

УДК: 615.213:54.061/062:615.07

© Бондар В.С., Багуля О.В., Байдак О.В., 2013

## РОЗРОБКА УМОВ ВИЗНАЧЕННЯ ДИФЕНІНУ МЕТОДОМ ГАЗО-РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ, ПРИДАТНИХ ДЛЯ ЦІЛЕЙ ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНОГО АНАЛІЗУ

Бондар В. С., Багуля О. В., Байдак О. В.

Національний фармацевтичний університет (м. Харків)

**Вступ.** Протисудомні та протиепілептичні засоби досить часто стають об'єктами досліджень в практичній роботі хіміків-токсикологів – препарати є сильнодіючими, і випадки отруєнь ними є поширеними [8, 9]. В літературних джерелах є інформація про випадки гострих та смертельних отруєнь дифеніном, в тому числі і в суміші з іншими лікарями та алкоголем [5, 10, 11].

В хіміко-токсикологічних дослідженнях одним з провідних методів аналізу є газо-рідинна хроматографія (ГРХ). Її застосуванню в аналізі протиепілептичних засобів взагалі, і дифеніну зокрема, присвячено низку публікацій, проте, потрібно зазначити основний недолік висвітлених методик – розробка умов аналізу проводиться лише для одного або двох препаратів, що викликає проблеми з ідентифікацією препаратів супутньої терапії [2 – 4, 6].

**Мета дослідження.** У даній роботі нами було поставлено за мету підібрати умови виявлення дифеніну за допомогою методу ГРХ в присутності інших препаратів з групи протисудомних засобів та розробити методику кількісного визначення дифеніну за обраних умов.

Роботу виконано за темою: «Хімічний синтез і аналіз біологічно-активних речовин, створення лікарських засобів синтетичного походження» (0103U000475).

**Матеріали та методи.** В роботі нами було використано такі протисудомні засоби: дифенін, етосуксимід, фенобарбітал, дибамк фармакопейної чистоти.

Для розробки умов виявлення готували розчини субстанцій в 96% етанолі з концентрацією 50 мкг/мл – з цією метою 0,1000 г відповідної речовини вносили в мірну колбу ємністю 100,0 мл, розчиняли в 10,00 мл 96% етанолу та доводили об'єм розчину цим же розчинником до позначки (стандартний розчин, концентрація 1000 мкг/мл); у мірну колбу ємністю 100,0 мл вносили 5,00 мл стандартного розчину і доводили об'єм розчину 96% етанолом до позначки (робочий розчин, концентрація 50 мкг/мл). Об'єм проби становив 1 мкл. Попередньо проводили хроматографування розчинника – 96% етанолу.

Хроматографування проводили на газо-рідинному хроматографі HP 6890 Hewlett Packard.

Умови хроматографування:

- колонка HP-1 розміром  $\varnothing 0,32$  мм  $\times$  30 м з

**Таблиця 1.** Основні хроматографічні параметри дифеніну, етосуксими́ду, фенобарбіталу та дибамку при визначенні методом ГРХ

Речовина	Час утримування ( $t_R$ )	Площа піку (S)	Ефективність колонки (N)	Коефіцієнт симетрії (T)	Ступінь розділення ( $R_s$ )
етосуксимід	2,099	447,1	31138	1,1	19,2
фенобарбітал	5,562	165,2	337080	2,0	81,0
дифенін	7,492	447,9	318441	1,0	42,5
дибамк	9,647	313,5	233056	0,8	34,5

товщиною шару 100% диметилполісилоксану 1 мкм;

- температура термостату колонки – 165°C (2 хв.), підвищення температури зі швидкістю 20°C/хв. до 290°C (витримують протягом 20 хв.);
- температура випарника – 280°C;
- детектор – полум'яно-іонізаційний;
- температура детектора – 300°C;
- об'ємна швидкість газу-носія (гелій) – 3 мл/хв.;
- поділ потоку – 1:5.

**Методика побудови градувального графіка.** 0,1000 г дифеніну вносили в мірну колбу ємністю 100,0 мл, розчиняли в 10,00 мл 96% етанолу та доводили об'єм розчину цим же розчинником до позначки (стандартний розчин 1, концентрація 1000 мкг/мл). У мірну колбу ємністю 200,0 мл вносили 20,00 мл стандартного розчину 1 і доводили об'єм розчину 96% етанолом до позначки (стандартний розчин 2, концентрація 100 мкг/мл). У ряд мірних колб ємністю 100,0 мл вносили 50,00; 25,00; 20,00; 10,00 та 5,00 мл стандартного розчину 2 відповідно і доводили об'єми розчинів 96% етанолом до позначки (розчини 3, 4, 5, 6 та 7 відповідно, концентрація 50, 25, 20, 10 та 5 мкг/мл відповідно).

