

О. А. Дукова<sup>1</sup>, Е. А. Краснов<sup>2</sup>, А. А. Ефремов<sup>1</sup>**РАЗРАБОТКА ВЭЖХ-МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАКЛОФЕНА**<sup>1</sup> ФГАОУ ВПО "Сибирский федеральный университет", Красноярск, Россия<sup>2</sup> ГБОУ ВПО "Сибирский государственный медицинский университет", Томск, Россия

Разработана методика качественного и количественного определения баклофена методом ВЭЖХ с УФ-детектором. Подобраны условия для наибольшей чувствительности определения баклофена методом ВЭЖХ. Наиболее оптимальным вариантом определения баклофена методом ВЭЖХ на неполярных колонках является использование 10 мМ раствора триэтиламина в качестве водного компонента подвижной фазы.

**Ключевые слова:** баклофен; ВЭЖХ; модификаторы подвижной фазы.

В настоящее время наблюдается постоянное увеличение количества отравлений лекарственными средствами, обладающими обезболивающим, снотворным и седативным действием. Большинство этих препаратов находится в свободном доступе в аптечной сети. Одним из них является баклофен.

По своей химической структуре баклофен является 4-амино-3-(4-хлорфенил)бутановой кислотой (рис. 1). Основное проявление его фармакологической активности — антиспастическое действие; он уменьшает мышечное напряжение и оказывает также анальгезирующее действие [1].

Баклофен представляет собой белый или почти белый порошок, мало растворим в воде, очень мало растворим в 96 % этаноле, практически не растворим в ацетоне, эфире и хлороформе [2, 3].

Для анализа баклофена используют метод газовой хроматографии, газовой хроматомасс-спектрометрии и ВЭЖХ с ультрафиолетовым, флуоресцентным, масс-селективным или электрохимическим детекторами [2, 4 – 7]. Анализ литературных данных показал, что описанные в литературе методики определения баклофена обладают рядом недостатков: предусматривают использование дорогостоящих и труднодоступных реагентов, таких как *o*-фталевый альдегид, ион-парные реагенты и др. [4 – 5], а также сложны в использовании для рутинных анализов.

Вместе с тем в литературе описаны случаи острых отравлений при передозировке баклофена [8, 9]. При этом концентрация баклофена достигает в сыворотке крови 1,1 – 3,5 мг/л (токсическая концентрация). Передозировка препарата может привести к летальному исходу; в этом случае концентрация баклофена в сыворотке крови достигает 17 мг/л, а в моче — 760 мг/л [2, 10].

Для обнаружения и количественного определения баклофена нужно иметь надежные, достоверные и

доступные методы его качественного и количественного определения. В связи с этим целью работы являлся поиск оптимальных условий определения баклофена методом обращено-фазовой ВЭЖХ.

*Экспериментальная часть*

Для анализа использовали субстанцию баклофена с характеристиками, соответствующими литературным данным: т. пл. 205 – 207 °С, ИК-спектр (КВг) 1527, 835, 1574, 1495, 1624, 1095 см<sup>-1</sup> [2, 3]. Для приготовления исходного раствора баклофена с концентрацией 1 мг/мл точную навеску субстанции баклофена (10 мг) растворяли в 10 мл 0,1 М хлороводородной кислоты. Калибровочные растворы были получены путем разбавления исходного раствора.

Исследования проводили с использованием жидкостного хроматографа Agilent Technologies 1200 (США) с диодно-матричным детектором. Колонка Phenomenex Luna 5u C18(2), 250 × 4,6 мм, 5 мкм; предколонка Eclipse XDB-C18 4-Pack 4,6 × 12,5 мм, 5 мкм. Скорость потока для аналитической колонки 0,8 мл/мин. Температура термостата колонки 30 °С; объем пробы 20 мкл. Регистрация поглощения осуществлялась при длинах волн 220, 259, 266 и 274 нм, т.к. при этих длинах волн наблюдаются максимумы в спектре поглощения баклофена (рис. 2).

