Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ’Я УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ

імені П.Л.Шупика

**ІСАМ НАСЕР**

 УДК 615.214.24:543.062.061:543.544:543.42

**РОЗРОБКА МЕТОДІВ АНАЛІТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ОТРУЄНЬ ВАЛЬПРОЄВОЮ КИСЛОТОЮ**

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

 кандидата фармацевтичних наук

Київ - 2007

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі клінічної біохімії та судово-медичної токсикології Харківської медичної академії післядипломної освіти Міністерства охорони здоров’я України

**Науковий керівник:** доктор фармацевтичних наук, професор

 **ПЕТЮНІН ГЕННАДІЙ ПАВЛОВИЧ**

 Харківська медична академія післядипломної освіти,

 завідувач кафедри клінічної біохімії та судово-

 медичної токсикології

**Офіційні опоненти:** доктор фармацевтичних наук, професор

 **ВЕТЮТНЕВА НАТАЛІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА**

 Національна медична академія післядипломної освіти

 імені П.Л.Шупика, завідувачка кафедри

 фармацевтичної хімії і фармакогнозії

 кандидат фармацевтичних наук

 **ДУЛЬЦЕВА ОЛЕНА ВАСИЛІВНА**

 Медичний інститут української асоціації народної

 медицини, доцент кафедри фармацевтичної хімії та

 фармакогнозії

Захист відбудеться "\_\_\_"\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2008 р. о \_\_\_\_\_ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.613.04 при Національній медичній академії післядипломної освіти імені П.Л.Шупика за адресою: 04112, м.Київ, вул. Дорогожицька, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л.Шупика (04112, м.Київ, вул. Дорогожицька, 9).

Автореферат розісланий "\_\_\_\_\_"\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 2007 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради Л.Б. ПИЛИПЧУК

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**Актуальність теми.** Вальпроєва кислота є одним з найбільш важливих антиепілептичних препаратів і широко вживається у медичній практиці всіх вікових груп хворих для контролю за судомними та безсудомними нападами. Незважаючи на дуже широке її використання, вона не відноситься до нешкідливих лікарських засобів. Маючи виражені тератогенні властивості, вальпроєва кислота призводить до патології розвитку органів кровообігу та хребта. При її вживанні в період вагітності смерть плоду і новонародженого, або природжені аномалії спостерігаються втричі частіше, ніж у контрольних групах. Описані випадки розвитку фатального токсичного гепатиту, алопеції. Число побічних ефектів суттєво зростає при проведенні політерапії, що пояснюється особливостями фармакокінетики вальпроєвої кислоти, яка активно втручається у метаболізм інших лікарських засобів, часто підвищуючи їх концентрацію в крові аж до токсичних. Так, при неконтрольованому вживанні її з карбамазепіном може розвинутися кома; спільне вживання вальпроєвої кислоти з золпідемом може призвести до сомнамбулізму. У осіб, які приймають вальпроєву кислоту, вдвічі вищий ризик суїцидів, ніж у хворих, які приймають інші антиепілептичні засоби.

Незважаючи на потенційну небезпечність цього лікарського засобу, аналітичні аспекти його токсикології вивчені слабо, отже вивчення вальпроєвої кислоти як об’єкту хіміко-токсикологічного дослідження є вельми актуальним.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами**. Дисертація виконана у відповідності до плану науково-дослідних робіт Харківської медичної академії післядипломної освіти МОЗ України («Розробка нових методів визначення медикаментів, похідних фенілалкіламіну та їх контрольних аналогів у біологічному матеріалі», номер державної реєстрації: 0103U004671) та проблемної комісії «Фармація» АМН та МОЗ України.

**Мета і завдання дослідження.** Метою даного дослідження є розробка методів аналітичної діагностики отруєнь вальпроєвою кислотою, які були б придатні для цілей клінічної і судово-медичної токсикології.

Для досягнення цієї мети необхідно було вирішити такі завдання:

* розробити методи ізолювання вальпроєвої кислоти із різних біологічних об’єктів;
* вивчити перехресну чутливість імунохроматографічних тестів на канабіноїди у відношенні до вальпроєвої кислоти;
* вивчити хроматографічну поведінку вальпроєвої кислоти і лікарських засобів, що застосовуються з нею у комбінації, і на основі одержаних даних розробити методику виявлення вальпроєвої кислоти у біологічному матеріалі методом тонкошарової хроматографії (ТШХ);
* провести комплекс досліджень з вибору і оптимізації елементів газохроматографічної системи, і розробити газохроматографічний метод виявлення і визначення вальпроєвої кислоти у біологічному матеріалі;
* розробити методики виявлення і визначення вальпроєвої кислоти та вживаних в комбінації з нею лікарських засобів у біологічному матеріалі методом високоефективної рідинної хроматографії;
* на основі проведених досліджень запропонувати алгоритм проведення судово-токсикологічного аналізу для виявлення і визначення вальпроєвої кислоти у трупному матеріалі і рідинах організму людини.

*Об’єкт дослідження.* Антиепілептичний засіб – вальпроєва кислота.

*Предмет дослідження.* Розробка методик пробопідготовки, виявлення і визначення вальпроєвої кислоти у біологічних об’єктах для цілей судово-медичної токсикології.

*Методи дослідження.* В аналітичних дослідженнях використані методи рідинної екстракції, УФ-абсорбційної спектрофотометрії, звичайної та реакційної тонкошарової, газорідинної і високоефективної рідинної хроматографій, хромато-мас-спектрометрії. Для ізолювання вальпроєвої кислоти із біологічного матеріалу використовували загальноприйняті методи Стаса-Отто, О.О.Васильєвої, а також спеціальні методики ізолювання.

