



УКРАЇНА

(19) UA (11) 85940 (13) C2

(51) МПК (2009)

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/04 (2006.01)

A61K 31/137

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЕФЕДРИНУ У БІОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ

1

2

(21) а200707104

(22) 25.06.2007

(24) 10.03.2009

(46) 10.03.2009, Бюл.№ 5, 2009 р.

(72) МАМІНА ОЛЕНА ОЛЕКСАНДРІВНА, UA, БО-
ЛОТОВ ВАЛЕРІЙ ВАСИЛЬЄВИЧ, UA, БЕЗУГЛИЙ
ПЕТРО ОВКСЕНТІЙОВИЧ, UA, БАРАМ ГРИГОРІЙ
ЙОСИФОВИЧ, UA, ПЕРШИН ВОЛОДИМИР ФЕ-
ДОРОВИЧ, UA, КУЗНЕЦОВА СВІТЛАНА МАРТИ-
НІВНА, UA(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІ-
ВЕРСИТЕТ, UA

(56) UA 62664, A, 15.12.2003

UA 5670, U, 15.03.2005

UA 12044, U, 16.01.2006

Бодрина Д.Э., Еремін С.К., Чичуев Ю.А. Анализ
эфедрина и эфедрона в биологических объектах
хроматографическими методами. // Суд.-мед. экс-
пертиза-1994. -№ 1. -С.23-25

Pharmazie. - 2004. - V. 59. -No. 11. - P. 819-823

Хим.-фарм. журнал. - 1994. - № 1. - С.54-60

Фармация. - 1991. - №.1 - С.31-33

J. Pharm. and Biomed. Anal. - 2002. - V.29.- No. 1-2.
- P.291-298(57) 1. Спосіб визначення ефедрину у біологічному
матеріалі, що включає одержання проби з вмістом
ефедрин-основи шляхом екстрагування біологіч-
ного матеріалу після підлюговування хлорофор-
мом з наступним очищенням за допомогою тонко-

шарової хроматографії, дослідження такої проби з
використанням високоефективної рідинної хрома-
тографії при внесенні проби до колонки зі зворот-
но-фазним сорбентом, елююванні сумішшю роз-
чинників та подальшому детектуванні ефедрину,
який **відрізняється** тим, що при елююванні засто-
совують режим лінійного градієнту зі зміною від
елюенту з вмістом 10 % ацетонітрилу та 90% бу-
ферного розчину рН 2,8 з включенням іон-парного
реагенту до елюенту, що являє собою 100 % аце-
тонітрил, причому елюювання проводять протягом
25 хвилин, а детектування ефедрину здійснюють
принаймні за сімома довжинами хвиль, зокрема
210, 230, 240, 260, 280, 300 та 330 нм.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що для
одержання проби з вмістом ефедрин-основи як
біологічний матеріал використовують подрібнені
тканини печінки, причому до початку екстрагуван-
ня змінюють рН маси до значень основного харак-
теру шляхом додавання 25 % розчину амонію гід-
роксиду поряд з безводним натрію сульфатом,
здійснюють безперервне елюювання одержаної
сипкої маси, видаляють домішки з екстракту шля-
хом розчинення органічним розчинником, напри-
клад гексаном, а тонкошарову хроматографію
здійснюють у системі розчинників метанол-25%
розчин амонію гідроксиду при співвідношенні
100:1,5

Винахід відноситься до аналітичної хімії, а са-
ме до способів визначення ациклічного алкалоїду
ефедрину у біологічному матеріалі та може знайти
застосування для ідентифікації і кількісного визна-
чення зазначеної речовини у фармацевтичному
та хіміко-токсикологічному аналізі.