Подвижная фаза (ПФ): ацетонитрил — водные растворы модификаторов ПФ (рН 1,8 – 5,5), градиентное элюирование — доля ацетонитрила в элюенте изменялась от 10 до 30 % в течение 10 мин.

Для стабилизации значения рН водного компонента ПФ использовали:

- раствор *o*-фосфорной кислоты, рН от 1,8 до 5,5;
- раствор гидрофосфата калия с *o*-фосфорной кислотой, рН от 1,8 до 5,5;
- фосфатный буферный раствор, рН 8,0;
- раствор триэтиламина, рН 9,5.

Количественное определение баклофена проводили при длине волны 220 нм. Управление прибором и обработку хроматограмм осуществляли с использованием программы ChemStation.

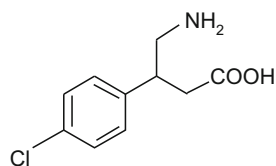


Рис. 1. Структурная формула баклофена.

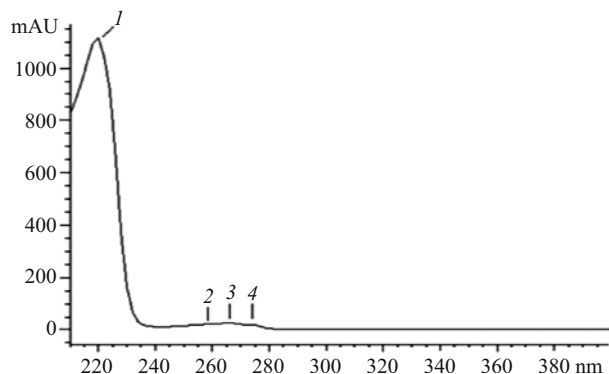


Рис. 2. УФ-спектр баклофена, время удерживания 7,53 мин,  $C = 10$  мкг/мл (максимумы поглощения, нм: 1 – 220; 2 – 259; 3 – 266; 4 – 274).

### Результаты и их обсуждение

ПФ состоит из основных и второстепенных компонентов. Второстепенные компоненты (< 5 %) носят название модификаторов ПФ. Типичными модификаторами ПФ являются неразбавленные кислоты и органические основания, а также буферные системы и ион-парные реагенты. Было исследовано влияние различных модификаторов ПФ на чувствительность определения баклофена.

Выбор модификаторов ПФ был основан на кислотнo-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 pH подвижной фазы, при котором молекулы данного вещества будут находиться преимущественно в одной ионной форме, чтобы увеличить хроматографический отклик и предотвратить размывание хроматографической зоны. Изoeлектрическая точка баклофена находится при значении pH 6,75.

Определение проводили в диапазоне pH 1,8 – 9,5, соответствующем рабочему диапазону большинства неполярных колонок для обращенно-фазового варианта жидкостной хроматографии. В качестве модификатора ПФ для создания кислых значений pH выбрана *o*-фосфорная кислота и ее соли, т.к. ее растворы имеют минимальное поглощение в диапазоне длин волн 190 – 400 нм. Для создания щелочной среды элюента использовали сильное органическое основание — триэтиламин ( $pK_a$  10,87).

Установлено, что спектр раствора баклофена не изменяется в исследуемом диапазоне pH (1,8 – 9,5), при использовании подвижных фаз с pH 1,8 – 5,5 время

Таблица 1  
Время удерживания баклофена при использовании различных модификаторов подвижных фаз

Модификатор подвижной фазы	pH	Время удерживания, мин
$H_3PO_4 + K_2HPO_4$	2,5	$7,42 \pm 0,01$
$H_3PO_4$	3,5	$6,30 \pm 0,07$
$K_2HPO_4 + Na_2HPO_4$	8,0	$7,32 \pm 0,03$
$(C_2H_5)_3N$	9,5	$7,53 \pm 0,01$