**Наукова новина одержаних результатів.** Вперше проведено систематичне хіміко-токсикологічне дослідження вальпроєвої кислоти. Встановлено вплив різних факторів на ізолювання вальпроєвої кислоти із біологічного матеріалу. Вивчені і оптимізовані умови гідролізу глюкуроніду вальпроєвої кислоти до вільної кислоти. На основі одержаних даних розроблена методика пробопідготовки тканин внутрішніх органів, сечі та крові для проведення судово-токсикологічного дослідження.

Вивчені хроматографічні параметри вальпроєвої кислоти методом тонкошарової та газорідинної хроматографії.

Вперше запропоновані хроматографічні системи і проявляючі реагенти, які дозволяють виявити вальпроєву кислоту в присутності інших медикаментів із групи карбонових кислот, а також лікарських засобів, які вживаються в комбінації з вальпроєвою кислотою.

Методами ТШХ і УФ-абсорбційної спектрофотометрії вивчені і оптимізовані умови реакції 3-(2-бромацетил)-7-метоксикумарину з вальпроєвою кислотою, на підставі якої розроблені чутливі способи її виявлення методами реакційної тонкошарової та газорідинної хроматографій у внутрішніх органах та сечі, а також виявлення та визначення у сироватці крові методом високоефективної рідинної хроматографії.

Встановлено термін зберігання вальпроєвої кислоти в біологічному матеріалі при його гнильному розкладенні.

На підставі виконаних досліджень вперше запропоновано алгоритм

аналітичної діагностики отруєнь вальпроєвою кислотою.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблені методики пробопідготовки біологічного матеріалу, виявлення та визначення у ньому вальпроєвої кислоти можуть бути використані у практиці токсикологічних лабораторій і відділень судово-медичної токсикології при діагностиці отруєнь вальпроєвою кислотою.

Розроблена методика випробувана і впроваджена у практику відділень судово-медичної токсикології Донецького, Харківського, Херсонського, Кіровоградського і Сумського обласних бюро судово-медичної експертизи, а також в навчальний процес кафедр токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету (м. Харків), кафедри неорганічної хімії з курсом токсикологічної хімії Запорізького державного медичного університету і кафедри клінічної біохімії та судово-медичної токсикології Харківської медичної академії післядипломної освіти.

Розроблені методики виявлення і визначення вальпроєвої кислоти були використані при здійсненні судово-токсикологічної експертизи в Харківскому бюро судово-медичної експертизи (Акт судово-токсикологічного дослідження №1604 від 23.09.2005).

**Особистий внесок здобувача.** Разом з науковим керівником визначив мету і задачі дослідження, розробив методичні підходи, на основі яких були обрані методи виконання експериментальної частини дисертації. Особисто здійснив патентно-інформаційний пошук, експериментальне дослідження, статистичну обробку, аналіз та систематизацію одержаних результатів, сформулював висновки з роботи. В наукових роботах, що були опубліковані у співавторстві, дисертантом наведені результати власних експериментальних досліджень.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати і положення дисертаційної роботи викладені і обговорені на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Стан, перспективи судово-токсикологічної служби і наукових досліджень» (м. Харків, 2005); конференції молодих вчених ХМАПО «Досягнення молодих вчених – майбутнє медицини» (м. Харків, 2005); Науково-практичній конференції «Фармацевтичне право в системі правовідносин: виробник-лікар-пацієнт-провізор-ліки-контролюючі та правоохоронні органи» (м. Харків, 2005); науково-практичній конференції «Теорія та практика судової експертизи і криміналістики» (м. Харків, 2006).

**Публікації.** Матеріали дисертаційної роботи опубліковані у 7 наукових працях, у тому числі 3 статті у наукових фахових виданнях і 4 тез доповідей.

**Структура дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, 6 розділів, загальних висновків, списку літературних джерел та 8 додатків. Загальний обсяг дисертації складає 134 сторінки машинописного тексту. Робота ілюстрована 11 рисунками і 24 таблицями та 4 схемами. Обсяг основного тексту дисертації складає 108 сторінок. Список використаних літературних джерел містить 152 найменування, з них 37 кирилицею та 115 латиною.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

Вальпроєва кислота – ди-(н-пропіл)-оцтова кислота є препаратом першого вибору у лікуванні епілепсії, високоефективна при всіх типах епілептичних нападів, має також антидепресантну, антиманіакальну та антимігренозну активність.



**Вивчення ізолювання вальпроєвої кислоти із органів і біологічних рідин трупа**

Ізолювання вальпроєвої кислоти із твердих біологічних об’єктів з метою судово-токсикологічного дослідження раніше не проводилось. Тому було цікаво провести порівняльне дослідження загальновживаних у токсикології методів – Васильєвої і Стаса-Отто, а при необхідності розробити новий.

Вивчення ізолювання вальпроєвої кислоти проводилось на модельних сумішах, які одержували затравкою тканин печінки. При цьому була встановлена неефективність методів Васильєвої і Стаса-Отто для ізолювання вальпроєвої кислоти (виходи: 8,6 % і 10,8 %, відповідно).

Істотно вдалося підвищити вихід, екстрагуючи вальпроєву кислоту із підкисленого гомогенату тканин печінки з безводним натрію сульфатом органічними розчинниками (86,2 % при використанні ефіру та 72,4 % – хлороформу).

Важливим, з токсикологічної точки зору, об’єктом аналізу є сеча, оскільки сама вальпроєва кислота та її метаболіти виділяються з організму переважно з сечею. Ізолювання вальпроєвої кислоти із сечі вивчалось на модельних сумішах. Виявилося, що процеси ізолювання вальпроєвої кислоти з сечі підкоряються загальним закономірностям. Так, розраховане значення рН початку зони максимальної екстракції (рН=3) і експериментально знайдене оптимальне значення рН співпали.