Ефедрину гідрохлорид відноситься до групи
симпатоміметиків, використовується при лікуванні
бронхіальної астми, для зниження кров'яного тис-
ку, в очній практиці. При передозуванні ефедрину
відмічається підвищення артеріального тиску, при-
скорення пульсу, сильне запаморочення, пору-
шення сну, тремор кінцівок, аритмія серця, дерма-

тити. Ефедрин викликає звикання, при
окислюванні ефедрину утворюється наркотична
речовина - ефедрон. Випадки отруєння ефедри-
ном супроводжуються розладом функцій серцево-
судинної системи організму з явищами систолічної
гіпертензії, порушеннями психики з
галюцинаціями. В організмі ефедрин активно
метаболізує з утворенням норефедрину,
фенілпропандіолу, бензойної і гіпурової кислот.

Існують способи визначення ефедрину за до-
помогою різних видів фізико-хімічного аналізу.
Відомий, наприклад, спосіб кількісного визначення
ефедрину в сечі з використанням екстракційної

(13) C2

(11) 85940

(19) UA

фотометрії при застосуванні сірковуглецю та аміачного розчину міді сульфату після виділення ефедрину-основи з сечі методом екстракції хлороформом [1].

До недоліків способу можна віднести його неспецифічність (заважає коніїн), крім того спосіб передбачає застосування бензолу для екстракції іонних асоціатів, який має велику токсичність. Спосіб неможливо застосовувати для аналізу сумішей отрут основного характеру з ефедрином та його метаболітами.

Відомий спосіб визначення ефедрину шляхом газорідинної хроматографії після екстракції ефедрину-основи з водної фази діетиловим етером після підлогування 10% розчином натрію гідроксиду [2].

Спосіб призначений для індивідуального аналізу ефедрину, без урахування можливості дослідження сумішей отрут основного характеру з ефедрином та його метаболітами.

Відомий також спосіб визначення ефедрину в сечі методом поляризаційної флюориметрії із застосуванням імуногенів [3].

Спосіб розроблений для індивідуального аналізу ефедрину без урахування можливості дослідження сумішей отрут основного характеру з ефедрином та його метаболітами. Спосіб передбачає наявність дорогокоштуючого обладнання та реактивів.

Відомий спосіб аналізування ефедрину в суміші речовин, близьких за будовою (група фенілалкамінів - ефедрону, норепфедрину, амфетаміну та метамфетаміну) за допомогою тонкошарової хроматографії (ТШХ). Хроматографування проводиться після екстракції ефедрину-основи та фенілалкамінів з сечі хлороформом або діетиловим етером після підлогування розчином натрію гідроксиду до рН 12-13 в системі етилацетат-метанол-25% розчин амонію гідроксиду (85:15:5), проявник -1,0 % розчин нингідрину в ацетоні [4].

Спосіб може застосовуватися для розділення, очищення та ідентифікації досліджуваних речовин, але він розроблений без урахування можливості дослідження отрут основного характеру, які можуть застосовуватися у суміші з ефедрином - алкалоїдів та синтетичних лікарських речовин.

Відоме також кількісне визначення ефедрину в суміші речовин, близьких за будовою (група фенілалкамінів - амфетаміну та метамфетаміну) імунохроматографічним способом [5]. Проте спосіб здійснюється з використанням дорогокоштуючого обладнання та реактивів.

Останнім часом широко використовується для аналізу токсичних речовин природного та синтетичного походження метод вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), який дозволяє ідентифікувати та визначити кількісно досліджувані речовини, як індивідуально, так і у сумішах з іншими речовинами, що викликають отруєння.

ВЕРХ - методики характеризуються різноманітністю умов хроматографування - використання сумішей різних органічних розчинників (ацетонітрил, метанол, діетиламін та ін.) і води або

буферних розчинів у різних співвідношеннях; застосування різних видів сорбентів (Hypersil OSD, Aluspher-RP select B, Waters X Terra RP is та ін.); зміни швидкості елюювання речовин, температурного режиму колонки та тиску насосу.