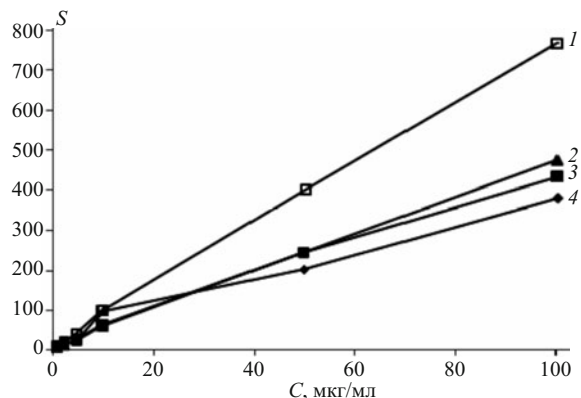


Рис. 3. Зависимость площади пика от концентрации баклофена при различных значениях pH: 1 – 9,5; 2 – 8,0; 3 – 3,5; 4 – 2,5.

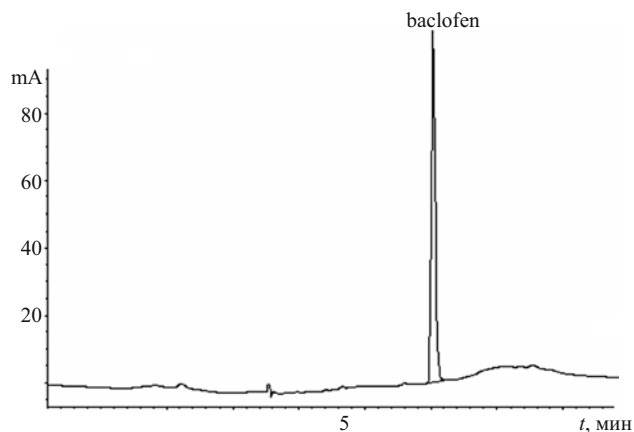
удерживания баклофена и величина аналитического сигнала практически не изменяются в зависимости от состава ПФ и величины pH.

При использовании фосфатного буферного раствора с pH 8,0 время удерживания баклофена совпадает (с учетом погрешности) со временем удерживания при pH 2,5 (табл. 1). Величина аналитического сигнала незначительно увеличивается при высоких концентрациях по сравнению с данными, полученными для pH < 7.

В случае применения в качестве модификатора водного компонента ПФ раствора триэтиламина с pH 9,5 наблюдается увеличение аналитического сигнала при-

Таблица 2  
Оценка правильности и повторяемости методики количественного определения баклофена

Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	$x_{cp}$	$S$	$\Delta X_{cp}$	Отклонение от истинного, %
0,50	0,52	0,52	0,02	0,06	4,0
	0,54				
1,00	0,49	1,05	0,03	0,07	5,0
	1,08				
	1,02				
5,00	1,05	5,06	0,08	0,19	1,2
	5,12				
	5,08				
10,0	4,97	9,6	0,1	0,3	4,0
	9,72				
	9,69				
15,0	9,50	14,7	0,1	0,3	2,0
	14,78				
	14,81				
25,0	14,58	26,0	0,1	0,3	4,0
	26,10				
	25,86				
30,0	25,91	28,7	0,1	0,3	4,3
	29,58				
	28,66				
40,0	28,93	40,5	0,1	0,3	1,25
	40,55				
	40,34				
50,0	40,58	51,7	0,2	0,5	3,4
	51,55				
	51,72				
	51,93				



**Рис. 4.** Хромограмма раствора баклофена.  $\lambda = 220$  нм,  $c = 20$  мкг/мл, подвижная фаза: ацетонитрил — раствор триэтиламина, pH 9,5.

мерно в 2 раза по сравнению с величиной аналитического сигнала для подвижных фаз с pH < 7.

Сравнение зависимости площади пика от концентрации для различных значений pH представлено на рис. 3. На основании сравнения зависимости площади пика от концентрации баклофена в растворе сделан вывод о том, что самая высокая чувствительность наблюдается при использовании в качестве модификатора ПФ раствора триэтиламина. Это может быть связано с образованием межмолекулярных связей между молекулами баклофена и триэтиламина. Возможно триэтиламин, как органическое основание, выступает в роли ион-парного реагента. Таким образом, применение триэтиламина в качестве модификатора ПФ значительно повышает чувствительность определения баклофена.