Враховуючи, що значна частина вальпроєвої кислоти виводиться у вигляді свого метаболіту – глюкуроніду, було доцільно вивчити умови його гідролізу, що істотно знизило б мінімум вальпроєвої кислоти, який визначається, у біологічному матеріалі. Методи пробопідготовки містили два варіанти кислотного гідролізу за методиками, які прийняті при визначення опіатів і бензодіазепінів, а також трьох варіантів лужного гідролізу. З них один, який використовується при дослідженні на канабіноїди, два інші, рекомендовані нами – 2M розчином калію гідроксиду при нагріванні та на холоду.

Виявлення вальпроєвої кислоти у гідролізаті проводилось методом хромато-мас-спектрометрії. Час утримання вальпроєвої кислоти складав 4,48 хв (рис.1).



 Рис. 1. Хроматограма сечі, яка отримана після гідролізу 2М

 розчином калію гідроксиду.

Речовина з цим часом утримання показала добовий збіг виявлених іонів з бібліотечним спектром вальпроєвої кислоти (96 із 100): 73, 102, 41, 43, 55 (рис.2).



Рис. 2. Мас-спектр речовини з часом утримання о 4,48 хв.

Найбільш низькі виходи вальпроєвої кислоти були одержані при кислотному гідролізі, що, вочевидь, пояснюється її леткістю.

Оптимальним варіантом лужного гідролізу глюкуроніду вальпроєвої кислоти виявився гідроліз 2M розчином калію гідроксиду при 500С на протязі 20 хв., що забезпечило максимальний її вихід. Ці умови пробопідготовки і були покладені в основу методики визначення вальпроєвої кислоти у сечі.

**Виявлення вальпроєвої кислоти у біологічному матеріалі методом тонкошарової хроматографії**

При діагностиці гострих отруєнь людини на першій стадії дослідження використовують методологію скринінгу, і при вивченні нової речовини необхідно перш за все визначити його хроматографічну рухливість у стандартних скринінгових хроматографічних системах, а також перелік речовин, які зможуть перешкоджати його виявленню. Тому, для порівняльного дослідження були вибрані широко застосовувані медикаменти кислої природи (бензойна, саліцилова, ацетилсаліцилова кислота, індометацин, вольтарен, мефенамінова кислота), лікарські засоби, що вживаються разом з вальпроєвою кислотою (парацетамол, фенобарбітал, барбітал, клоназепам), а також природний метаболіт – оцтова кислота.

Вивчення хроматографічної рухливості вказаних засобів проводилось у системах, що рекомендовані Міжнародним Комітетом з систематичного токсикологічного аналізу: 1) хлороформ-ацетон (8:2); 2) етилацетат; 3) хлороформ-діоксан-ацетон-25% розчин аміаку (47,5:45:5:2,5); 4) хлороформ-н-бутанол-25% розчин аміаку (79:40:5); 5) діетиловий ефір-ацетон-25% розчин аміаку (40:20:1); 6) бензол-ізопропанол-25% розчин аміаку (85:15:1), що прийняті у вітчизняній системі скринінгу; 7) хлороформ-етанол (9:1); 8) етанол; 9) етилацетат-етанол-25% розчин аміаку (85:10:5); 10) толуол-ацетон-етанол-25% розчин аміаку (45:45:7,4:2,5); 11) етилацетат-ацетон-25% розчин аміаку (50:45:4); 12) метанол-25% розчин аміаку (100:1,5); 13) бензол-метанол-діетиламін (90:10:10), а також запропоновані нами: 14) толуол-етанол-гексан (6:1:3); 15) толуол-етанол-гексан (6:3:1).

В системах №1-6, величини Rf вальпроєвої кислоти наближаються до нуля і тому вони не можуть бути використані для її виявлення. У хроматографічних системах, які використовуються у вітчизняному скринінгу (№7-13), вальпроєва кислота має достатню рухливість, однак, вони виявилися недостатньо селективними для відокремлювання її від інших досліджуваних речовин кислої природи. Із систем, що були запропоновані нами, найбільш селективною є система №14, в якій вальпроєва кислота має значення Rf близьке тільки з бензойною кислотою. Системи №14 і №15 мають достатню селективність для відокремлювання вальпроєвої кислоти від інших речовин кислого характеру, а по відношенню до вальпроєвої і бензойної кислот є некорелюючими, що значно підвищує вірогідність ідентифікації (табл.1).

 *Таблиця 1*

**Параметри хроматографічної рухливості досліджуваних речовин у запропонованих системах**

|  |  |
| --- | --- |
| Речовина | Величини hRf в системах |
| 14 | 15 |
| 1 | 2 | 3 |
| Вальпроєва кислота | 29 | 65 |
| Ацетилсаліцилова кислота | 18 | 47 |
| Диклофенак натрію | 8 | 35 |

*Продовж. табл.1*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1 | 2 | 3 |
| Індометацин | 0 | 0 |
| Бензойна кислота | 35 | 58 |
| Мефенамінова кислота | 21 | 59 |
| Саліцилова кислота | 12 | 35 |
| Оцтова кислота | 0 | 0 |
| Фенобарбітал | 37 | 67 |
| Клоназепам | 11 | 45 |
| Барбітал | 35 | 67 |
| Парацетамол | 12 | 52 |

Можливості скринінгової системи визначаються не тільки її селективністю, але й набором реактивів – проявників. Нами для візуалізації речовин на пластинках використовувався стандартний набір реактивів, який вживається у скринінгу: пари йоду, реактиви Ван-Урка, Браттона-Маршалла, 1 % розчин калію перманганату у сірчаній кислоті, розчин заліза (ІІІ) хлориду, послідовне нанесення 2% розчину ртуті сульфату і 0,05 % розчину дифенілкарбазону у хлороформі. Вказані реагенти не проявляють вальпроєву кислоту. Таким чином, існуючі системи скринінгу токсичних речовин не дозволяють виявити вальпроєву кислоту у біологічному матеріалі. Враховуючи, що в структурі вальпроєвої кислоти є карбоксильна група, ми спробували використати як проявники розчини інших солей важких металів, а також розчини кислотно-основних індикаторів.

