

УДК 543.544; 547.596.2

Т. Губецька, студ.;  
В. Левчик, канд. хім. наук;  
Н. Кобилінська, канд. хім. наук  
kobilinskaya@univ.kiev.ua  
КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

## СУЧАСНІ ТЕНДЕНЦІЇ ГАЗОХРОМАТОГРАФІЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ НІКОТИНУ В ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ ТЮТЮНЗАМІСНОЇ ТЕРАПІЇ

*Розроблено просту, швидку і екобезпечну аналітичну методику для визначення нікотину в деяких фармацевтичних препаратах. Методика включає в себе швидку рідинну екстракцію органічними розчинниками з подальшим кількісним визначенням капілярною газовою хроматографією з полум'яно-іонізаційним детектором (ГХ-ПІД). Досліджено та оптимізовано параметри, що впливають на ефективність вилучення діючої речовини з ЛЗ (природа розчинника, об'єм екстрагенту та час екстрації, пробопідготовка). Три різні органічні розчинники було використано як екстрагенти – метанол, етанол та хлороформ. При екстракції метанолом з полімерної матриці жувальної гумки не вдалося досягнути повного вилучення нікотину за прийнятний час аналізу. Показано, що кількісне вилучення нікотину із пластиру досягається екстрагуванням  $\text{CHCl}_3$  протягом 1 годин, а з жувальної гумки – 30 хв. Встановлено, що екстракційне вилучення нікотину етанолом в фармпрепаратах є непридатним, через часткове окиснення аналіту. Межа виявлення розробленої газохроматографічної методики визначення нікотину становить 0,25 мкг/мл (за  $3\delta$ -критерієм). Градувальні залежності лінійні в інтервалі концентрацій 0,0005–1000,0 мг/мл. Цей інструментальний метод буде успішно застосований для визначення вмісту нікотину в жувальній гумці та трансдермальному пластирі з відносним стандартним відхиленням, відповідно, 0,4 та 2,0%.*

*Ключові слова:* рідинна екстракція, нікотин, лікарські засоби, жувальна гумка, трансдермальний пластр, газохроматографічний аналіз.

**Вступ.** В наш час існують ефективні методи лікування тютюнозалежності, які надають реальну можливість поліпшити якість життя без паління. Ключовий момент багатокомпонентної допомоги пацієнтам при лікуванні тютюнозалежності є використання нікотинвмісних лікарських засобів (ЛЗ) [1]. Вони підтримують базовий рівень нікотину в крові і зменшуючи тяжкість проявів синдрому тютюнозалежності, дозволяють спрямувати сили курця на подолання психологічної залежності і, таким чином, підвищують ефективність позбавлення від тютюнової залежності. Нікотинвмісні фармацевтичні препарати не створюють, характерних для паління сигарет, високих концентрацій нікотину в крові, загальна доза якого коливається від третини до половини тієї, що отримується з сигаретою [2,3]. До сучасних лікарських засобів нікотинзамісної терапії відносять фармацевтичні препарати у формі жувальних гумок, спреїв, трансдермальних пластирів та таблеток [4, 5].

Хоча різні інструментальні методи знайшли застосування для аналізу нікотину і його метаболітів в тютюні та біологічних рідинах людини, в т.ч. капілярний електрофорез [6] та газова хроматографія [7], але їх використання при аналізі нікотинвмісних ЛЗ обмежене. Відповідно до монографії Європейської Фармакопеї кількісне визначення нікотину у субстанції проводять неводним потенціометричним титруванням з хлоратною кислотою [8], тоді як фармакопея США (USP) регламентує - газохроматографічний аналіз з полум'яно-іонізаційним детектуванням (ГХ-ПІД) [9]. Згідно з USP, контроль вмісту нікотину в фармацевтичних препаратах проводять виключно високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ) з УФ-детектуванням й лише для тих ЛЗ, до яких нікотин входить у вигляді солей: дитартрату або поларикаксу [9, 10]. Проте всі ці методики ВЕРХ передбачають використання дорогих і шкідливих для навколишнього середовища та здоров'я людини органічних розчинників, а також потребують складної пробопідготовки з значними затратами часу на рідинно-рідинну екстракцію. Адже хроматографічному визначенню нікотину в фармацевтичних композиціях передують стадія екстракції аналіту неполярним або слабополярним розчинником, з послідовною рідинно-рідинною екстракцією нікотину в кислому або лужному середовищі. Зазвичай, для досягнення кількісного вилучення нікотину в водну фазу необхідно два або більше екстракційних цикли кожен з яких займає до 24 годин. Описано в літе-

