

УДК 543.544.5.068.7

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАКЛОФЕНА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Дукова О.А., Азнаева М.Р.

Научный руководитель – Калякина О.П.

Сибирский федеральный университет

Центр коллективного пользования «Научно-исследовательские методы исследования и анализа новых материалов, наноматериалов и минерального сырья»

Проблема злоупотребления наркотическими веществами, а также средствами, оказывающими подобное действие на организм, приобретает все большие масштабы и начинает угрожать государственной безопасности Российской Федерации.

Особую озабоченность в последнее время вызывает злоупотребление лекарственными препаратами, оказывающими обезболивающее, а также снотворное и седативное действие. Одним из таких веществ является баклофен.

Баклофен – лекарственный препарат, относящийся к группе веществ, влияющих на нервно-мышечную передачу. Оказывает миорелаксирующее, антиспастическое и анальгезирующее действие на организм. Угнетает моно- и полисинаптические рефлексы в спинном мозге; уменьшает тонус мышц.

Активным действующим веществом в препарате «Баклофен» является 4-амино-3-(*пара*-хлорфенил)-масляная кислота – баклофен:



Комплексного исследования баклофена в химико-токсикологическом аспекте не проводилось. Существующие методики определения предусматривают использование дорогостоящих и труднодоступных реагентов и детекторов и сложны для рутинного анализа.

Целью настоящей работы являлась разработка простой, экспрессной, чувствительной методики определения баклофена с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Экспериментальная часть

Исследование проводили в условиях обращено-фазовой ВЭЖХ.

В работе использовали высокоэффективный жидкостной хроматограф Agilent Technologies 1200 с многоволновым диодно-матричным детектором. Колонка Phenomenex Luna 5u C18(2) 100A, 250×4.6 мм; предколонка Eclipse XDB-C18 4-Pack 4.6x12.5 мм, 5 мкм. Температура термостата колонки 30⁰С. Скорость потока 0,8 мл/мин. Объем пробы 20мкл, ввод с помощью автосамплера.

Подвижная фаза: ацетонитрил-раствор *о*-фосфорной кислоты с модификаторами (рН 1,8-5,5), градиентное элюирование, состав подвижной фазы изменялся от 10 до 30% ацетонитрила. Выбор состава подвижной фазы был основан на кислотно-основных свойствах баклофена. Баклофен является амфолитом, так как содержит в молекуле одновременно кислотный и основной центр. Для получения оптимальных параметров удерживания необходимо создание такого значения рН подвижной фазы, при котором молекулы данного вещества будут находиться преимущественно в одной ионной форме, чтобы увеличить хроматографический отклик и предотвратить размывание

хроматографической зоны. Изоэлектрическая точка баклофена находится при значении рН 6,75.

Для создания таких значений рН использовали:

- 10 мМ раствор гидрофосфата калия с добавлением *o*-фосфорной кислоты до нужного значения рН;
- раствор кислоты *o*-фосфорной.

Схема используемой хроматографической системы представлена на рисунке 1. Аналитическая колонка соединена с предколонкой через шестиходовой кран. Когда кран находится в позиции «смыв на предколонку», проба, отобранная автосамплером, попадает на предколонку. Низкомолекулярные вещества не удерживаются на сорбенте предколонки, и элюируются в слив, а лекарственные компоненты и другие высокомолекулярные соединения концентрируются в порах частиц сорбента. Когда кран переключается в позицию «смыв на аналитическую колонку», эти компоненты попадают на аналитическую колонку.

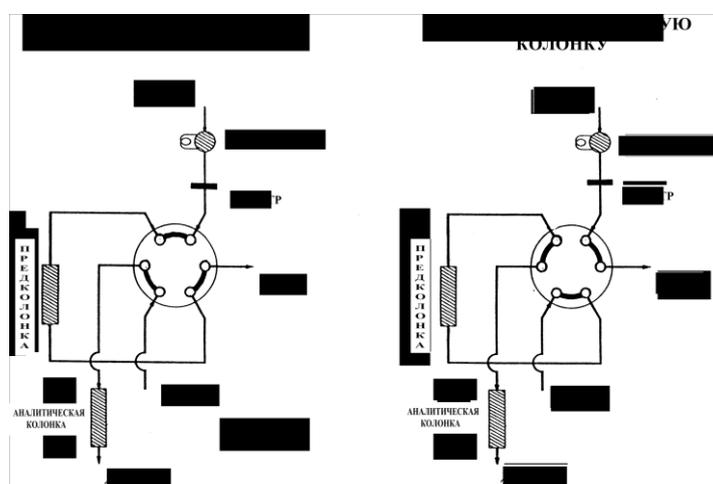


Рис. 1. Схема используемой хроматографической системы

Анализ проводили при длинах волн 220, 259, 266 и 274 нм, регистрация спектра в диапазоне 190-400 нм. Управление прибором и обработку хроматограмм осуществляли с использованием программы ChemStation.

Для приготовления испытуемых растворов таблетку баклофена (10 мг) растворяли в 10 мл этилового спирта (96%). Нерастворимые компоненты таблеток отфильтровывали через фильтр обеззоленный “Синяя лента”. Из полученного раствора концентрацией 1 г/л готовили градуировочные растворы с концентрациями 100; 50; 25; 10; 5; 2,5; 1; 0,5 мкг/мл.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе работы исследовано влияние подвижных фаз различного состава на хроматографические характеристики определения баклофена.