Відомий спосіб кількісного визначення (L)-ефедрину в суміші з (D)-псевдоефедрином ВЕРХ-методом (колонка із зворотньо-фазним сорбентом Hypersil OSD (160x4,5 мм), рухома фаза - суміш 0,6% фосфатного буферу (рН 6,5) з метанолом (3:8); флюоресцентне детектування). Хроматографування проводиться після твердофазної екстракції ефедрину-основи з крові з використанням патрону Сен-Пак C₁₈, з наступним елююванням з нього речовин етанолом та утворенням похідних з дансилхлоридом у 0,03% ацетонітрильному розчині триетиламіну [6].

Спосіб придатний для індивідуального аналізу ефедрину та псевдоефедрину без урахування можливості дослідження сумішей отрут основного характеру; методика характеризується наявністю дорогокоштуючого обладнання та реактивів.

Відомий спосіб кількісного визначення ефедрину гідрохлориду в суміші речовин, які застосовуються у краплях для носу - нафазоліном нітратом, оксиметазоліном гідрохлоридом та ксилметазоліном гідрохлоридом ВЕРХ-методом (колонка 125x4,0мм із зворотньо-фазним сорбентом Aluspher-RP select B, градієнтне елюювання речовин в колонці рухомою фазою - суміш водного розчину натрію гідроксиду (10^{-3} моль/л) та метанолу із зміною концентрації від 10об.% до 80об.%; детектування ультрафіолетовим (УФ)-детектором при 210, 224, 259 та 283нм [7].

Спосіб призначений для аналізу ефедрину гідрохлориду в суміші з похідними 2-імідазоліну: хроматографування проводиться у градієнтному режимі, а детектування виконано при довжинах хвиль, які відповідають лише максимумам поглинання досліджуваних речовин. Спосіб розроблено для дослідження лікарських речовин без урахування умов аналізу ефедрину у біологічних об'єктах та дослідження отрут основного характеру, які можуть застосовуватися у суміші з ефедрином - алкалоїдів та синтетичних лікарських речовин.

Відомий спосіб кількісного визначення ефедрину в суміші з теофіліном ВЕРХ-методом (колонки із зворотньо-фазними сорбентами, рухома фаза - суміш метанолу та води (40:60) рН 3; детектування УФ-детектором при 217нм [8].

Спосіб розроблено для аналізу ефедрину в суміші з теофіліном. Хроматографування проводиться в ізократичному режимі, детектування виконується при лише одній довжині хвилі. Спосіб не дає можливості дослідження отрут основного характеру, які можуть застосовуватися у суміші з ефедрином - алкалоїдів та синтетичних лікарських речовин.

Відомий спосіб кількісного визначення ефедрину, а також кофеїну, форсколіну, ікарліну, псевдоефедрину, синерфіну та йохембіну за продуктами термічної деструкції ВЕРХ-методом із застосуванням колонки Waters X Terra RP₁₈, рухомою фазою - суміші ацетонітрилу та води (80:20)

та при детектуванні УФ-детектором при 210нм. Хроматографування проводиться після екстракції продуктів термічної деструкції сумішшю ацетонітрилу та води (80:20)[9].

Спосіб розроблено для індивідуального аналізу ефедрину та 6 лікарських речовин (хроматографування проведено в ізократичному режимі та детектування виконано при лише одній довжині хвилі) та придатний для дослідження лікарських речовин без урахування умов аналізу ефедрину у біологічних об'єктах.

В якості прототипу вибрано спосіб кількісного визначення ефедрину в суміші речовин, близьких за будовою (група фенілалкіламінів - ефедрону, норепфедрину, амфетаміну та метамфетаміну) у біологічному матеріалі (сечі) з використанням вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) (хроматограф "Міліхром-4"; сталева колонка 62x2,0мм із зворотньо-фазним сорбентом Сепаром C₁₈, рухома фаза - суміш 0,2М водного розчину ортофосфорної кислоти, метанолу та діетиламіну (75:20:1); детектування УФ-детектором при 210 та 250нм). Хроматографування проводиться після екстракції ефедрину-основи з сечі хлороформом або бензолом після підлогування 5% розчином натрію гідроксиду до рН 10-11 та очистки методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) в системі хлороформ-толуол-ацетон-етанол-25% розчин аміаку (47,5:45:5:2,5), проявник - 0,2% розчин нингідрину в ацетоні [10].