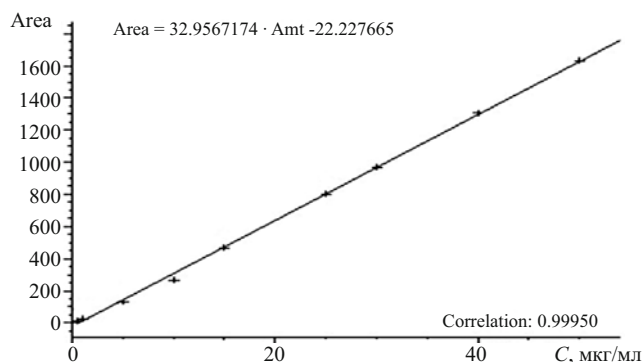
На рис. 4 приведена хромограмма раствора баклофена, полученная в обращенно-фазовом варианте метода жидкостной хроматографии с использованием триэтиламина в качестве модификатора подвижной фазы.

**Линейность методики** доказана в диапазоне концентраций от 0,5 до 50 мкг/мл (рис. 5). Уравнение зависимости аналитического сигнала от концентрации баклофена имеет вид:

$$y = 32,9567x - 22,2277,$$

коэффициент корреляции 0,9995. Данный интервал концентраций баклофена можно определить как аналитическую область методики.

Метрологические характеристики методики представлены в табл. 2.



**Рис. 5.** Градуировочный график количественного определения баклофена методом ВЭЖХ. По оси абсцисс — концентрация баклофена; по оси ординат — интенсивность в относительных единицах интегрирования.

**Правильность и повторяемость методики** устанавливали методом “введено — найдено” по 9 концентрационным уровням градуировочного графика в 3 параллельных измерениях. Согласно представленным данным (табл. 2) отклонение от истинного значения составляет 1,2 – 5,0 %.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что наиболее оптимальным вариантом для определения баклофена методом ВЭЖХ на неполярных колонках является использование 10 мМ раствора триэтиламина в качестве водного компонента подвижной фазы. Предложенная методика количественного определения баклофена характеризуется линейностью, правильностью и повторяемостью.

## ЛИТЕРАТУРА

1. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Новая волна, Москва (2010).
2. *Clarke's analysis of drugs and poisons*, A. C. Moffat, M. D. Osseton and B. Widdop (ed.), Pharm. Press, London (2011).
3. R. C. Baselt, *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*, 8th ed., Biomedical. Pub., Foster city, CA (2009).
4. G. M. Wall, J. K. Baker, *J. Chromatogr.*, **491**, 151 – 162 (1989).
5. H. Spahn, D. Kraub, E. Mutschler, *Pharm. Res.*, **37**(2), 181 – 184 (1988).
6. L. Ersoy, S. Tosunoglu, *Analyst*, **120**, 373 – 375 (1995).
7. M. Flardh, B. M. Jacobson, *J. Chromatogr. A*, **846**, 169 – 173 (1999).
8. A. Haubenstock, K. Hruby, U. Jager, K. Lenz, *J. Clin. Toxicol.*, **20**, 59 – 68 (1983).
9. A. D. Fraser, W. MacNeil, A. F. Isner, *J. Forensic. Sci.*, **36**, 1596 – 1602 (1991).
10. N. De Giovanni, E. d'Aloja, *Forensic Sci Int.*, **1263** (1), 26 – 32 (2001).

Поступила 16.05.13

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HPLC METHOD FOR BACLOFEN DETERMINATION

O. A. Dukova<sup>1</sup>, E. A. Krasnov<sup>2</sup>, and A. A. Efremov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Siberian Federal University, Krasnoyarsk, 660041 Russia

<sup>2</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

A method for the quantitative and qualitative determination of baclofen has been developed based on high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV-detection. Conditions for the maximum sensitivity of baclofen detection by HPLC have been selected. The optimum regime of baclofen determination by HPLC on a nonpolar column employs a 10 mM triethylamine solution as the aqueous component of the mobile phase.

**Keywords:** baclofen, HPLC, mobile phase modifiers