спосіб визначення азотовмісних
лікарських речовин (ефедрину, кокаїну, папавери-
ну, стрихніну, кодеїну) при проведенні скринінго-
вих досліджень біологічного матеріалу (система
GB) з використанням капілярної колонки з нерухо-

(13) U

(11) 61040

(19) UA

мою рідинною фазою - 5 %-феніл-95 %-диметил-Р8Х. Температуру колонки лінійно програмують: 0,7 хв. при 90°C, від 90 до 240°C зі швидкістю 35°C у хв.; від 240 до 290°C зі швидкістю 8°C у хв.; від 290 до 325°C зі швидкістю 25°C у хв. [5].

До недоліків способу можна віднести високі температури колонки, які перевищують температуру розкладу доксазозину. Спосіб придатний лише для аналізу окремої групи речовин, що витримують високі температури.

Відомі способи визначення індивідуальних лікарських речовин (морфіну, кодеїну, промедолу, кетаміну, амітриптиліну, нортриптиліну) з використанням газового хроматографа HP-5890, мас-селективного детектору HP-5972 фірми «Hewlett Packard», кварцової капілярної колонки з нерухомою рідинною фазою - HP-5 0,25 мкм. Режим програмування температури колонки: початкова температура - 80°C протягом 1 хв., зростання температури від 80 до 300°C зі швидкістю 20°C у хв., при 300°C температурний режим зберігається протягом 5 хв. Температура випарника складає 250°C, детектора - 285°C [6-8].

До недоліків зазначених способів можна віднести придатність використаних газохроматографічних умов лише для аналізу індивідуальних азотовмісних лікарських речовин та окремих груп речовин без урахування індивідуальних властивостей доксазозину.

Завдання корисної моделі полягає у створенні нового способу визначення доксазозину методом газорідинної хроматографії, який шляхом вибору оптимальної температурної програми та збалансованої нерухомої рідинної фази у сукупності з рештою параметрів процесу запобігає руйнуванню та забезпечує достовірне, точне визначення доксазозину у пробах водного розчину з концентрацією 1,25-10,0 мкг/мл.

Поставлене завдання вирішується таким чином, що спосіб визначення доксазозину методом газорідинної хроматографії у відповідності з заданою температурною програмою на відміну від прототипу передбачає, що в якості нерухомої рідинної фази використовують суміш 5 %-фенілдиметилполісилоксан, HP-5 0,25 мкм, а температуру колонки лінійно програмують наступним чином: 180°C протягом 2 хвилин з подальшим зростанням температури до 220°C зі швидкістю 10°C у хвилину протягом 4 хвилин і витриманням 220°C протягом 2 хвилин, причому температура випарника і детектора становить 250°C.

Згідно з корисною моделлю в якості рухомої фази використовують газ-носії - гелій зі швидкістю подання у колонку 45,0 мл/хв.

У відповідності з корисною моделлю аналізують проби водного розчину доксазозину з концентрацією 1,25-10,0 мкг/мл.

Проведені авторами дослідження з вибору розчинників досліджуваної проби довели оптимальність використання водного розчину доксазозину з концентрацією 1,25-10,0 мкг/мл на відміну від етанольного та метанольного розчинів.

Всі параметри заявленого способу визначені експериментальним шляхом, а їх сукупність є новою, невідомою з джерел інформації.

Дослідами доведено, що при застосуванні заявленого способу на хроматографах спостерігаються симетричні піки доксазозину, час утримання складає $146,6 \pm 0,2$ с; межа виявлення - 0,15 мкг/мл; коефіцієнт симетрії - 1,04; число теоретичних тарілок - 2443 т.т.

Отримані дані підтверджують придатність запропонованої хроматографічної системи для проведення аналізу доксазозину методом газорідинної хроматографії (ефективність хроматографічної колонки перевищує 800 т.т.; коефіцієнт симетрії піків не перевищує 2,4).

Запропонований спосіб дозволяє ідентифікувати досліджувану речовину доксазозину у присутності інших блокаторів α_1 -адренорецепторів, які можуть застосовуватися при лікуванні гіпертонії: празозин ($189,0 \pm 0,2$ с), альфузазин ($177,5 \pm 0,3$ с), теразозин ($142,1 \pm 0,2$ с).

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином. Визначення доксазозину виконують при застосуванні газового хроматографа «Agilent 19091 J-413», капілярної колонки 30 м \times 320 мкм з нерухомою рідинною фазою - 5 %-фенілдиметилполісилоксан, HP-5 0,25 мкм; рухомої фази - газ-носія - гелію, який надається у колонку зі швидкістю - 45,0 мл/хв.

Детектування речовини проводять полум'яно-іонізаційним детектором, зі швидкістю надання водню - 40,0 мл/хв. Температуру колонки лінійно програмують: 2 хв. при 180°C; зростання температури від 180 до 220°C зі швидкістю 10°C у хв. протягом 4 хв.; при 220°C температурний режим зберігається протягом 2 хв. Температура випарника складає 250°C, детектора - 250°C.

Введення досліджуваної проби водного розчину доксазозину об'ємом 1-2 мкл дозування виконують за допомогою мікрошприца «Hamilton» місткістю 10 мкл (концентрація водних розчинів речовини складала 1,25-10,0 мкг/мл).

Кількісне визначення доксазозину проводять методом абсолютної калібровки за площею піків. Розрахунки вмісту доксазозину виконують за градувальним графіком, побудованим у залежності площі піків (S , мм²) від концентрації речовини (C , мкг/мл) з використанням стандартних розчинів із різним вмістом доксазозину. За одержаними середніми значеннями розраховують концентрацію доксазозину у випробуваному розчині.