Проте відомий спосіб призначений для аналізу ефедрину лише в суміші речовин групи фенілалкіламінів, тобто Хроматографування проводиться в ізократичному режимі, детектування виконується лише при двох довжинах хвиль. Спосіб розроблений без урахування можливості дослідження отрут основного характеру, які можуть застосовуватися у суміші з ефедрином - алкалоїдів та синтетичних лікарських речовин.

Завдання винаходу полягає у створенні способу визначення ефедрину у біологічному матеріалі шляхом застосування вискоєфективної рідинної хроматографії у режимі лінійного градієнту з зміною у часі вмісту та концентрації розчинників у складі елюенту, використання нових підходів до одержання з біологічного матеріалу проби без аналізу, детектування ефедрину за широким спектром довжин хвиль, що обумовлює високу чутливість, селективність, відтворюваність способу та надає можливість використовувати заявлений спосіб як уніфікований для визначення лікарських речовин основного характеру.

Поставлене завдання вирішується таким чином, що у способі визначення ефедрину у біологічному матеріалі, що включає одержання проби з вмістом ефедрин-основи шляхом екстрагування біологічного матеріалу після підлогування хлороформом з наступним очищенням за допомогою тонкошарової хроматографії, дослідження такої проби з використанням вискоєфективної рідинної хроматографії при внесенні проби до колонки зі зворотньо-фазним сорбентом, елююванні сумішшю розчинників та подальшого детектуванні ефедрину. Винаходом передбачено, що при елююванні

застосовують режим лінійного градієнту зі зміною від елюенту з вмістом 10% ацетонітрилу та 90% буферного розчину рН 2,8 з включенням іон-парного реагенту до елюенту, що являє собою 100% ацетонітрил, причому елюювання проводять протягом 25 хвилин, а детектування ефедрину здійснюють принаймні за сімома довжинами хвиль, зокрема 210, 230, 240, 260, 280, 300 та 330нм.

Згідно з винаходом для одержання проби з вмістом ефедрин-основи в якості біологічного матеріалу використовують подрібнені тканини печінки, причому до початку екстрагування змінюють рН маси до значень основного характеру шляхом додавання 25% розчину амонію гідроксиду поряд з безводним натрію сульфатом, здійснюють безперервне елюювання одержаної сипкої маси, видаляють домішки з екстракту шляхом розчинення органічним розчинником, наприклад, гексаном, а тонкошарову хроматографію здійснюють у системі розчинників метанол-25% розчин амонію гідроксиду при співвідношенні 100:1,5.

Заявлений спосіб здійснюється шляхом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з використанням, наприклад, рідинного хроматографу «Міліхром А-02» (ЗАО «ЕкоНова», Новосибірськ) на колонці (75x2мм) із сорбентом Nucleosil -100-5, C₁₈ (розмір часток - 5±1мкм; діаметр пор - 10±2нм (або 100 Å); питома поверхня 300м²/г; питомий об'єм пор - 0,8мл/г; форма часток - сферична). Зворотньо-фазний варіант досліджень обумовлений високою швидкістю встановлення сорбційної рівноваги, лекістю та повнотою десорбції компонентів з неполярного сорбенту невеликими об'ємами розчинника (елюента).

В якості елемента (рухомої фази) застосовують ацетонітрил, наприклад, («Кріохром», С.-Петербург), профільтований через мембрану «владипор» MOA-MA-N-2 (ТУ 6-05-1909-81) з розміром пор 0,15-0,25мкм, дегазований вакуумуванням. Буферний розчин готують з включенням іон-парного реагенту, наприклад, 4М розчин літію перхлорату в 0,2М розчині літію дигідрофосфату, який перед використанням розводили в 20 разів з потенціометричним встановленням значення рН середовища 2,8 на рН-метрі шляхом додавання 1М розчину кислоти ортофосфорної. Введення перхлорат-іонів модифікує поверхні сорбенту та збільшує взаємодії іоногенних сполук з неполярною нерухомою фазою. Встановлене значення рН буферного розчину є оптимальним для створення умов іонізації речовин та іон-парного реагенту, що поліпшує хроматографування речовин.