ратурі полярографічне та вольтамперометричне визначення нікотину в лікарських засобах [11,12], а також біосенсори [13, 14], але через погану відтворюваність ці методи не знайшли широкого практичного застосування, в т.ч. й серед методик Державної Фармакопеї України [15]. Описано міцелярну ВЕРХ з колонкою С18 та рухомою фазою, що містить додецилсульфат натрію з межею визначення (МВ) на рівні 4 нг/мл [16], а також йон-парну хроматографію [11]. Останні дослідження показали [18], що обробка ультразвуком зразків в органічних розчинниках є вигідною альтернативою для прискорення екстракції нікотину з фармацевтичних препаратів з наступним ГХ-ПІД детектуванням (МВ=0,25 мкг/мл). Показано, що ефективність екстракції нікотину з трансдермального пластиру досягається за 1 годину при нагріванні до температури 37°C з використанням гептану як розчинника. Але, незважаючи на це, для аналізу нікотину в жувальних гумках та трансдермальних препаратах на практиці широкого застосування набули лише різні види ВЕРХ, наприклад (МКВ=0,31 мкг/мл [17]), які дають можливість аналізувати проби на вміст нікотину з високою точністю, чутливістю та селективністю, а рідинно-рідинна екстракція, яка не відповідає сучасним вимогам щодо експресності та екобезпечності, залишається найпоширенішим способом пробопідготовки для таких ЛЗ. Таким чином, розробка нових методик та поліпшення хіміко-аналітичних характеристик існуючих методик визначення нікотину в фармацевтичних препаратах залишається актуальною задачею.

**Мета роботи** полягала в розробці методики газо-хроматографічного визначення нікотину в лікарських засобах тютюнозамісної терапії доступних на фармацевтичному ринку України, спрощенні та оптимізації пробопідготовки для вилучення діючих речовин в трансдермальному пластирі та жувальній гумці.

**Об'єкти і методи дослідження:** У роботі використовували  $\text{CHCl}_3$ , MeOH, EtOH хроматографічної чистоти, стандарт нікотину (99,8%, Sigma-Aldrich). Наважку нікотину зважували на аналітичних вагах фірми METTLER TOLEDO AB54 з точністю 0,0001 г (10 мг-51 г). Стандартний розчин нікотину готували розчиненням точної наважки аналіту в хлороформі (1 мг/мл). Градувальні розчини готували шляхом розведення стандартного розчину відповідним розчинником (хлороформом, метанолом та етанолом), отримано наступні розчини: 0,8; 0,4; 0,1; 0,08; 0,04 мг/мл нікотину.

Об'єктами дослідження обрано ЛЗ фірми "НІКОРЕТТЕ"<sup>®</sup> (Виробник: МакНіл АБ, Швеція): трансдермальний пластир 15 мг (1 пластир з силою дії 15 мг/16 год містить нікотину 23,62 мг) та жувальну гумку зі смаком свіжої м'яти (1 гумка лікувальна містить нікотин-полімерний комплекс 22,0 мг, що відповідає нікотину 4 мг).

Ультразвукову обробку проб проводили на установці *Elmasonic P 30N* на частоті 80 кГц протягом 15-45 хв при кімнатній температурі та нагріванні до 35°C. Центрифугування проводили на мікроцентрифузі *Thermo Scientific Espresso*.

