
РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕФОПАМА И ТРАМАДОЛА С ПОМОЩЬЮ ВЭЖХ И ЕЕ ВАЛИДАЦИЯ

М.С. Саркисян, Д.С. Лазарян

Кафедра токсикологической химии ПятГФА
пр. Калинина, 11, Пятигорск, Россия, 357500
тел. +79114636467, эл. почта: somvoz@live.ru

Разработана методика идентификации и количественного определения анальгетиков центрального действия — нефопама и трамадола с применением метода ВЭЖХ. Проведена валидация разработанной методики по следующим показателям: воспроизводимость, специфичность, линейность, точность, диапазон. Установлено, что разработанная методика по всем характеристикам валидна и может быть использована для химико-токсикологического анализа нефопама и трамадола.

Ключевые слова: анальгетики, нефопам, трамадол, парацетамол, морфин, метод ВЭЖХ, валидация.

Борьба с болью, как с послеоперационной, так и в лечении хирургических больных с сопутствующей наркотической зависимостью, является одной из важнейших проблем в медицине. Так же остро стоит проблема профилактики лечения абстинентного синдрома у наркозависимых пациентов. Для этих целей широко используют анальгетики как наркотические, так и ненаркотические, а также нестероидные противовоспалительные препараты, обладающие мощным анальгетическим действием. Эти препараты могут использоваться как индивидуально, так и в сочетанном применении [1]. Одни из наиболее часто используемых анальгетиков, применяемых для данной группы больных, являются трамадол, нефопам, морфин, а также комбинации морфина с ними, уменьшающие дозировки опиоидного анальгетика. Анальгетики как наркотические, так и ненаркотические широко применяются наркозависимыми пациентами для самостоятельного купирования болевого абстинентного синдрома [1]. Потенцирование действия анальгетиков, а также неконтролируемый прием безрецептурных анальгетиков может привести к отравлениям, в том числе и со смертельным исходом [2]. Для установления причины отравления, выбора метода детоксикации, коррекции схемы лечения важно контролировать содержание этих лекарственных веществ в организме. В связи с этим нами разработана методика обнаружения трамадола, нефопама, парацетамола и морфина при их приеме в различных сочетаниях методом ВЭЖХ, а также оценка пригодности данной методики.

При разработке методики ВЭЖХ анализа хроматографировали растворы стандартных образцов изучаемых анальгетиков в изократическом и градиентном режиме с детекцией при длинах волн 230, 246, 244, 262, 272 и 326 нм на микроколлонном жидкостном хроматографе «Милихром А-02». На стадии разработки методики оценивалась устойчивость аналитической системы к изменениям соотношения и скорости потока подвижной фазы, значения рН, температуры термостата колонки. На основании полученных данных выбраны следующие условия: хроматографическая колонка размером 2 × 75 мм, заполненная обращенно-фазовым сорбентом ProntoSil 120-5С АQ. Подвижная фаза: элюент А — 0,1% раствор кислоты трифторуксусной, элюент Б — ацетонитрил, скорость потока —

100 мкл/мин.; аналитические длины волн — 230, 244, 262, 272 и 285 нм; время измерения — 0,18 сек.; температура термостата колонки — комнатная; градиент от 10% до 20% за 10 мин., от 20% до 80% за 10 мин., далее изократично 80% ацетонитрила — 5 минут; общее время хроматографирования — 25 минут; объем пробы — 10 мкл. Расчеты количественного содержания изучаемых лекарственных веществ проводили по величинам площадей пиков растворов стандартных образцов при соответствующих длинах волн.

Идентификация изучаемых анальгетиков проводилась по времени удерживания изучаемых лекарственных веществ в найденных оптимальных условиях хроматографирования, а также по их спектральным отношениям. При хроматографировании в указанных условиях смеси растворов нефопама, трамадола, парацетамола и морфина обнаружено 4 пика, соответствующих по времени удерживания пикам их рабочих стандартных образцов.

Для валидационной характеристики разработанной методики нами выбраны следующие параметры: воспроизводимость, специфичность, линейность, точность [3]. Воспроизводимость (прецизионность) методики рассматривали на уровне внутрилабораторной проверяемости (табл. 1).