Градієнтний режим елюювання сумішами розчинників (від елюенту А (10% ацетонітрилу та 90% буферного розчину рН 2,8 з включенням іон-парного реагенту) до елюенту Б (100% ацетонітрилу) протягом 25хв забезпечує зниження полярності елюенту при додаванні менш полярного розчинника (ацетонітрилу) та зменшує утримання компонентів.

Кінцева стадія градієнту відповідає фазі з високим вмістом ацетонітрилу, в якому можуть легко

розчиняється літєві солі. Регенерація колонки проводиться протягом 4хв сумішшю розчинників (2% ацетонітрилу та 98% буферного розчину).

Хроматографування проводиться при оптимальних умовах: швидкість надання розчиннику - 100мкл/хв; температура колонки -35-37°C; тиснення на насосу - 2,6-2,8МПа; об'єм проби для уведення - 1-2мкл.

Для аналізу ефедрину застосовують багато-канальне детектування, наприклад, двопробним мультитрубовим УФ-спектрофотометром, за 7 довжинами хвиль - 210, 230, 240, 260, 280, 300 та 330нм, при цьому речовини на хроматограмі відповідають 7 піків з однаковим часом утримування, але з різними амплітудами, прямо пропорційними екстинкції (коефіцієнту поглинання електромагнітного випромінювання на даній довжині хвилі) речовини. Багатоканальне детектування речовин охоплює увесь спектр - 190-360 нм (точність довжини хвилі 0,5нм), дозволяє підвищувати селективність дослідження, вибрати уніфіковані умови ідентифікації індивідуальних речовин та застосовувати їх при аналізі ефедрину у суміші з отруйними речовинами основного характеру.

Застосування розроблених оптимальних умов ВЕРХ-аналізу надає можливість отримати симетричні, гострі, без взаємного накладання хроматографічні піки (при дослідженні сумішей речовин) та проводити надійну обробку хроматограм. Параметри ідентифікації та кількісного визначення для аналізованих отрут обчислювали у дослідках за допомогою комп'ютерної програми «МультиХром» (ЗАО «Амперсент», м.Москва), яка входить до комплексу хроматографа.

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином. Одержують пробу з вмістом ефедрину-основи з біологічного матеріалу. Для цього до подрібнених тканин печінки додають при розтиранні безводний натрію сульфату та 25% розчин амонію гідроксиду. Одержану сипку масу переносять у скляну колонку і піддають безперервній екстракції хлороформом. З хлороформного екстракту виділяють домішки екстрагуванням гексаном (після упарювання витяжки та розчинення сухого залишку у 0,1М розчині кислоти хлористоводневої). Ефедрин-основу екстрагують хлороформом після підлогування водної фази 25% розчином амонію гідроксиду.

Одержану пробу піддають наступному очищенню шляхом тонкошарового хроматографування з використанням хроматографічної пластинки Sorbfil, системи розчинників метанол-25% розчин амонію гідроксиду при співвідношенні 100:1,5, проявнику - 1% розчину нингідрину в бутанолі. Сорбент у місці локалізації ефедрин-основи знімають з хроматографічної пластинки та обробляють хлороформом, отриманий розчин упарюють та залишок розчиняють в ацетонітрилі. Одержану пробу з вмістом ефедрин-основи переносять у колонку рідинного хроматографа та проводять хроматографічний аналіз згідно заявленого способу.

Винахід ілюструється прикладами.

Приклад 1. Експериментальним шляхом вивчено можливість застосування заявленого способу при визначенні ефедрину гідрохлориду в модельних розчинах.