Аналіз проводили на газовому хроматографі "Agilent 6890"; колонка HP-5, 30м×0,32мм×0,25 мкм; детектор – полум'яно-іонізаційний (ПІД); Газ-носієй – He (ТУ 51-40-80); Водень технічний (марки А, ГОСТ 3022-80); Повітря стиснене (ГОСТ 17433-80 клас 0); Аналіз нікотину проводили за підібраними умовами хроматографування: Швидкість потоку He - 2,0 мл/хв. Проби вводили в режимі без поділу потоку газу-носія (Splitless). Початкову температуру печі 50°C збільшували до 200°C зі швидкістю 10°C/хв. Температура інжектора і детектора, відповідно, 270°C і 350°C. Об'єм введеної проби - 1 мкл.

**Пробопідготовка. Екстракція нікотину із трансдермального пластиру:** До наважки пластиру масою 0,019±0,003 мг (1/12 від заявленої маси) додавали 0,5; 1,0; 2,0 мл розчинника. Екстракцію проводили протягом 30, 60, 75, 85 хвилин при механічному струшуванні. Одержаний екстракт центрифугували 5 хв при 12000 об/хв, фільтрували через паперовий фільтр "синя" стрічка, а потім через мембранний фільтр.

**Екстракція нікотину із жувальної гумки:** До наважки жувальної гумки масою 0,021±0,003 мг (1/16 від заявленої маси), із вмістом нікотину 0,25 мг, додавали 0,5, 1, 2,0 мл розчинника. Щільно закривали пробкою, перемішували на механічному струшувачі або піддавали ультразвуковій обробці протягом 15, 30, 60 хвилин. Одержаний екстракт фільтрували через мембранний фільтр.

**Результати та їх обговорення.** Оптимізацію умов рідинної екстракції проводили змінюючи природу (полярний чи неполярний) та об'єм розчинника, тривалість контакту фаз, а також використовуючи ультразвукову та термічну обробку. Ефективність рідинної екстракції значною мірою залежить від вибору екстракційного розчинника. В представленій роботі як екстрагенти використовували хлороформ, метанол та етанол. Встановлено, що ступінь вилучення нікотину з трансдермального пластиру метанолом при механічному перемішуванні за кімнатної температури впродовж 60 хв становив 99,9 % (рис. 1). При використанні ультразвукової обробки час екстракції аналізу з матриці зменшувався на 20 %.

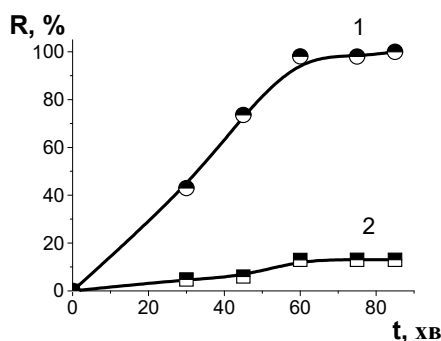


Рис. 1. Залежність ступеня вилучення нікотину метанолом від часу екстракції із трансдермального пластиру (1) та жувальної гумки (2) ( $V_{\text{розч}} = 1 \text{ мл}$ ,  $g = 20 \text{ мг}$ )

Оптимізацію об'єму екстрагента проводили при постійній наважці, розчиняючи його в різних об'ємах роз-

чинника в діапазоні 0,5–2 мл. Встановлено, що максимальний ступінь вилучення аналіту з фармацевтичних препаратів спостерігався при екстракції 1 мл розчинника. Максимальний ступінь вилучення нікотину метанолом з трансдермального пластиру при механічному струшуванні досягається за 1 годину екстракції (рис. 1). Як видно з рис. 1, при використанні метанолу як екстрагенту не вдається досягнути кількісного вилучення нікотину з полімерного комплексу жувальної гумки. При високочастотній ультразвуковій обробці проби ефективність вилучення нікотину з полімерної матриці жувальної гумки поліпшується незначно (до 20%), після чого кількість вилученого аналіту не змінюється. Термічна обробка проби не вплинула на ефективність екстракції нікотину з полімерної матриці. Повне розчинення полімерної частини матриці жувальної гумки та кількісного вилучення нікотину було досягнуто лише при використанні хлороформу як екстрагента. Час екстракції не перевищував 30 хв, навіть без перемішування та додаткової обробки ультразвуком.