Таблица 1

Результаты хроматографирования нефопама и трамадола методом ВЭЖХ

№ п/п	Время удерживания (мин)	Метрологические характеристики
1.	Нефопам	$\bar{R} = 17,24$ $SD = 0,03$ $RSD = 0,15\%$
1.1	17,26	
1.2	17,25	
1.3	17,21	
1.4	17,26	
1.5	17,20	
1.6	17,23	
2.	Трамадол	$\bar{R} = 15,92$ $SD = 0,27$ $RSD = 0,17\%$
2.1	15,92	
2.2	15,88	
2.3	15,94	
2.4	15,89	
2.5	15,92	
2.6	15,95	

Рассчитанное значение относительного стандартного отклонения не превышает 1%, что свидетельствует о минимальной величине случайной погрешности. Поскольку нефопам и трамадол могут применяться совместно с парацетамолом и морфином, нами была проверена в этих же условиях специфичность данной методики. Результаты представлены на рис. 1.

Данные рисунка свидетельствуют о специфичности методики, которая позволяет разделить исследуемые лекарственные вещества при совместном присутствии, в том числе с морфином и парацетамолом. В этих же условиях были определены их времена удерживания, которые равны для морфина 2,7, парацетамола — 8,6 минут. Кроме того, в найденных условиях были определены коэффициенты разделения изучаемых лекарственных веществ, которые составили: морфин-парацетамол (1,04), парацетамол-трамадол (16,6), трамадол-нефопам (4,8). Полученные данные подтверждают селективность неподвижной фазы по отношению к указанным парам компонентов, а также о возможности их надежного разделения в данных условиях.

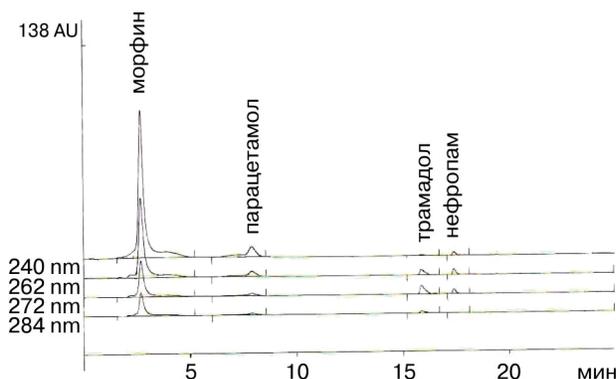


Рис. 1. Хроматограмма смеси растворов стандартных образцов изучаемых лекарственных веществ

Дополнительной характеристикой, позволяющей идентифицировать изучаемые лекарственные вещества, служат спектральные отношения (отношения площадей пиков при разных длинах волн). Были выбраны следующие спектральные отношения: для нефопама $S_{262}/S_{240} = 1,371$, трамадола $S_{272}/S_{262} = 1,772$, парацетамола $S_{240}/S_{230} = 1,141$, морфина $S_{272}/S = 1,56$.

Для установления диапазона применения методики определена линейность с использованием растворов рабочих стандартных образцов изучаемых лекарственных веществ. Графики линейной зависимости и коэффициент корреляции представлены на рис. 2.

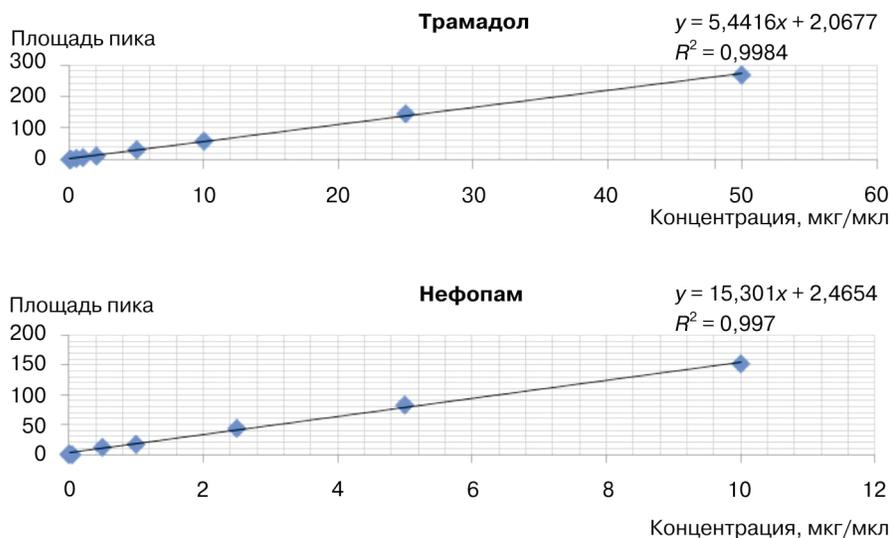


Рис. 2. Графики линейной зависимости площади пика от концентрации раствора нефопама, трамадола

Данные рис. 2 свидетельствуют о том, что диапазон применения методики находится в пределах концентраций для нефопама (0,001—50 мкг/мкл), трамадола (0,01—50 мкг/мкл).