Із солей важких металів найбільш селективними виявили себе реактиви на основі 0,3М аміачного розчину сульфату міді і, особливо, 0,3М розчину сульфату міді з подальшою обробкою розчином о-толуїдину в ацетоні.

Враховуючи наявність у структурі всіх карбонових кислот карбоксильної групи, цікаво було випробувати для візуалізації кислотно-основні індикатори (метиловий червоний, бромкрезоловий зелений, підкислений оцтовою кислотою, бромкрезоловий пурпуровий, бромтимоловий синій, ксиленовий помаранчевий, алізариновий жовтий). Під час обприскування цими проявниками були одержані цікаві результати. Так, всі використані індикатори виявляють більш сильні ароматичні кислоти, і лише метиловий червоний, бромкрезоловий зелений і бромкрезоловий пурпуровий – аліфатичні (вальпроєву та оцтову кислоти). Ще більш слабкі кислоти (барбітурати) досліджувані реактиви не проявляють. Найбільш перспективними для виявлення як ароматичних, так і аліфатичних карбонових кислот слід вважати проявники на основі метилового червоного, який поєднує в собі високу чутливість (0,1 мкг/пляма) та контрастність. Цей реактив рекомендується для включення в систему токсикологічного скринінгу для виявлення у біологічному матеріалі речовин кислої природи. Таким чином, поєднання використання вказаних реактивів та запропонованих хроматографічних систем дає можливість виявити вальпроєву кислоту і диференціювати її від інших речовин кислого характеру.

Для виявлення вальпроєвої кислоти був розроблений варіант реакційної тонкошарової хроматографії. Як реагент був використаний 3-(2-бромацетил)-7-метоксикумарин 1, який при взаємодії з вальпроєвою кислотою в присутності триетиламіну утворює 2-(7-метоксикумарин-3-іл)-2-оксоетиловий ефір вальпроєвої кислоти 2 (схема 1).

Для визначення оптимальних умов взаємодії суміш еквімолекулярних кількостей вальпроєвої кислоти, триетиламіну і 3-(2-бромацетил)-7-метоксикумарину витримувалась у термостаті при температурах 300С і 600С. Кожні 5 або 10 хвилин відбиралась проба реакційної суміші і хроматографувалась паралельно з 3-(2-бромацетил)-7-метоксикумарином в системі №20 (толуол-етанол-гексан (4:1:5):



Схема 1. Реакція утворення 2-(7-метоксикумарин-3-іл)-2-оксоетилового ефіру вальпроєвої кислоти 2.

Після хроматографування пластинки в УФ-світлі було виявлено по 2 добре розділені та флуоресціюючі плями: перші – жовтого кольору, відповідні до реагенту 3-(2-бромацетил)-7 метоксикумарину (1), інші – жовто-зеленого кольору відповідні продукту його взаємодії з вальпроєвою кислотою (2).

Далі, сорбенти з фрагментів пластинок, які відповідають флуоресціюючим плямам ефіру (2) екстрагувались етанолом і визначалась оптична густина одержаних розчинів при 296 нм (максимум поглинання продукту реакції). При цьому було встановлено, що реакція між вальпроєвою кислотою і 3-(2-бромацетил)-7 метоксикумарином закінчується при температурі 300С за 80 хвилин, при 600С – за 30 хвилин.

Межа виявлення вальпроєвої кислоти у біологічному матеріалі цим методом складає 1 мкг у плямі. Далі дослідженню були піддані речовини кислої природи. Хроматографування проводилось у 6 системах розчинників: №1 і 16-20 (№16 толуол-етанол (10:0,1); №17 хлороформ-ацетон (9:1); №18 толуол-етанол-гексан (6:0,5:3,5); №19 толуол-етанол (8,5:1,5); №20 толуол-етанол-гексан (4:1:5).

В усіх системах вихідний реагент і продукти реакцій добре відрізняються один від одного, а системи №16 і 17 є некорелюючими, що підвищує вірогідність ідентифікації. Розроблене виявлення вальпроєвої кислоти методом реакційної тонкошарової хроматографії може бути використане як підтверджуючий метод при відсутності в лабораторії газорідинної і високоефективної рідинної хроматографії, що істотно підвищує рівень доказовості виявлення вальпроєвої кислоти.

**Виявлення і визначення вальпроєвої кислоти у біологічному матеріалі методом газорідинної хроматографії**

Вальпроєва кислота – летка сполука, і можна було припустити, що при проведенні досліджень на технічні розчини, вона буде перешкоджати визначенню. Однак, проведене дослідження на трьох колонках різної полярності (сквалан, динонілфталат і ціанетоксипропан) в умовах методики виявлення технічних рідин показало, що вальпроєва кислота не має хроматографічної рухливості і тому не перешкоджає виявленню технічних рідин.

Виявлення вальпроєвої кислоти вдалося здійснити на другій колонці з 5% SE-30 на Хроматоні N-AW-HMDS. Детектор – полум’яно-іонізаційний. Паралельно з вальпроєвою кислотою вводили природний метаболіт організму людини – оцтову кислоту. Речовини вводились в розчині етанолу. Дослідження показало, що компоненти суміші повністю розділяються в умовах визначення (рис. 3).



Рис. 3. Хроматограма розчину вальпроєвої(3) і оцтової(2) кислот в етанолі(1).