Умови хроматографічного розділення екстрактів, що містили нікотин, оптимізували шляхом регулювання швидкості потоку газу-носія, вибором температурного режиму печі та інжектора. Використовуючи модельну суміш, що містила стандарт нікотину було підібрано умови хроматографування, за якими розділення піків нікотину і супутніх речовин, відповідає  $R_s$  критерію ( $R_s \geq 1$ ). На хроматограмі екстракту нікотину  $\text{CHCl}_3$  із трансдермального пластиру пік нікотину спостерігається на 9,3 хв (рис. 2).

На отриманих хроматограмах екстрактів нікотину з метанолу та хлороформу відсутні піки близькі за часом утримання до стандарту нікотину (рис. 2). Показано, що ефективність екстракції нікотину метанолом та етанолом з фармацевтичних препаратів близька, однак, на хроматограмах екстрактів нікотину етанолом спостерігається розщеплення піку досліджуваної речовини (рис. 3), що, ймовірно, пов'язано з частковим окисненням нікотину екстрагентом та появою продуктів деградації нікотину [8]. Таким чином, за умов проведення екстракції нікотину етанолом з нікотинвмісних ЛЗ нікотинзамісної терапії є непридатною.

Вміст нікотину в досліджуваних об'єктах визначали з градувальних залежностей, що були побудовані в області лінійності, наведених в таблиці 1.

З урахуванням визначених умов хроматографування проведено визначення нікотину у реальних зразках жувальної гумки та трансдермального пластиру компанії НІКОРЕТТЕ<sup>®</sup>, що є референтним препаратом на фармацевтичному ринку України (табл. 2).

Як видно з даних табл. 2, екстракція нікотину хлороформом із фармацевтичних препаратів є найефективнішою серед досліджуваних розчинників. Межа виявлення розробленої газохроматографічної методики визначення нікотину при екстракції хлороформом становить 0,25 мг/мл (за  $3\delta$ -критерієм), градувальна залежність лінійна в інтервалі концентрації 0,0004–1000,0 мг/мл (табл. 1). Розроблена методика була успішно застосована для визначення вмісту нікотину в жувальній гумці та трансдермальному пластиру з відносним стандартним відхиленням, відповідно, 0,4% та 2,0%. Показано, що вміст нікотину в трансдермальному пластиру дещо перевищує зазначений на упаковці виробником (табл. 2), але потрапляє в довірчий інтервал.

Таким чином, хоча запропонована методика для визначення нікотину в ЛЗ за чутливістю і поступається відомі аналоги за екобезпечністю, адже ГХ-ПІД не передбачає використання токсичних органічних розчинників, як мо-

більні фази для ВЕРХ [17]. Знайдено, що використання хлороформу як розчинника для екстракції нікотину дозволяє досягнути його кількісного вилучення, без додаткової термічної та ультразвукової обробки. При цьому

час підготовки одиначної проби в десятки раз менше, ніж для методик ВЕРХ. Крім того, розроблена методика, не поступаючись у чутливості, є більш експресною порівняно з аналогами відомими в літературі [18].