Корисна модель ілюструється прикладом.

Приклад 1. 10,0 мг доксазозину вносили в мірну колбу місткістю 200,0 мл, розчиняли у воді та доводили об'єм розчину водою до позначки (розчин 1, концентрація 50 мкг/мл). У мірну колбу місткістю 10,0 мл вносили по 1,0 мл розчину 1.

Об'єми доводили водою до позначки (розчин 2, концентрація 5 мкг/мл), перемішували та хроматографували в умовах: газовий хроматограф «Agilent 19091 J-413», капілярна колонка 30 м \times 320 мкм з нерухомою рідинною фазою - 5 %-фенілдиметилполісилоксан, HP-5 0,25 мкм; рухома фаза - газ-носії - гелій, який надається у колонку зі швидкістю - 45,0 мл/хв. Детектування речовини проводили полум'яно-іонізаційним детектором, швидкість надання водню - 40,0 мл/хв.

Температуру колонки лінійно програмували: 2 хв. при 180°C; зростання температури від 180 до 220°C зі швидкістю 10°C у хв. протягом 4 хв.; при 220°C температурний режим зберігався протягом 2 хв.

Температура випарника складала 250°C, детектора - 250°C. Об'єм проби для введення в колонку - 1 мкл при застосуванні мікрошприца «Hamilton» місткістю 10 мкл.

На хроматограмі спостерігався симетричний пік доксазозину, час утримування складав 146,5 с; коефіцієнт симетрії - 1,02; число теоретичних тарілок - 2443 т.т., площа піку складала 1699,3 мм.

Кількісне визначення доксазозину проводили при застосуванні рівняння градувального графіку

$S=a+bC$, коефіцієнти регресії (а, в) якого були розраховані методом найменших квадратів, при цьому $S_{\text{доксазозину}}=59,8+334,6C$, коефіцієнт кореляції - 0,999.

Встановлено, що при використанні запропонованої хроматографічної системи у досліджуваній пробі визначено 4,89 мкг/мл доксазозину, що складало 97,8 % доксазозину у модельному розчині.

Враховуючи, що для кожної концентрації необхідно виконувати не менше 5 визначень, за наведеною вище методикою були проведені дослідження у модельних водних розчинах з концентрацією 5,0 мкг/мл. Результати досліджень наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Результати кількісного визначення доксазозину у модельних розчинах методом газорідинної хроматографії (n=5, P=95 %)

Вміст доксазозину у модельних розчинах, %	Метрологічні характеристики					
	\bar{X}	S^2	S	S_x	Δx	ϵ
97,7-101,7	99,74	4,66	2,16	0,82	2,01	2,02

Наведені в таблиці 1 дані свідчать про відтворюваність результатів визначення доксазозину за заявленим способом методом газорідинної хроматографії у модельних розчинах, що підтверджується метрологічними характеристиками (відносна невизначеність не перевищує $\pm 2,02$ %).

Таким чином, заявлений спосіб визначення доксазозину методом газорідинної хроматографії характеризується надійністю та відтворюваністю результатів аналізу в досліджуваних діапазонах концентрацій, отриманих за розробленими умовами.

Запропонований спосіб підтверджує придатність хроматографічної системи для аналізу доксазозину, дозволяє ідентифікувати його у присутності інших б локаторів арадренорецепторів та кількісно визначити вміст доксазозину у об'єктах дослідження методом абсолютної калібровки за площею піків.

Спосіб може бути запропонованим для впровадження в практику роботи бюро судово-медичної експертизи, токсикологічних та наркологічних центрів, клінічних лабораторій по вивченню лікарських речовин у біологічних об'єктах.

Джерела інформації:

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства - М.: ООО «Изд-во «Новая волна», 2010 - 1216 с.

2. Чазова И.Е. Комбинированная терапия артериальной гипертензии / И.Е. Чазова, Л.Г. Ратова // Сердце. - 2005. - Том 4, № 3. - с. 120-126.

3. Bakshi M. Validated specific HPLC methods for determination of prazosin, terazosin and doxazosin in presence of degradation products formed under ICH-recommended stress conditions / M. Bakshi, T. Ojha, S. Singh // J. Pharm. and Biomed. Anal. - 2004. - Vol. 34, № 1. - P. 19-26.

4. Идентификация ряда наркотических веществ в моче методом капиллярной газовой хроматографии / А.Н. Акалаев, М.Г. Шпагин, В.П. Шаболенко, А.Е. Коваленко // Судебно-мед. экспертиза. - 2004. - № 3. - с. 34-37.

5. Clarke E.J.C. Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material. - London: The Pharm.Press, 1986. - 1226 p.

6. Мелентьев А.Б. Определение морфина и кодеина в крови в виде их пропионовых эфиров методом газовой хроматографии - масс-спектрометрии // Журн. аналит. химии. - 2004. - Т. 59, № 6. - с. 637-641.

7. Мелентьев А.Б. Определение промедола (тримеперидина) и кетамина в крови методом газовой хроматографии - масс-спектрометрии // Журн. аналит. химии. - 2004 - Т. 59, № 6. - с. 637-641.

8. Мелентьев А.Б. Определение амитриптилина и нортриптилина в крови методом газовой хроматографии с масс-селективным детектором / А.Б. Мелентьев, С.С. Катаев, Е.П. Иванова // Судебно-мед. экспертиза. - 2007. - № 1. - с. 31-34.