



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 99019

(13) C2

(51) МПК

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/88 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2010 13841	(72) Винахідник(и):	Ковальська Олена Василівна (UA), Маміна Олена Олександрівна (UA), Безуглий Петро Овксентійович (UA), Бондаренко Євген Леонідович (UA)
(22) Дата подання заявки:	22.11.2010	(73) Власник(и):	НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул.Пушкінська, 53, м.Харків, 61002, Україна (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.07.2012	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	Bakshi M. et al. Validated specific HPLC methods for determination of prazosin, terazosin and doxazosin in presence of degradation products formed under ICH- recommended stress conditions // J. Pharm. and Biomed. Anal. - 2004. - Vol. 34, № 1. - P. 19-26 Kim Y. J. et al. High-performance liquid chromatographic determination of doxazosin in human plasma for bioequivalence study of controlled release doxazosin tablets. Biomed. Chromatogr. 2006 Nov; 20 (11): 1172-7 Sripalakit P. et al. Validation and pharmacokinetic application of a method for determination of doxazosin in human plasma by high-performance liquid chromatography // Biomed. Chromatogr. 2006 Aug; 20 (8):729-35 Sripalakit P. et al. Improvement of doxazosin determination in human plasma using high- performance liquid chromatography with fluorescence detection. J. Chromatogr. Sci. 2005 Feb; 43(2): 63-6
(41) Публікація відомостей про заявку:	11.04.2011, Бюл.№ 7		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.07.2012, Бюл.№ 13		

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ДОКСАЗОЗИНУ МЕТОДОМ ГАЗО-РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

### (57) Реферат:

Винахід належить до аналітичної хімії, а саме до способів визначення доксазозину методом газорідинної хроматографії і може застосовуватися для визначення зазначеної речовини у фармацевтичному аналізі та при хіміко-токсикологічних дослідженнях.

Завдання винаходу полягає у створенні нового способу визначення доксазозину методом газорідинної хроматографії, який шляхом вибору оптимальної температурної програми та збалансованої нерухокої 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.

UA 99019 C2

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином. Визначення доксазозину виконують при застосуванні газового хроматографа "Agilent 19091 J-413", капілярної колонки 30м×320 мкм з нерухомою рідинною фазою - 5%-феніл-95%-диметил-полісилоксан, HP-5 0,25 мкм; рухомої фази - газу-носія - гелію, який подають у колонку зі швидкістю - 45,0 мл/хв.

Детектування речовини проводять полум'яно-іонізаційним детектором, швидкість подачі водню - 40,0 мл/хв. Температуру колонки лінійно програмують: 2 хв. при 180 °С; зростання температури від 180 до 220 °С зі швидкістю 10 °С за хв. протягом 4 хв.; при 220 °С температурний режим зберігається протягом 2 хв. Температура випарника складає 250 °С, детектора - 250 °С. Кількісний вміст доксазозину визначають методом абсолютної калібровки за площею піків.

Винахід належить до аналітичної хімії, а саме до способів визначення доксазозину методом газорідинної хроматографії і може застосовуватися 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 обумовлює підвищення вживання гіпотензивних препаратів.

Блокатори  $\alpha_1$ -адренорецепторів (доксазозин, празозин, альфузазин та теразозин) широко застосовуються у медичній практиці при лікуванні артеріальної гіпертензії та гіпертрофії простати, проте при передозуванні, самолікуванні ці препарати можуть вражати серцево-судинну систему, порушувати функції печінки та нирок, викликати інтоксикацію організму, тому вибір високочутливих методів дослідження доксазозину та інших блокаторів  $\alpha_1$ -адренорецепторів, придатних для аналізу фармацевтичних препаратів та біологічних об'єктів на зазначені речовини, є актуальною проблемою [1-3].

Існують способи визначення азотовмісних лікарських 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 випарника та швидкості надання газу-носія у колонку), які не враховують індивідуальні властивості досліджуваної речовини.