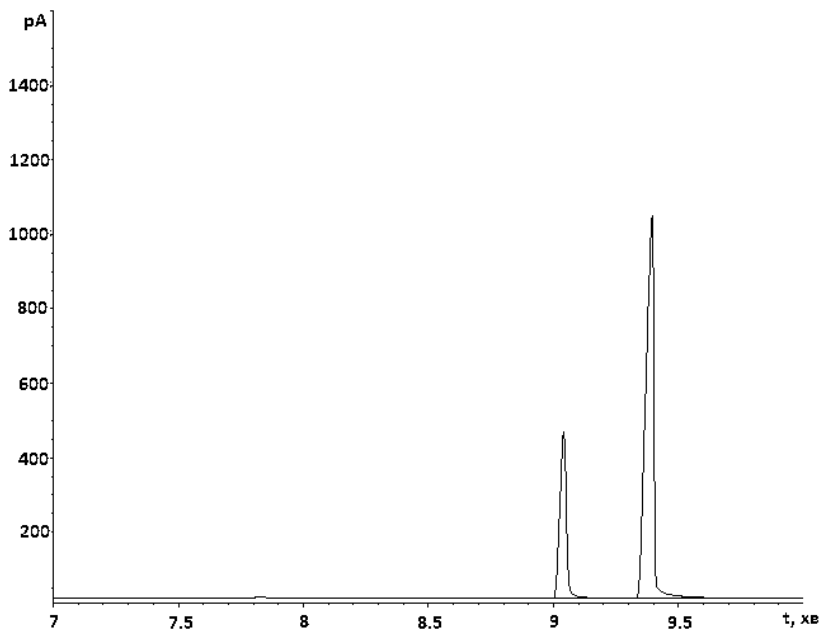


Рис. 2. Хроматограма екстракту нікотину  $\text{CHCl}_3$  із трансдермального пластиру ( $V_{\text{розч}} = 1$  мл,  $g = 19$  мг)

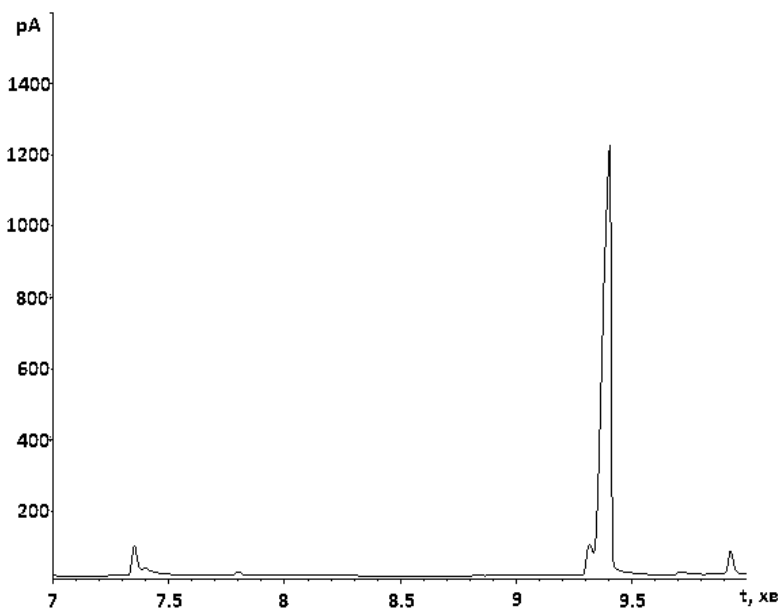


Рис. 3. Хроматограма екстракту нікотину етанолом із трансдермального пластиру ( $V_{\text{розч}} = 1$  мл,  $g = 19$  мг)

Таблиця 1

Метрологічні характеристики газохроматографічної методики визначення нікотину в різних органічних розчинниках.

Розчинник	Рівняння градуувального графіку	$r^2$	МВ, мкг/мл	Діапазон лінійності, мг/мл
$\text{CHCl}_3$	$S = (13,5 \pm 0,9) + (10880,7 \pm 0,2) \cdot C$ (мг/мл)	0,9998	0,25	0,004–1,0000
MeOH	$S = (52,3 \pm 6,6) + (9434,0 \pm 10,1) \cdot C$ (мг/мл)	0,9999	2,10	0,005–1,1000

Таблиця 2

Результати газохроматографічного визначення нікотину (мг) в ЛЗ компанії НІКОРЕТТЕ® при екстракції різними органічними розчинниками