Для дослідження ефедрину гідрохлориду застосовували модельні розчини з концентраціями в діапазоні 2,0-50,0мкг/мл. Модельні розчини піддавали високоефективній рідинній хроматографії при внесенні проби до колонки зі зворотньо-фазним сорбентом, елююванні сумішшю розчинників та подальшому детектуванні ефедрину. Винаходом передбачено, що при елюванні застосовували режим лінійного градієнту зі зміною від елюенту з вмістом 10% ацетонітрилу та 90% буферного розчину рН 2,8 з включенням іон-парного реагенту до елюенту, що являє собою 100% ацетонітрил, причому елювання проводили протягом 25 хвилин, а детектування ефедрину здійснювали за сімома довжинами хвиль - 210, 230, 240, 260, 280, 300 та 330нм.

Ідентифікацію ефедрину проводили за параметрами утримування: абсолютний час утримування ($t_{абс}=9,14\pm0,02$ хв), абсолютний об'єм утримування ($V_{абс}=914$ мкл), границя виявлення - 2,2мкг/мл. Для виявлення ефедрину також використовували спектральні відношення, отримані в результаті ділення значень оптичної густини при 6 довжинах хвиль - від 230 до 330нм - на значення оптичної густини при 210нм: $A_{230нм}/A_{210нм}=0,002$; $A_{240нм}/A_{210нм}=0,008$; $A_{260нм}/A_{210нм}=0,020$; $A_{280нм}/A_{210нм}=-0,001$; $A_{300нм}/A_{210нм}=-0,001$. Встановлено, що для ефедрину спектральні відношення при 330нм характеризувались низькими значеннями у порівнянні зі спектральними відношеннями при інших довжинах хвиль, що надавало можливості ці дані не застосовувати в аналізі.

Для кількісного визначення ефедрину в об'єктах досліджень за методом абсолютного градування використовували градувальний графік, побудований у залежності площі піку (S) ефедрину від його концентрації (C, мкг/мл), для чого застосовували стандартний розчин ефедрину гідрохлориду (вміст препарату - 50мкг/мл). Лінійність побудованого графіку спостерігалась в інтервалі концентрацій 5-50мкг/мл ефедрину гідрохлориду (коефіцієнт кореляції - 0,9987). Чутливість методу складала 5мкг/мл препарату. Методом найменших квадратів розраховували рівняння градувального графіку - $S=0,295C+0,030$. Відтворюваність та надійність результатів, отриманих за розробленою методикою, перевіряли на модельних розчинах, відносна невизначеність не перевищувала $\pm 2,0\%$.

При аналізі сумішей речовин основного характеру встановлено, що ідентифікації та кількісному визначенню ефедрину за розробленою ВЕРХ-методикою не заважали аміназин ($17,32\pm0,02$ хв), анабазин ($6,50\pm0,03$ хв), анестезин ($12,73\pm0,03$ хв), атропін ($10,84\pm0,02$ хв), бупренорфін ($15,36\pm0,02$ хв), димедрол ($15,26\pm0,02$ хв), дипразин ($15,79\pm0,03$ хв), кокаїн ($13,31\pm0,02$ хв), кофеїн ($7,85\pm0,02$ хв), лідокаїн ($11,77\pm0,02$ хв), морфін ($7,39\pm0,02$ хв), папаверин ($13,07\pm0,02$ хв), пентоксифілін ($10,14\pm0,02$ хв), промедол

(14,26±0,03хв), теофілін (6,84±0,03хв), теобромін (6,50±0,03хв), тизерцин (16,65±0,02хв), фентаніл (14,29±0,03хв), хінін (11,36±0,03хв), циклодол (14,31±0,03хв).

Приклад 2. Експериментальним шляхом вивчали можливість застосування заявленого способу при визначенні ефедрину в біологічному матеріалі.

Високоєфективне рідинне хроматографування проводили після ізолювання проби з вмістом ефедрину-основи з тканини печінки труп методом безперервної екстракції хлороформом наступним чином: 10г тканини печінки труп (без ознак гнилістних змін), подрібненої ножицями до розміру часток 0,3-0,5см, змішували з 0,5мл 25 % амонію гідроксиду, додавали 25-30г безводного натрію сульфату та розтирали у ступці до утворення стану сипкої маси.