Розчини дифеніну 2 – 7 хроматографували за вищезазначених умов; об'єм проби становив 1 мкл. Експеримент виконували тричі.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Основні хроматографічні параметри досліджених речовин при визначенні методом ГРХ за зазначеною методикою наведено в табл. 1, а типова хроматограма – на рис. 1.

Таким чином, можна зазначити, що розроблена ГРХ-методика забезпечує задовільне розділення дифеніну та інших препаратів групи протисудомних засобів.

Нами розроблено методику кількісного визначення дифеніну методом ГРХ. З цією метою було виготовлено серію розчинів зазначеної речовини та проведено їх хроматографування за зазначених умов.

За отриманими даними будували градувальний графік, якому відповідає рівняння прямої (1) виду  $y = bx + a$  [1], що має вигляд:

$$S = 0,8150 \cdot C - 4,5598, (1)$$

де S – площа піку, а C – концентрація дифеніну, мкг/мл.

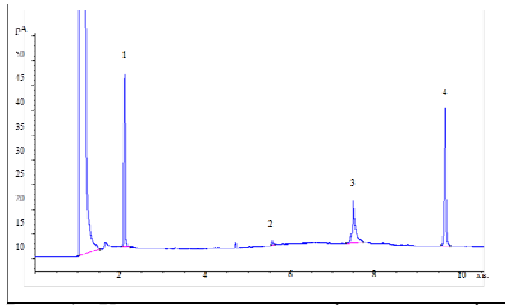


Рис. 1. Хроматограма розчинів етосуксимиду (1), фенобарбіталу (2), дифеніну (3) та дибамку (4), що отримана за методом ГРХ

Метрологічну характеристику [1] отриманої градуовальної залежності наведено в табл. 2.

Таблиця 2. Метрологічна характеристика градуовальної залежності (1) площі піку від вмісту дифеніну ( $y = bx + a$ ), отриманої методом ГРХ

$r^2$	b	a	$S^2$	$\Delta b$	$\Delta a$
0,99945	0,8150	-4,5598	0,7641	0,01509	0,7878

Таблиця 3. Результати кількісного визначення дифеніну методом ГРХ у модельних розчинах (об'єм проби 1 мкл)

Концентрація розчину дифеніну, мкг/мл	Площа піку	Знайдено дифеніну		Метрологічні характеристики
		мкг/мл	%	
15,0	7,9852	15,39	102,60	$\bar{X} = 100,27$ ; $S = 1,642$ ; $S_{\bar{X}} = 0,734$ ; $\Delta \bar{X} = 2,04$ ; $\varepsilon = \pm 2,03\%$ ; $\bar{X} \pm \Delta \bar{X} = 100,27 \pm 2,04$
30,0	19,6978	29,76	99,20	
45,0	31,5155	44,26	98,36	
60,0	44,8402	60,61	101,02	
75,0	56,6753	75,14	100,19	

Відносна невизначеність середнього результату [1] становить  $\pm 2,03\%$ .

**Висновки:** Проведено аналіз дифеніну в суміші з іншими протисудомними препаратами методом ГРХ та показано, що розроблена методика забезпечує задовільне розділення досліджених препаратів. Розроблено методику

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

Отримана залежність лінійна в діапазоні концентрацій від 10 мкг/мл до 100 мкг/мл, що відповідає вмісту речовини у введеному об'ємі проби від 10 нг до 100 нг відповідно. При цьому встановлено, що мінімальна концентрація дифеніну в розчині, яку можна визначити за допомогою наведеної методики, становить 5 мкг/мл, що відповідає вмісту речовини у введеному об'ємі проби 5 нг.

Рівняння прямої (1) було використано для аналізу дифеніну в модельних розчинах різних концентрацій. Отримані дані наведено в табл. 3.

кількісного визначення дифеніну методом ГРХ; методика лінійна в діапазоні концентрацій від 10 мкг/мл до 100 мкг/мл; відносна невизначеність середнього результату становить  $\pm 2,03\%$ . Результати досліджень можуть бути використані для ідентифікації та кількісного визначення дифеніну, ізолюваного із біологічного матеріалу.