Розчинник	Трансдермальний пластир			Жувальна гумка		
	$C_{\text{теор}}, \text{МГ}$	$C, \text{мг}$	$S_r$	$C_{\text{теор}}, \text{МГ}$	$C, \text{мг}$	$S_r$
$\text{CHCl}_3$	1,47	$1,51 \pm 0,04$	0,004	0,25	$0,24 \pm 0,05$	0,02
MeOH		$1,44 \pm 0,08$	0,022		$0,03 \pm 0,02$	0,03

**Висновки.** Підбрано умови хроматографічного розділення нікотину в органічних розчинниках методом ГХ-

ПІД. Показано, що повне вилучення аналіту з досліджуваних фармацевтичних композицій досягається за 60 хв

в 1 мл  $\text{CHCl}_3$  без додаткової обробки. Повного вилучення нікотину з жувальної гумки, через вплив полімерної матриці, вдалось досягнути лише при використанні хлороформу як екстрагента. Встановлено, що екстракція етанолом нікотину з ЛЗ нікотинзамісної терапії є непридатною, внаслідок часткового окиснення нікотину. Показано, що за прийнятний час хроматографування (до 10 хв) можливе розділення багатокомпонентних нікотинвмісних екстрактів відповідно до  $R_s$ -критерію. Розроблено газохроматографічну методику визначення нікотину у фармпрепаратах, що характеризується  $\text{MB}=0,25$  мкг/мл в інтервалі лінійності 0,0004–1,0000 мг/мл.

#### Список використаних джерел

1. Fucito L.M., Bars M.P., Forray A., Rojewski A.M., Shiffman S., Selby P., West R., Foulds J., Toll B.A., Writing Committee for the SRNT Policy and Treatment Networks. *Nicotine Tob. Res.*, 2014, 16(7), 909–914.
2. Balfour D., Benowitz N., Fagerstro K., Kunze M., Keil U. *Eur. Heart J.*, 2000, 21, 438–445.
3. Ministry of Health and Family Welfare; Government of India, Indian Pharmacopoeia, The Controller of Publication, New Delhi, 2007, II, 749.
4. Kolassa E. J. *Pharmaceut. Market. Manag.*, 2002, 14(3,4), 101–108.
5. The Order Ministry of Health of Ukraine № 645 from 10.11.2008. Available at: [http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn\\_20081110\\_645](http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20081110_645).

Т. Губецкая, студ.,  
В. Левчик, вед. инж.,  
Н. Кобылинская, канд. хим. наук  
kobilinskaya@univ.kiev.ua,  
КНУ имени Тараса Шевченко, Киев

### СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИКОТИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ НИКОТИНЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

Разработано простую, быструю и экобезопасную аналитическую методику для определения никотина в некоторых фармацевтических препаратах. Методика включает в себя быструю жидкостную экстракцию органическими растворителями с последующим количественным определением капиллярной газовой хроматографией с пламенно-ионизационным детектором (ГХ-ПИД). Исследованы и оптимизированы параметры, влияющие на эффективность извлечения действующего вещества из лекарственных средств (природа растворителя, объем экстрагента и время экстракции, пробоподготовка). Три типа органических растворителей, было использовано в качестве экстрагента – метанол, этанол и хлороформ. При экстракции метанолом из полимерной матрицы жевательной резинки не удалось достичь полного извлечения никотина за приемлемое время анализа. Показано, что количественное извлечение никотина из трансдермального пластыря достигается экстрагированием  $\text{CHCl}_3$  в течение 1 часа, а из жевательной резинки – 30 мин. Установлено, что экстракционное извлечение никотина этанолом в фармацевтических препаратах непригодно из-за частичного окисления аналита. Предел обнаружения разработанной газохроматографической методики определения никотина составляет 0,25 мкг/мл (за  $3\sigma$ -критерием). Градуировочные зависимости линейны в интервале концентраций 0,0004–1000,0 мг/мл. Этот аналитический метод был успешно применен для определения содержания никотина в жевательной резинке и трансдермальном пластыре с относительным стандартным отклонением 0,4 и 2,0%, соответственно.