Для підвищення вірогідності виявлення була використана перед-колоночна реакційна хроматографія. Для цього порівняльному хроматографічному дослідженню було піддано вальпроєву, бензойну, саліцилову кислоти та їх кумаринові ефіри, одержані в раніше описаних умовах. Як виявилося, час виходу вальпроєвої кислоти і її кумаринового ефіру значно відрізняється від інших медикаментів і їх кумаринових ефірів, що дозволяє проводити її надійну ідентифікацію у присутності інших лікарських засобів із групи карбонових кислот.

Наступним етапом дослідження стала розробка умов кількісного визначення вальпроєвої кислоти. Дослідження проводилось на газовому хроматографі Кристал-5000, який має таку конфігурацію: колонка капілярна з прищепленою фазою «НР-5» (15м х 0,53мм х 0,5мкм); програмування температури: 1100С, 200С/хв до 2000С); полум’яно-іонізаційний детектор (2200С); інжектор без розділення потоку (2100С). газ-носій – гелій, тиск 10 кПа.

Визначення проводилось методом абсолютного градуювання. У всьому досліджуваному діапазоні концентрацій залежність концентрація – площа піка лінійна, описується рівнянням:

С = 0,000132 х S,

 де С – концентрація (мкг/мл);

 S – площа піка.

Розроблена методика кількісного визначення вальпроєвої кислоти була випробувана на чотирьох модельних розчинах різної концентрації. При цьому було встановлено, що відносна невизначеність середнього результату при кількісному визначенні вальпроєвої кислоти не перевищує 2 %.

Розроблена методика була використана для вивчення ізолювання вальпроєвої кислоти із біоматеріалу різними методами і визначення її збереження у гнильно-зміненому біологічному матеріалі. При цьому було встановлено, що протягом 5 місяців вміст вальпроєвої кислоти у біологічному матеріалі зменшується до 40 % від вихідного.

**Виявлення і визначення вальпроєвої кислоти у крові методом реакційної високоефективної рідинної хроматографії**

Пряме визначення вальпроєвої кислоти методом високоефективної рідинної хроматографії з ультрафіолетовим детектуванням неможливе, тому було цікаво розробити визначення вальпроєвої кислоти в крові методом реакційної ВЕРХ, що дозволяє використання спектрофотометричного і флуориметричного детекторів, для чого необхідно було вивчити різні варіанти пробопідготовки крові, включаючи вибір умов депротеїнізації, екстракції і пошук оптимальних умов хроматографічного розділення.

Дослідження проводили на рідинному мікроколоночному хроматографі «Міліхром А-02» на колонці із збіднілою фазою Pronto SIL-120-5-C18AQ. Режим елюювання – градієнтний. УФ-детектування при довжині хвилі 300 нм.

Для оптимізації процесу депротеїнізації випробовувались різні реагенти: етанол, ацетонітрил, фосфорно-вольфрамова, трихлороцтова та хлористоводнева кислоти. Найкращі результати були одержані при використанні ацетонітрилу, що слід вважати позитивним моментом, враховуючи подальше застосування ВЕРХ як кінцевої аналітичної операції. Інші осаджувачі призводили до значних втрат вальпроєвої кислоти при депротеїнізації. Для очищення цілевих компонентів від найбільш гідрофобних сполук (ліпідів) останні екстрагувались гексаном.

Крім того, для порівняння, ізолювання вальпроєвої кислоти проводили екстракційним методом із сухої суміші крові з натрію сульфатом. Як екстрагенти вживали хлороформ, діетиловий ефір та етанол.

Найбільший вихід вальпроєвої кислоти було одержано при осадженні білків ацетонітрилом, що і було використано далі при розробці методики визначення вальпроєвої кислоти в крові.

Оскільки вальпроєва кислота не має власного поглинання в ультрафіолетовій області спектру, для розробки методики її визначення була використана предколонкова дериватизація за допомогою 3-(2-бромацетил)-7 метоксикумарину. Дериватизації піддавали сироватку крові після депротеїнізації і видалення гексаном гідрофобних сполук.

Паралельно порівняльному хроматографічному дослідженню були піддані кумаринові ефіри бензойної, саліцилової, мефенамінової кислот і диклофенаку. Як виявилось, часи виходу кумаринових ефірів вальпроєвої кислоти та інших речовин значно відрізняються один від одного, що дозволяє проводити її надійну ідентифікацію в присутності цих лікарських засобів. Найбільший час виходу у мефенамінової кислоти (рис.4).

Для визначення вальпроєвої кислоти в крові використовували метод абсолютного градуювання, для чого було побудовано градуювальний графік в інтервалах концентрацій 10-1000 мкг/мл. Після обробки одержаних даних методом лінійного регресійного аналізу була одержана лінійна залежність у всьому діапазоні концентрацій, які вивчалися, виражена рівнянням:

S = 0,1037+0,1329C,

де S – площа піка;

 C – концентрація (мкг/мл).

Метрологічні характеристики методу визначались на чотирьох модельних зразках крові з відомим вмістом вальпроєвої кислоти. Результати досліджень свідчать, що невизначеність результатів виміру складає близько 8 %, що не перевищує припустимі межі прийняті для біоаналітичних методів.



Рис. 4. Хроматограма кумаринових ефірів вальпроєвої (1) та мефенамінової (2) кислот.

 **Алгоритм дослідження біологічного матеріалу на вальпроєвую кислоту при спеціальному завданні**

На основі проведених досліджень нами був розроблений алгоритм токсикологічного дослідження для аналітичної діагностики отруєнь вальпроєвою кислотою (схема 2).

Зважаючи те, що при отруєнні вальпроєвою кислотою, концентрація останньої в органах досить велика, для її виявлення достатньо 25 г ткани органів. Ізолювання слід проводити екстрагуванням органічними розчинниками із підкисленого гомогенату біоматеріалу з безводним натрію сульфатом (екстракт 1).