Застосування безводного натрію сульфату при розтиранні проби у ступці приводило до гомогенізації (руйнування мембран клітин тканини печінки) та зневоднення біологічного об'єкту (зв'язування води, яка знаходилася у клітинах органу та у міжклітинному просторі), що обумовлювало ефективне ізолювання досліджуваної речовини хлороформом.

В результаті додавання до проби 0,5мл 25% амонію гідроксиду відбувалося руйнування зв'язків "білок-отрута" та переведення ефедрину у неіонізовану форму, яка добре екстрагується хлороформом.

Після розтирання масу залишали на 1-2 години для висихання на повітрі при кімнатній температурі. Через отриману сипку масу, яку переносили у скляну колонку 10х2см, пропускали 100мл хлороформу з ділільної лійки, яка була закріплена у штативі над колонкою, зі швидкістю 60-80 крап/хв. Ефективність безперервного елюювання ефедрину з проби, розташованої в колонці обумовлено збільшенням площі та часу контакту речовини з хлороформом.

Для екстракційного очищення отриманої хлороформної витяжки останню упарювали на водяному огрівнику (40°C) досуха, залишок розчиняли у 20мл 0,1М розчину кислоти хлористоводневої та тричі екстрагували домішки гексаном по 15мл. Гексанову фазу не досліджували, а водну фазу підлюговували 25% розчином аміаку до рН 9-10 та двічі екстрагували ефедрин-основу хлороформом (15, 10мл). Емульсії руйнували центрифугуванням протягом 7-10хв зі швидкістю 3000 об/хв.

Хлороформну фазу упарювали до 5-6мл, фільтрували через 0,4-0,5г безводного натрію сульфату, який знаходився на паперовому фільтрі, в мірну колбу місткістю 10мл та доводили до мітки хлороформом. Після чого проводили очистку ефедрину методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) за відомою методикою: 2-4 мл одержаного хлороформного розчину, який відповідав 1-2 г біологічного матеріалу, упарювали до об'єму 0,3-0,5мл та наносили у вигляді смуги довжиною 2см на хроматографічну пластинку Sorbfil (тип сорбенту - силікагель ПСТХ-1А, звернення - 5-17мкм, товщина шару - 110мкм, зв'язуючий агент - силіказоль, тип основи ПЕТФ). На відстані 2см від

смуги наносили в точку 20-50мкг свідка, використовуючи стандартний 0,01% хлороформний розчин основи ефедрину.

Хроматографування проводили в камері об'ємом 500см³, в яку вносили 50мл системи органічних розчинників - метанол-25% розчин амонію гідроксиду (100:1,5) з наступним насиченням камери парами розчинників 30хв. Після чого хроматографічну пластинку висушували при кімнатній температурі.

Частину пластинки, де знаходився свідок та витяжка з контрольної проби, проявляли 1% розчин нингідрину в бутанолі (чутливість проявнику - 5-7мкг ефедрину в плямі рожевого кольору; Rf ефедрину = 0,33-0,35). Домішки були розташовані на лініях старту та фінішу. На рівні знаходження плями стандартного розчину досліджуваної речовини з частини пластинки, яка не була оброблена проявником, знімали шар сорбенту площею 4-5 см², переносили на фільтр та тричі елюювали речовину хлороформом по 5мл. 1-2мл отриманого розчину упарювали на водяному огрівнику при температурі 40°C та залишок розчиняли в 1мл ацетонітрилу з наступним дослідженням за ВЕРХ-методикою при внесенні одержаної проби до колонки зі зворотньо-фазним сорбентом, елююванні сумішшю розчинників та подальшому детектуванні ефедрину. Винаходом передбачено, що при елююванні застосовували режим лінійного градієнту зі зміною від елюенту з вмістом 10% ацетонітрилу та 90% буферного розчину рН 2,8 з включенням іон-парного реагенту до елюенту, що являє собою 100% ацетонітрil, причому елюювання проводили протягом 25 хвилин, а детектування ефедрину здійснювали за сімома довжинами хвиль - 210, 230, 240, 260, 280, 300 та 330нм (ідентифікацію та кількісне визначення проводили аналогічно способу, наведеному у прикладі 1).