Ключевые слова: жидкостная экстракция, никотин, лекарственные средства, жевательная резинка, трансдермальный пластырь, газохроматографический анализ.

Т. Hubetska, stud.,  
V. Levchuk, ingeneer,  
N. Kobylynska, PhD  
kobilinskaya@univ.kiev.ua,  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

### NEW TRENDS IN GC-FID TECHNIQUE FOR DETERMINATION OF NICOTINE IN THE ANTISMOKING PHARMACEUTICAL FORMULATION

A simple, rapid, accurate and eco-friendly analytical method was developed for the determination of nicotine in some pharmaceutical formulations. The method comprises a fast liquid extraction with organic solvent followed by direct capillary gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) separation and quantitation. Various experimental conditions, affecting on the efficiency of nicotine extraction (types of extracting solvents, volume, time of extraction, ultrasonic and thermal treatments) were investigated and optimized. Three various solvents (methanol, ethanol and chloroform) were tested and the best extraction from pharmaceutical formulations was attained with chloroform. The result for the recovery of nicotine from pharmaceutical formulations was in the range of 99%. Under the optimal extraction condition of the quantitative recovery of nicotine from the patch by  $\text{CHCl}_3$  was achieved within 1 hour and chewing gum – 30 min. The ethanol extraction of nicotine from the antismoking pharmaceutical formulations is inapplicable, due to the partial oxidation of nicotine. This GC-FID method has been successfully applied to determine the nicotine content in both chewing and transdermal systems. The subsequent GC analysis does not consume any organic solvent as mobile phase while HPLC does. The limit of detection of the GC-FID method, established as three times of the noise of nicotine profile, was 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The standard calibration curves were linear over the concentration range 0.0004–1000.0 mg/mL and with the relative standard deviations for chewing and transdermal systems were less than 0.4% and 2.0%, respectively.

Keywords: liquid extraction, nicotine, antismoking pharmaceutical formulations, chewing gum, transdermal patch, chromatographic analysis

6. Marsh A., Clark B.J., Altria K.D. *Electrophoresis*, 2004, 25, 1270.
7. Gorrod J.W., Jacob P. *Analytical determination of nicotine and related compounds and their metabolites*. Elsevier Science, 1999, 772 p.
8. The European Pharmacopoeia 8.0, 2016. Monograph 01/2009: 1452 (corrected 6.6).
9. The United States Pharmacopoeia USP 37.2. The National Formulary NF 32. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention; 2016. Official Monographs/Nicotine. P.4501.
10. The *British Pharmacopoeia*. Volume 1. HMSO London on behalf of The British Pharmacopoeial Commission, London; 2012, 301–307.
11. Hannisdal A., Mikkelsen O., Schroder K.H., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 2007, 72 (9), 1207–1213.
12. Geto A., Amare M., Tessema M., Admassie S. *Electroanal.*, 2012, 24(3) 659–665.
13. Campanella L., Favero G., Tomassetti M. *Anal. Lett.* 2001, 34 (6), 855–866.
14. Švorc L., Stanković D.M., Kalcher K. *Diamond Relat. Mater.*, 2014, 42, 1–7.
15. The State Pharmacopoeia of Ukraine. Second edition (SPHU 2.0). Ukrainian scientific Pharmacopoeial center for quality of medicines. 2016, 657 p.
16. Chin-Chen M.L., Rambla-Alegre M., Durgavanshi A., Bose D., Esteve-Romero J. J. *Chromatogr. B*, 2010, 878, 2397–2402.
17. Dash A.K., Wong S.T. J. *Chromatogr. A*, 1996, 749, 81–85.
18. Zuo Y., Zhang L., Wu J., Medeiros S., Rego Ch. *Anal. Chim. Acta*, 2004, 526, 35–39.

Надійшла до редколегії 28.09.16