Пробопідготовка сечі для виявлення вальпроєвої кислоти включає обов'язковий лужний гідроліз і подальшу рідинну екстракцію при значеннях рН менше 3 (екстракт 2). Достатнім, з урахуванням різних обставин, є об'єм об'єкту рівний 25 мл.

Одержані відповідним чином екстракти 1 і 2, паралельно із стандартним зразком речовини – вальпроєвою кислотою в трьох повторюваннях, досліджують методом ТШХ у запропонованій нами системі: толуол-ацетон-гексан (6:1:3).

Перший фрагмент пластинки проявляють 0,1% розчином метилового червоного в етанолі і проводять оцінку одержаного результату. При відсутності на хроматограмах досліджуваних екстрактів 1 і 2 червоних плям, але при наявності плями червоного кольору на хроматограмі зразка вальпроєвої кислоти, дослідження вважають закінченим і роблять висновок про відсутність в досліджуваних об'єктах вальпроєвої кислоти. При появі на хроматограмах речовини-стандарту і досліджуваних екстрактів 1 і 2 червоних плям, інші два фрагменти пластинки обробляють реактивами: перший – сумішшю 10 % розчинів міді сульфату і 2 % розчином амоніаку у віднощенні 5:1, другий – 1 % розчином о-толуїдину після обробки пластинки 0,3 М розчином міді сульфату. Поява плям, забарвлених в першому випадку у голубий, а в другому у коричневий колір, свідчить про наявність в об'єктах вальпроєвої кислоти.

Підтверджуючі дослідження слід проводити методами реакційної тонкошарової або газорідинної хроматографії в залежності від того, які ресурси мають конкретні токсикологічні лабораторії.

Після обробки проб реактивом одержаний продукт досліджують методами тонкошарової або газорідинної хроматографії. В першому випадку необхідно використовувати обидві рухливі фази, які виступають некорелюючими, що істотно підвищує достовірність заключень. Позитивні результати хоча б одного із цих підтверджуючих досліджень дають підставу зробити остаточний висновок про виявлення в досліджуваних біологічних пробах вальпроєвої кислоти.

Наступним кроком є кількісне визначення наявності вальпроєвої кислоти у сироватці крові. Для цього як об’єкт рекомендується використовувати 5 мл крові. Після одержання сироватки крові і осадження білків ацетонітрилом, проводять очистку сиворотки гексаном від ліпідов. Одержаний екстракт обробляють реактивом, досліджують методом високоефективної рідинної хроматографії і визначають вміст вальпроєвої кислоти.

 На основі одержаних в результаті цих досліджень даних формулюють висновок про виявлення вальпроєвої кислоти в досліджуваному біологічному матеріалі та її кількості у сироватці крові.

Початок

Взяти пробу сечі

Взяти проби внутрішніх органів

Провести ізолювання

Провести лужний гідроліз і екстракцію

Провести ТШХ – розділення. Рухлива фаза: толуол – етанол – гексан(6:1:3)

Проявити 1% спиртовим розчином метилового червоного.

так

так

Проявити 1% розчином о-толуїдину в ацетоні, потім 0,3 М розчином міді сульфату.

ні

ні

так

так

ні

ні

Проявити сумішшю 10% розчинів міді сульфату і 2% амоніаку (5:1)З'явилось голубе забарвлення?

*Продовж. схеми 2*

ні

ні

так

так

Чи вдалося проведеними дослідженнями встановити попередньо тотожність аналіту вальпроєвої кислоти?

так

ні

ні

так

Перейти до підтверджуючих досліджень методами реакційної ТШХ і ГРХ.

Отримати 2-(7'-метоксикумарин-3’-іл)-2-оксоетиловый ефір вальпроєвої кислоти

Провести ГРХ дослідження

Провести ТШХ-розділення

Рухливі фази:

толуол–етанол (10:0,1);

хлороформ–aцетон (9:1).

Виявлено пік, що відповідає кумариновому похідному вальпроєвої кислоти?

Виявлена у УФ-світлі пляма, флуоресціююча

жовто-зеленим кольором?

так

ні

ні

так

Зробити висновок про невиявлення

вальпроєвої кислоти

Зробити висновок про невиявлення

вальпроєвої кислоти

Розробити остаточний висновок про виявлення вальпроєвої кислоти

Провести кількісне визначення вальпроєвої кислоти в крові

Провести пробопідготовку зразка крові і одержати 2-(7'-метоксикумарил-3')-2-оксоетиловий ефір вальпроєвої кислоти

Провести ВЕРХ визначення

Розрахувати вміст вальпроєвої кислоти у досліджуваному зразку крові

Розробити остаточний висновок про виявлення вальпроєвої кислоти і рівня її концентрації у крові

Схема 2. Алгоритм дослідження біологічного матеріалу на вальпроєвую кислоту.

