

ВИЗНАЧЕННЯ ДЕКСТРОПРОПОКСИФЕНУ В БІОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Ключові слова: декстропропоксифен, вискоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), зберігання

Спазмолекс є вискоєфективним комбінованим препаратом, який має анальгетичні, жарознижувальні та спазмолітичні властивості. До його складу входять парацетамол, дицикламіну гідрохлорид та наркотичний засіб – декстропропоксифену гідрохлорид. Останній являє собою альфа-(+)-4-диметиламіно-1,2-дифеніл-3-метил-2-бутанолпропіонат та віднесений до наркотичних засобів, обіг яких обмежено [1]. Спазмолекс часто використовується наркозалежними для досягнення стану наркотичного сп'яніння [2]. Описано випадки отруєнь лікарськими засобами, що містять декстропропоксифен, у тому числі летальні, внаслідок передозування [3–7]. У зв'язку з зазначеним є необхідність у розробці методики виявлення та визначення декстропропоксифену в біологічному матеріалі методом вискоєфективної рідинної хроматографії, а також вивчення його збереженості в умовах гнилісного змінення.

Експериментальна частина

Умови проведення ВЕРХ. Дослідження проводилось на рідинному хроматографі «Agilent 1100» у режимі градієнтного елюювання – від 5 % А до 95% Б за 40 хв. Рухома фаза: елюент А – літію перхлорат (0,2 М LiClO₄ – 0,005М HClO₄), елюент В – ацетонітрил. Температура колонки – 40°C. Колонка завдовжки 150 мм x 4,6 мм з нерухомою фазою «Prontosil 120-5C18AQ», УФ-детектування – в діапазоні хвиль 210–300 нм. Об'єм проби – 50 мкл (автосамплер). Швидкість рухомої фази – 1 мл/хв

Методика будови градуювального графіка

Приготування розчинів декстропропоксифену для проведення градуювання з концентраціями 0,05; 0,2; 0,5; 0,75; 1,0; 10,0; 25,0; 40,0; 50,0 мг/л. 0,0100 г декстропропоксифену розчиняли в мірній колбі місткістю 100 мл, доводили до мітки ацетонітрилом та перемішували (стандартний розчин №1, концентрація 100 мг/л). Подальшим розведенням стандартного розчину № 1 одержували серію градуювальних розчинів з вищезазначеними концентраціями. Приготовлені розчини хроматографували шість разів згідно з рекомендаціями GTFCh [8–10]. Середній час утримання декстропропоксифену – 21,7±0,1 хв.

Найкращий відгук детектора на хроматограмі декстропропоксифену спостерігали при довжині хвилі 210 нм, яку і використовували як робочу.

При побудові градуювального графіка використовували залежність співвідношення висот піків (Н) декстропропоксифену від його концентрації (С, мг/л). Отримані дані були оброблені методом найменших квадратів. При цьому було встановлено, що у досліджених діапазонах є дві лінійні залежності: від 0,05 до 1 мг/л (рис.1) та від 1 до 50 мг/л (рис.2), які мають вид: $y = b \cdot x$, отже

$$H_{0,05-1} = 0,1212C \quad (1)$$

$$H_{1-50} = 0,2517C \quad (2)$$

Метрологічні характеристики градуювальних залежностей представлені в табл. 1.

Для визначення метрологічних характеристик методики використовували розчини декстропропоксифену з концентраціями 0,2; 0,5; 1,0; 10,0; 50,0 мг/л, що перекривали весь діапазон концентрацій – від мінімальних до летальних. Метрологічні характеристики методу наведені в табл. 2.

З отриманих даних випливає, що відносна похибка середнього результату при кількісному визначенні декстропропоксифену методом ВЕРХ не перевищує $\pm 8,63\%$.

Вивчення зберігання декстропропоксифену в біологічному матеріалі, що зазнав гнильні зміни. До 100 г подрібненої тканини трупної печінки додавали 0,0040 г декстропропоксифену, ретельно перемішували і поміщали на добу в холодильник. 10,0 г (точна наважка) тканини печінки розтирали в ступці з 30 г безводного натрію сульфату до утворення однорідної сипкої маси, яку переносили в колонку і елюювали 100 мл хлороформу. До отриманого хлороформного екстракту додавали 1 краплю хлороводневої кислоти та упарювали в струмі повітря. Залишок розчиняли у 5 мл ацетонітрилу та тричі екстрагували гексаном для позбавлення жиру. Гексанові екстракти відкидали, а ацетонітрильні витяги об'єднували та поміщали на 12 год у морозильну камеру холодильника для виморожування білків. Рідинну фракцію зливали в мірну колбу місткістю 10 мл, залишок промивали холодним ацетонітрилом, який переносили у ту саму мірну колбу, доводили об'єм до мітки і досліджували методом ВЕРХ. Ці дослідження повторювали щомісячно з черговими порціями гомогенату печінки, що зберігався.