Відомий, наприклад, спосіб визначення наркотичних речовин, похідних амфетаміну та бензодіазепіну методом газорідинної хроматографії з використанням газового хроматографу "Цвет 530"; полум'яно-іонізаційного детектору; капілярної колонки з нерухомою рідинною фазою - SE-52 (полісилоксан). Температуру колонки згідно з відомим способом лінійно програмують від 130 до 285 °C зі швидкістю 10 °C у хв., при 285 °C температурний режим зберігається протягом 3 хв.; а температура випарника становить 270 °C, детектора - 290 °C [4].

До недоліків способу можна віднести високі температури колонки та детектора, які не враховують температуру розкладу доксазозину - 289-290 °C, 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, папаверину, стрихніну, кодеїну) при проведенні скринінгових досліджень біологічного матеріалу (система GB) з використанням капілярної колонки з нерухомою 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 хроматографу HP-5890, мас-селективного детектору HP-5972 фірми "Hewlett Packard", кварцевої 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.

Задача винаходу 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.

Поставлена задача вирішується таким чином, що спосіб визначення доксазозину методом газорідинної хроматографії у відповідності з заданою температурною програмою на відміну від прототипу передбачає, що як нерухому рідинну фазу використовують суміш 5 %-фенілдиметил-полісилоксан, 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 винаходом як рухому фазу використовують газ-носії - гелій зі швидкістю подання у колонку 45,0 мл/хв.

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

5 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.

10 Дослідами доведено, що при застосуванні заявленого способу на хроматограмах спостерігаються симетричні піки доксазозину, час утримування 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).

15 Запропонований спосіб дозволяє ідентифікувати досліджувану речовину доксазозин у присутності інших блокувальних  $\alpha_1$ -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).

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

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

30 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).

35 Кількісне визначення доксазозину проводять методом абсолютної калібровки за площею піків. Розрахунки вмісту доксазозину виконують за градувальним графіком, побудованим у залежності площі піків ( $S$ , мм<sup>2</sup>) від концентрації речовини ( $C$ , мкг/мл) з використанням стандартних розчинів із різним вмістом доксазозину. За одержаними середніми значеннями розраховують концентрацію доксазозину у випробуваному розчині.

Винахід ілюструється прикладом.

Приклад 1

40 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.

45 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 30м×320 мкм з нерухомою рідинною фазою - 5 %-фенілдиметил-полісилоксан, 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 °С; зростання температури від 180 до 220 °С зі швидкістю 10 °С у хв. протягом 4 хв.; при 220 °С температурний режим зберігався протягом 2 хв.

50 Температура випарника складала 250 °С, детектора - 250 °С. 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<sup>2</sup>.

55 Кількісне визначення доксазозину проводили при застосуванні рівняння градувального графіку  $S=a+bC$ , коефіцієнти регресії ( $a$ ,  $b$ ) якого були розраховані методом найменших квадратів, при цьому  $S_{\text{доксазозину}}=59,8+334,6C$ , коефіцієнт кореляції - 0,999.

60 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					
	X	S <sup>2</sup>	S	S <sub>x</sub>	Δx	ε
97,7-101,7	99,74	4,66	2,16	0,82	2,01	2,02

5

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 - ±2,02 %).

10

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 блокторів α<sub>1</sub>-адренорецепторів та кількісно визначити вміст доксазозину у об'єктах дослідження методом абсолютної калібровки за площею піків.

15

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.

20

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.

25

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.

30

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.

35

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.

40

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

45

1. Спосіб визначення доксазозину методом газорідинної хроматографії у відповідності з заданою температурною програмою, який **відрізняється** тим, що як нерухому рідинну фазу використовують суміш 5%-феніл-95%-диметил-полісілоксан, НР-5 0,25 мкм, а температуру колонки лінійно програмують наступним чином: 180 °С протягом 2 хвилин з подальшим зростанням температури до 220 °С зі швидкістю 10 °С за хвилину протягом 4 хвилин і витриманням 220 °С протягом 2 хвилин, причому температура випарника і детектора не перевищує 250 °С.

50

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як рухому фазу використовують газ-носії гелій зі швидкістю подання у колонку 45,0 мл/хв.
3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що аналізують водний розчин доксазозину з концентрацією 1,25-10,0 мкг/мл.

5

---

Комп'ютерна верстка А. Рябко

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601