**ВИСНОВКИ**

* Вперше проведено комплекс досліджень, спрямований на розробку схеми аналітичної діагностики отруєнь вальпроєвою кислотою, яка включає методики пробопідготовки різних видів біологічного матеріалу, виявлення вальпроєвої кислоти методами звичайної і реакційної тонкошарової, газорідинної і високоефективної рідинної хроматографій, а також визначення рівня її концентрації у крові.
* Вперше проведено порівняльне вивчення ізолювання вальпроєвої кислоти із біологічного матеріалу методами Васильєвої, Стаса-Отто і органічними розчинниками. Показана низька ефективність використання методів Васильєвої та Стаса-Отто для ізолювання вальпроєвої кислоти (ізолюється 8,6 % і 10,8 %, відповідно).
* Вивчені і оптимізовані умови гідролізу глюкуроніду вальпроєвої кислоти до вільної кислоти. Факт її утворення підтверджується результатами хромато-мас-спектрометрії. На основі одержаних даних розроблена методика пробопідготовки сечі для проведення судово-токсикологічного дослідження.
* Встановлено, що в умовах міжнародної і вітчизняної систем скринінгу токсичних речовин в біологічному матеріалі, вальпроєва кислота не може бути виявлена. Запропоновані хроматографічні системи і проявляючі реагенти, які дозволяють знайти вальпроєву кислоту в присутності інших медикаментів із групи карбонових кислот, а також лікарських засобів, які вживаються в комбінації з вальпроєвою кислотою.
* Вивчена можливість використання кислотно-основних індикаторів як реактивів для візуалізації речовин кислої природи на пластинках. З цією метою запропоновано доповнити існуючу систему скринінгу і ввести для виявлення токсичних речовин із групи карбонових кислот груповий реактив – 1% спиртовий розчин метилового червоного.
* Методами ТШХ, УФ - абсорбційної спектрофотометрії вивчені і оптимізовані умови взаємодії 3-(2-бромацетил)-7 метоксикумарину з вальпроєвою кислотою і розроблені чутливі способи її виявлення методами реакційної тонкошарової, газорідинної і високоефективної рідинної хроматографії у біологічному матеріалі.
* Розроблені методики кількісного визначення вальпроєвої кислоти у біологічних об’єктах методами прямої і реакційної передколоночної газорідинної і високоефективної рідинної хроматографії, визначені їх метрологічні характеристики.
* Методом газорідинної хроматографії досліджено вплив різних депротеїнізаторів на виходи вальпроєвої кислоти із трупної крові, оптимізовані умови її пробопідготовки, а також вивчена зберігаємість вальпроєвої кислоти в гнильно зміненому біологічному матеріалі. Встановлено, що вальпроєва кислота може бути надійно виявлена протягом 5 місяців зберігання.
* На основі проведених досліджень розроблено алгоритм проведення судово-токсикологічного дослідження за спеціальним завданням для виявлення і визначення вальпроєвої кислоти у трупному матеріалі і рідинах організму людини.

**СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

* Петюнін Г.П., Ісам Насер. Газохроматографічне визначення вальпроєвої кислоти у біологічному матеріалі // Фармацевтичний журнал. – 2007. – №1. – С. 64 – 67. (Ісам Насер брав участь в визначенні завдання та мети дослідження, виконав експериментальні дослідження, аналізував та узагальнював отримані результати, підготував статтю).
* Петюнін Г.П., Ісам Насер. Виявлення вальпроєвої кислоти методом тонкошарової хроматографії у біологічному матеріалі // Вісник фармації. −2007.−№1(49).− C. 9 −11. (Ісамом Насером визначено мету, завдання роботи, проведено досліди, аналіз, узагальнення результатів та написання статті).
* Петюнін Г.П., Ісам Насер. Визначення вальпроєвої кислоти у крові мет-

 одом реакційної високоефективної рідинної хроматографії // Журнал

 органічної та фармацевтичної хімії. − 2007. − Т. 5, вип. 2 (18). − С. 79 -

 82. ( Ісам Насер брав участь в експериментальних токсикологічних

 дослідженнях, а також в аналізі та узагальненні отриманих результатів,

 написанні статті).

* Исам Насер. Изучение хроматографического поведения вальпроевой кислоты в смеси с другими веществами кислого характера // Теорія та практика судової експертизи і криміналістики: Збірник науково-практичних матеріалів. − Харківський НДІ судових експертиз, «Право» 2006. − Вип. 6. – С. 302 − 305.
* Петюнін Г.П., Ісам Насер. Газохроматографическе определение вальпроевой кислоты в биологическом материале // Стан, перспективи судово-токсикологічної служби та наукових досліджень. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю.  Харків: Вид-во НФаУ, 2005. - С. 57 - 58. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка тез).
* Петюнин Г.П., Исам Насер. Определение вальпроевой кислоты в биологическом материале методом тонкослойной хроматографии // Матеріали науково–практичної конференції «Фармацевтичне право в системі правовідносин: виробник-лікар-пацієнт-провізор-ліки-контролюючі та правоохоронні органи»: Ліки України. − 2005. − № 9(98). − С.203. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка тез).
* Ісам Насер. Вивчення ізолювання вальпроєвої кислоти з біологічного матеріалу // Матеріали науково–практичної конференції молодих вчених «Досягнення молодих вчених – майбутнє медицини». м.Харків. – 2005. – С.39.

**Ісам Насер.** «**Розробка методів аналітичної діагностики отруєнь вальпроєвою кислотою**»**. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія. - Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л.Шупика, Київ, 2008.

Дисертаційна робота присвячена хіміко-токсикологічному дослідженню антиепілептичного препарату – вальпроєвої кислоти.

Науково обгрунтовано та експериментально підтверджено використання різних способів пробопідготовки в залежності від природи біологічного об’єкту і аналітичного методу.

Розроблені селективні рухомі фази і реагенти-проявники, які дозволяють ідентифікувати вальпроєву кислоту методом тонкошарової хроматографії в присутності інших медикаментів.

Вивчені умови взаємодії 3-(2-бромацетил)-7 метоксикумарину з вальпроєвою кислотою і розроблені способи її виявлення методами реакційної тонкошарової, газорідинної та високоефективної рідинної хроматографії

На основі проведених досліджень розроблено алгоритм судово-токсикологічного дослідження для виявлення і визначення вальпроєвої кислоти у біологічному матеріалі і рідинах організму людини.

**Ключові слова:** вальпроєва кислота, тонкошарова хроматографія, газорідинна хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія, методи ізолювання, пробопідготовка, біологічний матеріал, скринінг.