Кількісне визначення декстропропоксифену в отриманих екстрактах проводили розробленим методом (табл. 3).

Отримані результати свідчать про можливість надійного визначення декстропропоксифену у гнильно-зміненому біологічному матеріалі в термін до трьох місяців включно.

Вивчення ізолювання декстропропоксифену з крові проводили на модельних розчинах крові. 0,0100 г декстропропоксифену розчиняли в мірній колбі місткістю 100 мл, доводили до мітки ацетонітрилом та перемішували. 1 мл цього розчину переносили до мірної колби місткістю 100 мл та доводили до мітки трупною кров'ю, ретельно перемішували, після чого на добу поміщали в холодильник.

Порцію (5 мл) підготовленої крові вміщували у центрифужну пробірку і для висадження білків додавали 5 мл ацетонітрилу (або 1М розчину трихлороцтової кислоти, або 96 % етанолу, або 10 % розчину хлороводневої кислоти). Вміст пробірки перемішували, залишали стояти на 10 хв і потім центрифугували протягом 5 хв при 5000 об/хв. Для очищення цільових компонентів від ліпідів проводили екстракцію гексаном. Для чого до надосадової рідини додавали гексан у співвідношенні 1:5 (за об'ємом), струшували протягом 5 хв, після розділення шарів верхній гексановий шар відкидали, а нижній вміщували у пробірку та екстрагували хлороформом (зокрема проби з ацетонітрилом). Хлороформні вилучення упарювали при кімнатній температурі до отримання сухого залишку, який розчиняли точно в 1 мл ацетонітрилу та досліджували розробленим методом для визначення виходу декстропропоксифену. Операцію проводили тричі (табл. 4).

Як видно з даних табл. 4, найкращі результати були отримані при використанні в якості депротейнізатора й екстрагенту ацетонітрилу, що слід вважати позитивним моментом, урахувавши подальше застосування методу ВЕРХ у якості кінцевої аналітичної операції.

Т а б л и ц я 1

Метрологічні характеристики градувальних залежностей висот піків від вмісту декстропропоксифену в досліджених діапазонах концентрацій 0,05-1 (n=30; P=0,95) та 1-50 (n=30; P=0,95)

Діапазони концентрацій	<i>r</i>	<i>b</i>	<i>S_o</i>
0,05-1	0,9875	0,1212	0,0018
1-50	0,9993	0,2517	0,2273