При использовании в качестве водного компонента подвижной фазы 10 мМ раствора гидрофосфата калия с добавлением *o*-фосфорной кислоты время удерживания баклофена и величина аналитического сигнала практически не изменяются с увеличением рН. Минимально определяемая концентрация 1 мкг/мл. Градуировочный график линеен в диапазоне 1-100 мкг/мл (рис. 2а). Во всем диапазоне выбранных значений рН (1,8-5,5) коэффициент корреляции не превышает 0,995 (рН 1,8). В спектре поглощения

наблюдаются максимумы при 220, 259, 266 и 274 нм, наиболее интенсивное поглощение - на 220 нм (рис. 2б).

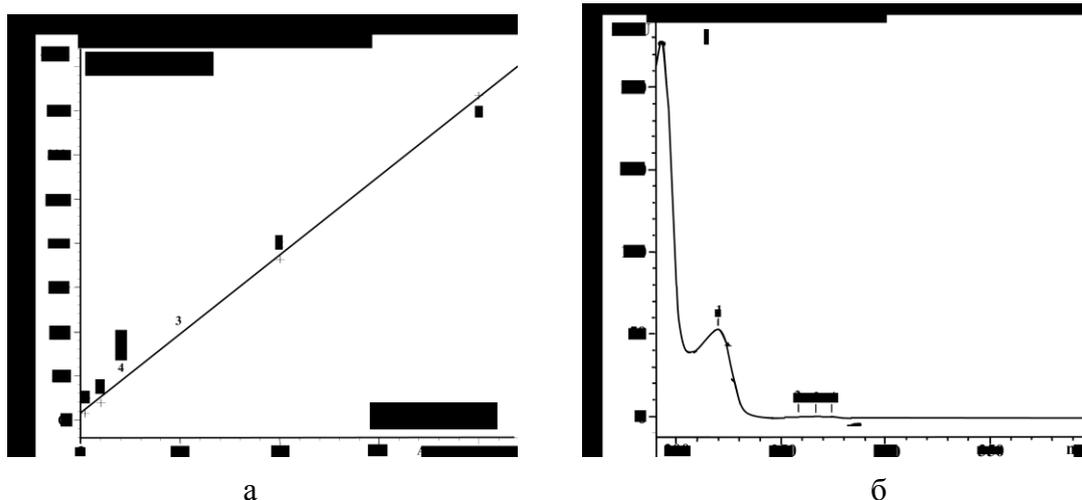


Рис. 2. а) Градуировочный график для определения баклофена методом ВЭЖХ-УФ. рН 1,8 (10 мМ K_2HPO_4 с H_3PO_4); б) спектр поглощения раствора баклофена (1-220 нм; 2-259 нм; 3-266 нм; 4-274 нм)

При использовании *o*-фосфорной кислоты удалось снизить минимально определяемую концентрацию (0,5 мкг/мл) и повысить коэффициент корреляции (0,999), время удерживания уменьшилось с 7,2 для рН 1,8 до 6,3 мин для рН 5,5. При этом чувствительность не изменилась.

Хроматограммы раствора баклофена, полученные при различном составе подвижных фаз, приведены на рис. 3.

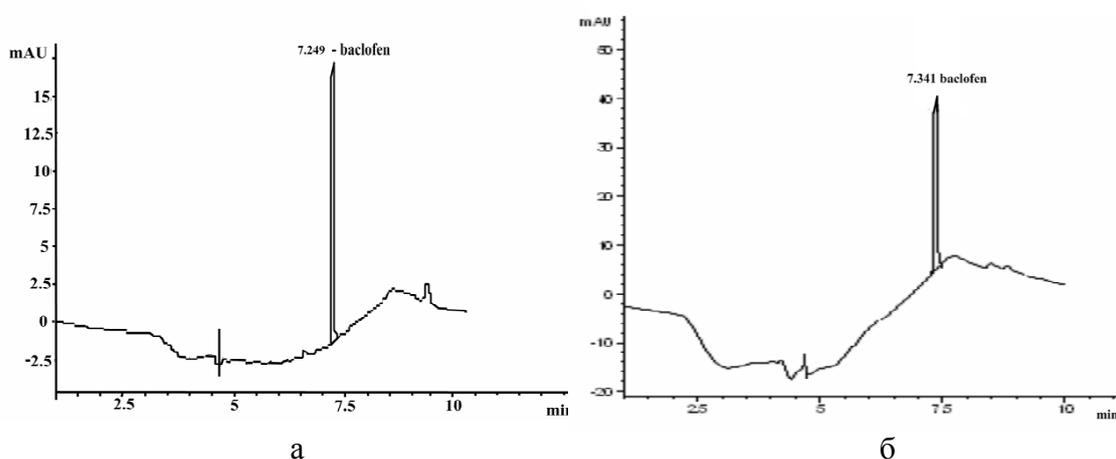


Рис. 3. Хроматограммы стандартного раствора баклофена. $\lambda=220$ нм, $C=10$ мкг/мл. Подвижная фаза: а) ацетонитрил – 10 мМ K_2HPO_4 с H_3PO_4 , рН 1,8; б) ацетонитрил – 0,05 М H_3PO_4 , рН 1,8

Таким образом, предложена методика определения баклофена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектором с использованием в качестве подвижной фазы водных растворов *o*-фосфорной кислоты и гидрофосфата калия.

Показано, что в изученных условиях изменение рН практически не влияет на время удерживания и величину аналитического сигнала.

Предложенную методику можно использовать для судебно-химического и химико-токсикологического исследования при отравлении баклофеном (при соответствующем методе извлечения), а также для определения подлинности препарата при фармацевтическом контроле.