#### ЛІТЕРАТУРА:

1. Доерфель К. Статистика в аналитической химии / К. Доерфель; пер. с нем. под ред. В.В. Налимова. – М.: Мир, 1969. – 223 с.
2. A quantitative phenytoin GC-MS method and its validation for samples from human ex situ brain microdialysis, blood and saliva using solid-phase extraction / R. Hösl, A. Tobler, S. König, S. Mühlebach // J. Anal. Toxicol. – 2013. – V. 37 (2). – P. 102 – 109.
3. A capillary GC-MS method for analysis of phenytoin and  $^{13}C_3$ -phenytoin from plasma obtained from pulse dose pharmacokinetic studies / M. H. Nelson, A. K. Birnbaum, P. J. Nyhus, R. P. Remmel // J. Pharm. Biomed. Anal. – 1998. – V. 17 (8). – P. 1311 – 1323.
4. Chen K. Comparative analysis of antiepileptic drugs by gas chromatography using capillary or packed columns and by fluorescence polarization immunoassay / K. Chen, H. Khayam-Bashi // J. Anal. Toxicol. – 1991. – V. 15 (2). – P. 82 – 85.
5. Craig S. Phenytoin poisoning / S. Craig // Neurocrit. Care. – 2005. – V. 3 (2). – P. 161 – 170.
6. Development, validation, and application of a fast and simple GC-MS method for determination of some therapeutic drugs relevant in emergency toxicology / M.R. Meyer, J. Welter, A.A. Weber, H.H. Maurer // Ther. Drug Monit. – 2011. – V. 33 (5). – P. 649 – 653.
7. French J. The long-term therapeutic management of epilepsy / J. French // Ann. Intern. Med. – 1994. – V. 120. – P. 411 – 420.
8. Morrow J. I. Poisoning by anticonvulsants / J. I. Morrow, P. A. Routledge // Adverse Drug React. Acute Poison. Rev. – 1989. – V. 8 (2). – P. 97 – 109.
9. Murphy J. M. Phenytoin intoxication / J. M. Murphy, R. Motiwala, O. Devinsky // South Med. J. – 1991. – V. 84 (10). – P. 1199 – 1204.
10. Phenytoin toxicity: a review of 94 cases / P.L. Curtis, R. Piibe, M.J. Ellenhorn [et al] // Vet. Hum. Toxicol. – 1989. – V. 31 (2). – P. 164 – 165.

Бондарь В. С., Багуля А. В., Байдак О. В. Разработка условий определения дифенина методом газо-жидкостной хроматографии, пригодных для целей химико-токсикологического анализа // Украинский медицинский альманах. – 2013. – Том 16, № 1. – С. 53-54.

Проведен аналіз дифеніну в суміші з іншими протисудорожними препаратами методом ГРХ та показано, що розроблена методика забезпечує задовільне розділення досліджених препаратів. Розроблена методика кількісного визначення дифеніну методом ГРХ; методика лінійна в діапазоні концентрацій від 10 мкг/мл до 100 мкг/мл; відносна невизначеність середнього результату становить  $\pm 2,03\%$ .

**Ключевые слова:** дифенин, етосуксимид, фенобарбитал, дибамк, газо-жидкостная хроматография

Бондар В. С., Багуля О. В., Байдак О. В. Розробка умов визначення дифеніну методом газо-рідинної хроматографії, придатних для цілей хіміко-токсикологічного аналізу // Український медичний альманах. – 2013. – Том 16, № 1. – С. 53-54.

Проведено аналіз дифеніну в суміші з іншими протисудомними препаратами методом ГРХ та показано, що розроблена методика забезпечує задовільне розділення досліджених препаратів. Розроблено методику кількісного визначення дифеніну методом ГРХ; методика лінійна в діапазоні концентрацій від 10 мкг/мл до 100 мкг/мл; відносна невизначеність середнього результату становить  $\pm 2,03\%$ .

**Ключові слова:** дифенін, етосуксимід, фенобарбітал, дибамк, газо-рідинна хроматография

Bondar V. S., Bagulya O. V., Baydak O. V. Development of determination conditions for phenytoin by the method of gas-liquid chromatography, suitable for purposes of chemical and toxicological analysis // Український медичний альманах. – 2013. – Том 16, № 1. – С. 53-54.

The analysis of phenytoin in the mixture with other anticonvulsant drugs by GLC method has been carried out and it has been showed that the developed method provides the satisfactory division of the medicines to be researched. The procedure of quantitative determination of phenytoin by GLC method has been developed; the method is linear within the range of concentrations from 10 mcg/ml to 100 mcg/ml; the relative uncertainty of mean result is equal to  $\pm 2,03\%$ .

**Key words:** phenytoin, ethosuximide, phenobarbital, dibamk, gas-liquid chromatography

Надійшла 30.11.2012 р.  
Рецензент: проф. Л.В.Савченкова