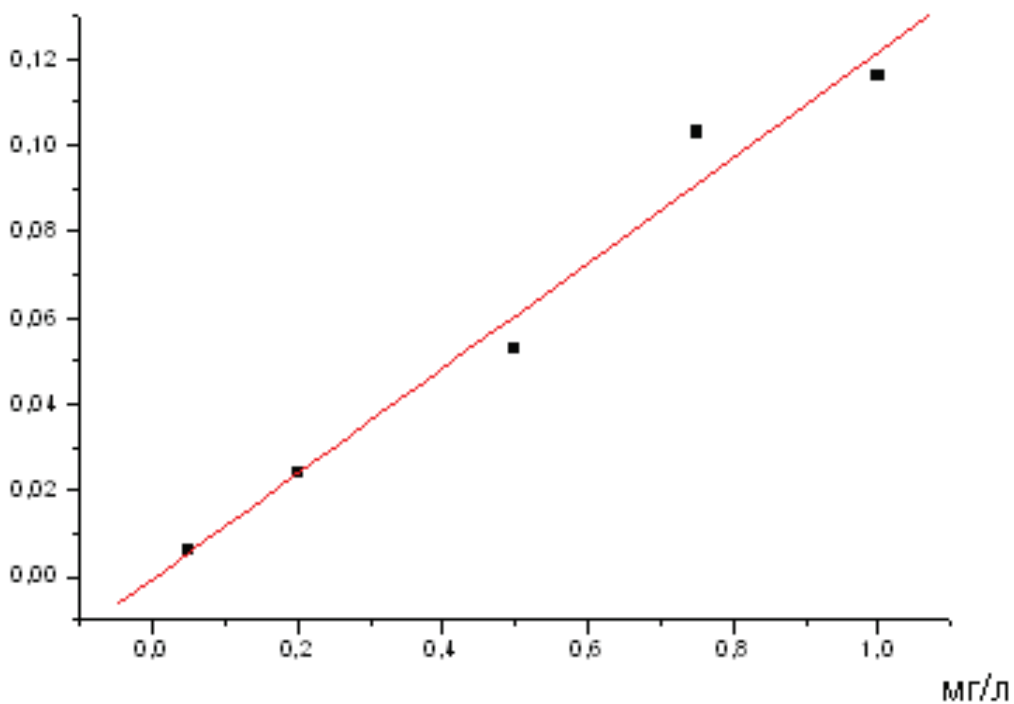


Рис.1. Градувальний графік залежності висоти піка від концентрації декстропропаксифену в діапазоні концентрацій 0,05–1 мг/л

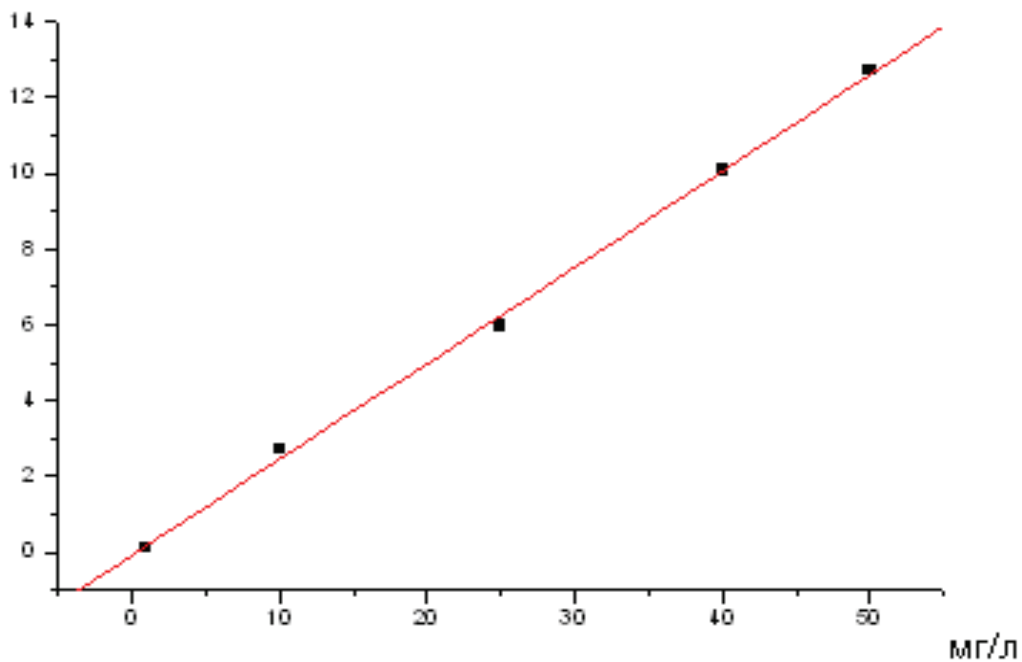


Рис.2. Градувальний графік залежності висоти піка від концентрації декстропропаксифену в діапазоні концентрацій 1–50 мг/л

Т а б л и ц я 2

Результати кількісного визначення декстропропоксифену та метрологічні характеристики методики

Введено декстропропоксифену (мг/л)	Виявлено декстропропоксифену		Метрологічні характеристики
	мг/л	%	
0,20	0,19	99,00	$\bar{X}=98,10$ $S=7,37$ $S\bar{\sigma}=3,29$ $\Delta\bar{\sigma}=8,47$ $\varepsilon=\pm 8,63\%$ $X\pm\Delta\bar{\sigma}=98,10\pm 8,47$
0,50	0,44	87,40	
1,00	0,96	95,70	
10,00	10,75	107,49	
50,00	50,44	100,89	