Для определения точности методики нами были приготовлены стандартные растворы исследуемых лекарственных веществ в трех концентрациях, которые хроматографировали в найденных оптимальных условиях. Для оценки полученных результатов использовали открываемость (R). Данные представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты количественного определения нефопама и трамадола

№ п/п	Содержание, мкг		Открываемость, %	Метрологические характеристики
	взято	найдено		
1. Нефопам				
1.1.1	0,05	0,0498	99,6	$\bar{R} = 99,94\%$ $SD = 0,88$ $RSD = 0,88\%$ $\Delta \bar{R} = 0,69$ $\bar{R} \pm \Delta \bar{R} = 99,94 \pm 0,69$
1.1.2	0,05	0,0490	98,1	
1.1.3	0,05	0,0505	101,0	
1.2.1	1	0,996	99,6	
1.2.2	1	1,001	100,1	
1.2.3	1	0,999	99,9	
1.3.1	10	9,97	99,7	
1.3.2	10	10,084	100,84	
1.3.3	10	10,068	100,68	
2. Трамадол				
2.1.1	0,1	0,1	100	$\bar{R} = 99,56\%$ $SD = 1,14$ $RSD = 1,15\%$ $\Delta \bar{R} = 0,90$ $\bar{R} \pm \Delta \bar{R} = 99,56 \pm 0,90$
2.1.2	0,1	0,1001	100,12	
2.1.3	0,1	0,1002	100,23	
2.2.1	1	0,999	99,9	
2.2.2	1	0,975	97,5	
2.2.3	1	0,999	99,9	
2.3.1	10	10,115	101,15	
2.3.2	10	9,924	99,24	
2.3.3	10	9,801	98,01	

Границы открываемости с учетом доверительного интервала не выходят за пределы 98—102%, что характеризует точность разработанной методики.

Таким образом, предложенная нами методика идентификации и количественного определения нефопама и трамадола методом ВЭЖХ отличается достоверной точностью, воспроизводимостью, линейностью, селективностью и может быть использована в их химико-токсикологическом анализе.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики на современном этапе / Под ред. В.А. Клевню // Материалы Всерос. науч.-практ. конф. с межд. участием, посвящ. 75-летию Рос. центра суд.-мед. экспертизы 18—20 окт. 2006. — М.: РИО ФГУ «РЦСМЭ Росздрава», 2006. — С. 132—135.
- [2] Клиническая токсикология детей и подростков / Под ред. И.В. Марковой, В.В. Афанасьевой, Э.К. Цыбулькиной, М.В. Неженцевой. — СПб.: Интермедика, 1998. — Т. 1. — 302 с.
- [3] Эпштейн Н.А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. — 2000. — Т. 38. — № 4. — С. 40—51.

**DEVISE ARE METHOD TECHNIQUES
OF IDENTIFICATION AND QUANTITATIVE DEFINITION
NEFOPAM AND TRAMADOL BY MEANS
OF HPLC ITS VADIDATION**

M.S. Sarkisyan, D.S. Lazarjan

Faculty of toxicological chemistry
Pyatigorsk State Academy of Pharmacy
prosp. Kalinin, 11, Pyatigorsk, Stavropol territory, 375500
tel. +79114636467, email: somvoz@live.ru

The technique of identification and quantitative definition analgesic the central action — nefopam and tramadol with application of method HPLC is developed. It is spent validation the developed technique on following indicators: reproducibility, specificity, linearity, accuracy, a range. It is established, that the developed technique under all characteristics is valid and can be used for the chemical-toxicological analysis nefopam and nefopam.

Key words: analgesics, nefopam, nefopam, paracetamol, morphine, method HPLC, validation.