**Исам Насер.** «Разработка методов аналитической диагностики отравлений вальпроевой кислотой». **–** Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия. - Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л.Шупика, Киев, 2008.

Диссертационная работа посвящена химико-токсикологическому иссле-дованию антиэпилептического препарата - вальпроевой кислоты.

Научно обосновано и експериментально подтверждено использование различных способов пробоподготовки в зависимости от природы биологического объекта и конечной аналитической операции.

Разработаны селективные подвижные фазы и реагенты-проявители, позволяющие идентифицировать вальпроевую кислоту методом тонкослойной хроматографии в присутствии других медикаментов.

Изучены условия взаимодействия 3-(2-бромацетил)-7-метоксикумарина с вальпроевой кислотой и разработаны способы ее обнаружения методами тонкослойной, газожидкостной и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

На основе проведеннях исследований предложен алгоритм судебно-токсикологического исследования для обнаружения и определения вальпроевой кислоты в биологическом материале и жидкостях организма человека.

 **Ключевые слова**: вальпроевая кислота, тонкослойная хроматография, газожидкостная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, методы изолирования, пробоподготовка, биологический материал, скрининг.

**Isam Nasir.** «**Development analytical methods for poisonings of valproic acid diagnostics**»**. – А manuscript.**

The dissertation of the PH.D in of pharmacy scientific degree by the specialty 15.00.02 **–** pharmaceutical chemistry and pharmacognosy by National Medical Academy of Postgraduate Studies in the name of P.L Shupik, Kyiv, 2008.

Thesis is based on research of antiepileptic drugs chemic-toxic effect of valproic acid.

The first attempt of comparing analysis method to isolate valproic acid from biological substances methodics applied for forensic toxicology and show it ineffectively studied condition (type of solution, pH of environment) and offered more effective method for isolation of valproic acid from tissues of internal organs, allowed to isolate upto 86% analyte.

We have been studied that many factors effect (pH of environment, temperature and reaction time) the gulucuronide valproic acid’s hydrolyze and identify optimal condition for find valproic acid in urine. Have been studied that high quantity of valproic acid been excreted from hydrolyzing by 2M potasium hydroxide solution at 50 degree Celsius for 20 minutes.

Availability of valproic acid from hydrolysis been confirmed by chromato-mass spectrometric method.

Studied many methods to separate protein from blood, suitable for HLPC analysis. Maximal availability of valproic acid is found when using acetonitryle as protein sedimentation. Next step of purification of plasma from lipophilic substances by hexane provide getting more pure material, suitable for use in columns.

Established system immuno-hromatographic test «Cannabis» company «Sniper» having selectivity which satisfied and not provide pseudopositive result when available in the urine valproic acid and it metabolits.

Established, international and local systems for screening toxic substances realizing by thin layer chromotography method to identify valproic acid is impossible.

Have been offered selective system (toluene-ethanol-hexan (6:1:3) and ( 6:3:1) and reagent-appearing (1. mixture (5:1) 10 % solution cupper sulphate and 2% ammonium hydroxide .2. processed by 0,3 M cupper sulphate solution and 1% o-toluidine in acetone) suitable for identify valproic acid by thin layer chromotography method while available other drugs having acidic character (benzoic, salicylic, acethylsalicylic, mephenamic acids, indomethacine, voltaren), drug substances used in combination for treatment of epilepsy (paracetamole, phenobarbitone, barbitone, clonazepame).

We recommend screening system to add non selective high sensitive reagent for identification of valproric acid by using 0,1 % solution red methyl in ethanol. Also to defined substances made of carboxilic acid by thin layer chromotography system.

We have been studied condition of etherification valproic acid with the help of 3-(2´-bromacetyl)-7-methoxycumarine in availability of threeethylamine, allow to foam of 2-(7´- methoxycumarine-3´-yl)-2 oxo-ethyl ether. End product differs from valproic acid by absorbing ultraviolet–wave at 300 nm, when expose by ultraviolet light getting intensive yellowish-green fluorescence. This reagent have been used to get ethers from other drugs - made of carboxylic acid by reaction of thin layer chromotography method.

 Which may be used as confirmation method when availability of gas-liquid chromatography and high-pressurs liquid chromatography in the laboratory.

 The reaction has been established in the basis of method for identification and defination of valproic acid in the blood by reaction high-pressur liquid chromatography with spectrometric or flurometric detectors. Have been developed parameters for metrological method.

Established, that conditions for identify «technical» liquids by gas-liquid chromatography method not disturbed to identify by valproic acid.

Pretreatment gas-liquid chromatography method to identification and determination of valproic acid in biological material direct and pre-column reaction chromatography. On the basis of reaction formation 2-(7´- methoxycumarine-3´-yl)-2 - oxo - ethyl ether of valproic acid. Analogical ethers from other carboxylic acids, as drug substances and natural metabolises of acetic acid, not disturb to identified valproic acid.

Pretreatment methods have been used to study the process of isolation of valproic acid from biological material, effect of different deproteinisation by excreting them from blood, have been studied the condition of hydrolysis glucuronide of valproic acid indentifiying them in urine and also preserved in decomposed biological material.

Established, that while preserving the period of 5 months contents of valproic acid in the biological material decrees 40 %.

Have been studied chromatographic character of 2 - (7´- methoxycumarine-3´-yl)-2 oxo - ethyl ether valproic, benzoic, salicylic, acetylsalicylic, mephenamic acids, indometacine, voltarene ,and condition microclumn HLPC-analizator and shows possibility of identify valproic acid when contains above drugs.

 The algorithm of design of research is made for forensic toxicology, to identify and determine valproic acid in biologocal materials or liquids of human organism.

**Key words**: valproic acid, thin layer chromotography, gas-liquid chromatography, high-pressurs liquid chromatography, isolation method, pretreatment, biological materials, screening.

Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>