Т а б л и ц я 3

Кількість декстропропоксифену, виявленого в біологічному матеріалі

Місяці зберігання	Концентрація декстропропоксифену, мг/л (середнє з трьох досліджень)	Виявлено декстропропоксифену (% від початкового)
0	0,396	99,00
1	0,338	84,50
2	0,231	57,75
3	0,083	20,75
4	0,041	10,25
5	0,033	8,25

Т а б л и ц я 4

Кількість декстропропоксифену, виявленого в крові

Осаджувач білка	Введено декстропропоксифену, мг	Виявлено декстропропоксифену, мг	Вихід, %
1 М розчин трихлороцтової кислоти	10	1,86	18,60
10% розчин хлороводневої кислоти	10	1,53	15,29
Етанол	10	2,40	23,76
Ацетонітрил	10	3,87	38,68

В и с н о в к и

1. Розроблено методику виявлення декстропропоксифену в біологічному матеріалі методом ВЕРХ.

2. Вивчено збереження декстропропоксифену в гнильно-зміненому біологічному матеріалі. При цьому встановлено можливість надійного визначення декстропропоксифену у гнильно-зміненому біологічному матеріалі в термін до трьох місяців включно.

3. Проведено порівняльне дослідження методів пробопідготовки крові для визначення декстропропоксифену. Встановлено, що кращі результати спостерігаються при використанні депротеїнізатора та екстрагента ацетонітрилу.

1. Перелік наркотичних засобів, психотропних речовин і прекурсорів, затверджений постановою Кабінету Міністрів України від 6 травня 2000 р. № 770.

2. Кузьминов В.Н. // Ліки України. — 2004. — Додаток № 9. — С. 147.

3. Afshari R., Maxwell S., Dawson A., Bateman D.N. ECG abnormalities in co-proxamol (paracetamol/dextropropoxyphene) poisoning. Clin Toxicol (Phila). — 2005; — 43(4): — P. 255-9.

4. Isacsson G., Holmgren A., Osby U., Ahlner J. Decrease in suicide among the individuals treated with antidepressants: a controlled study of antidepressants in suicide, Sweden 1995-2005 // Acta Psychiatr Scand. - 2009. — Volume 120 (Issue 1). — P. 37-44.

5. Nordentoft, Merete (M); Qin, Ping (P); Helweg-Larsen, Karin (K); Juel, Knud (K). // Suicide Life Threat Behav. — 2007. — Volume 37 (Issue 6). — P. 688-697.

7. Sandilands E.A., Bateman D.N. // Br J Clin Pharmacol. — 2008. - Volume 66 (Issue 2). — P. 290-293.

8. Vale J. A., Karunakara B. P., Maiya P P., Hegde S. Radhakrishna, Pradeep G. C. // Department of Pediatrics, M.S. Ramaiah Medical Teaching Hospital. — 2003. — Volume 70 (Issue 4). — P. 357-358.

9. Peters F.T., Hallbach J., Maurer H.H.. Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie Arbeitskreis Qualitätssicherung des Arbeitskreises Klinische Toxikologie der GTFCh zur Validierung von Methoden für die toxikologische Analytik im Rahmen der Hirntod-Feststellung. Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie

10. Peters F.T., Maurer H.H. (2002) Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review.// Accred.Qual.Assur. — 2002. — № 7. — P. 441-449.

11. Peters F.T., Drummer O.H. Validation of new methods // For.Sci.Int. — 2007. — Vol. 165. — P. 216-224.

Надійшла до редакції 17.03.2011.

Г.П.Петюнин, О.В.Хижниченко

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕКСТРОПРОПОКСИФЕНА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Ключевые слова: декстропропоксифен, высокоэффективная жидкостная хроматография, сохранение

Разработана методика обнаружения и определения декстропропоксифена в биологическом материале методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Изучено влияние различных методов депротеинизации на выходы декстропропоксифена из крови и его сохранение в биологических тканях при гнилостных процессах.

G.P.Petyunin, O.V.Khizhnichenko

DETERMINATION OF DEXTROPROPOXYPHENE IN BIOLOGICAL MATERIALS BY THE METHOD OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Key words: Dextropropoxyphene, highly effective liquid chromatography (HPLC), keeping

S U M M A R Y

The method of dextropropoxyphene determination in a biological material by high performance liquid chromatography is developed. Influence of various deproteinization methods on yields of dextropropoxyphene from blood and its conservation in biological tissues is studied at putrefactive processes.