Встановлено, що при здійсненні заявленого способу шляхом ізолювання ефедрину хлороформом з тканини печінки труп, очищення витяжок екстракційним та ТШХ-методами, ідентифікації та кількісного визначення ефедрину ВЕРХ-методом можливо виділити з тканини печінки труп до 75% ефедрину з відносною невизначеністю аналізу ±5,1%.

Таким чином, заявлений спосіб визначення ефедрину в біологічному матеріалі характеризується високою чутливістю, селективністю, відтворюваністю, а також скорочує час аналізу та забезпечує економію розчинників та реактивів. Спосіб може бути застосований у роботі контрольньо-аналітичних та хіміко-токсикологічних лабораторій.

Заявлений спосіб може бути використаний в якості уніфікованого способу для визначення речовин, зокрема лікарських засобів, основного характеру.

Джерела інформації:

1. Шаев А.И., Семенов В.А. К вопросу о количественном экстракционно-фотометрическом определении эфедрина в моче. // В кн.: Вопросы травматологии, токсикологии, скоростной смерти и деонтологии в экспертной практике. - М., 1966. - Вып. 3. - С.149-150.

2. Завражная Т.А. Использование метода ГЖХ для определения эфедрина гидрохлорида. // Фармация. - 1991. - №1 - С.31-33.

3. Смирнов А.В., Еремін С.К., Егорова Л.М. Поляризационный флюороим-муноанализ эфедрина в моче. //Хим.-фарм.журнал. - 1994.- № 1. - С.54-60.

4. Деклараційний патент на винахід № 62664, Україна. Спосіб визначення кустарно виготовлених заборонених похідних ефедрину у сечі людини. Опуб. 15.12.2003. Бюл.№12. Петюнін Г.П., Чубенко О.В., Дмитрієвська Ж.В.

5. Ephedrine alkaloid urine concentrations and cross reactivities with amphetamine/metamphetamine immunoassays:Te3. [North Amtrican Congress of Clinical Toxicology Annual Meeting, Seattle, Wash., Seht. 9-14, 2004] / Haller C., Stone J, Chen K, Jacob P. //J. Clin.ToxicoL- 2004. - V. 42. - N 5. - P.795.

6. Separation and detemination of (L)-ephedrine and (D)- pseudoephedrine in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection./ G. Shao, D.Wang, F.Wu, S.-J.Chen, X.Luo

// J. Liquid Chromatogr. - 1995. -V.18,N 11.-P. 2133-2145.

7. Simultaneous detemination of ephedrine and 2-imidazolines in pharmaceutical formulations by reversed-phase HPLC./ De Ozsi D., Gagliardi L., Cavazzutti G., Mediatl M.G., Tonelli D.. // J. Liquid Chromatogr. - 1995. - V.18, N 16. - P. 3233-3242.

8. Determination of theophylline and ephedrine HCL in tablets by ratio-spectra derivative spectrophotometry and liquid chromatography./Şenturk Zuhre, Erk Nevin, Ozkan Sibel A., Akay Cemal, Cevheroglu Şemsettin.//J.Pharm. and Biomed.Fnfl. - 2002. - V.29.- N 1-2. - P.291-298.

9. Schaneberg B.T., Khan I.A. Quantitative and qualitative HPLC analysis of themogenic weight loss products.// Phamazie. - 2004. - V.59. - N 11. - P.819-823.

10. Бодрина Д.Э., Еремін С.К., Чичуев Ю.А. Анализ эфедрина и эфедрона в биологических объектах хроматографическими методами. //Суд.-мед. экспертиза-1994. -№ 1. -С.23-25.