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

національний фармацевтичний університет

# Полуян Світлана Михайлівна

## УДК 615.9:615.235.07

##### хіміко-токсикологічне дослідження

##### бромгексину та амброксолу

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

### автореферат

### дисертації на здобуття вченого ступеня

**кандидата фармацевтичних наук**

##### Харків 2003

Дисертацією є рукопис.

###### Робота виконана на кафедрі аналітичної хімії Національного

фармацевтичного університету, Міністерство охорони здоров’я України.

|  |  |
| --- | --- |
| **Науковий керівник:** | доктор хімічних наук, професор **БОЛОТОВ Валерій Васильович** *Національний фармацевтичний університет, завідувач кафедри аналітичної хімії* |
|  |  |
| **Офіційні опоненти:** | доктор фармацевтичних наук, професор **БЕЗУГЛИЙ Петро Овксентійович** *Національний фармацевтичний університет, завідувач кафедри фармацевтичної хімії* |
|  |  |
|  | Кандидат фармацевтичних наук, доцент **ЧУБЕНКО Олександр Владкорович** *Харківська медична акдемія післядипломної освіти, доцент кафедри клінічної біохімії та судово-медичної токсикології* |
|  |  |
| **Провідна установа:** | *Київська медична академія післядипломної освіти ім. П.Л.Шупика* |

Захист відбудеться “25” квітня 2003 року о 1200год. на засіданні спеціалізованої Вченої ради Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м.Харків, вул. Блюхера, 4).

Автореферат розісланий “21” березня 2003 р.

Вчений секретар

спеціалізованої ради МАЛОШТАН Л.М.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

## Актуальність теми

У медичній практиці широко використовуються відхаркувальні і муколітичні засоби. Представниками цієї групи препаратів є бромгексин (список Б) і його метаболіт амброксол. Відомі випадки отруєнь бромгексином. У літературі відсутні відомості про систематичне вивчення цих препаратів у хіміко-токсикологічному відношенні.

Судово-хімічна діагностика інтоксикацій бромгексином і амброксолом складає важку задачу. Це викликано тим, що обставини отруєння часто невідомі, а клінічна картина досить неспецифічна, крім того препарати в організмі не викликають суттєвих органічних перетворень з характерними морфологічними змінами. Таким чином, результати хіміко-токсикологічного аналізу біологічних об'єктів є основним засобом підтвердження отруєння бромгексином і амброксолом. В літературі відсутні відомості про методи ідентифікації, кількісного визначення, методи виділення та очищення від домішок органічного походження та розподіл в органах тварин при токсичних та смертельних дозах, не визначено термін зберігання препаратів в біоматеріалі при його гнитті.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного універсітету (номер державної реєстрації 0198U007011) та проблемної комісії “Фармація” МОЗ України.

**Мета і задачі дослідження.** Метою нашого дослідження є розробка методів ідентифікації, кількісного визначення, умов ізолювання бромгексину та амброксолу з біологічного матеріалу, очищення витяжок від домішок, вивчення розподілу в органах отруєних тварин, термінів зберігання препаратів у біологічному матеріалі при його гнитті.

Для досягнення поставленої мети були поставлені наступні задачі:

* розробити чутливі кольорові, осадові і мікрокристалоскопічні реакції для ідентифікації бромгексину та амброксолу, виділеного з біологічного матеріалу;
* розробити чутливі методики виявлення бромгексину та амброксолу за допомогою методів хроматографії в тонких шарах сорбенту, электрофорезу на папері та УФ-спектроскопії, що дозволяють відрізнити препарати один від іншого, а також від препаратів, які можуть застосовуватися разом з ними;
* вивчити можливість застосування методу хроматографії в тонких шарах сорбенту для ідентифікації та очищення витяжок з біологічного матеріалу, у яких міститься бромгексин та амброксол, від соекстрактивних речовин;
* розробити методи кількісного визначення бромгексину й амброксолу, які придатні в хіміко-токсикологічному та фармацевтичному аналізі (фотоколориметричний, спектрофотометричний, екстракційно-фотометри-чний);
* вивчити вплив природи органічних розчинників та рН середовища на екстракцію бромгексину та амброксолу з водних розчинів;
* порівняти ефективність загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання отруйних та сільнодіючих речовин (О.О.Васильєвої – ізолювання водою, підкисленою кислотою щавлевою; В.П.Крамаренко – ізолювання водою, підкисленою кислотою сірчаною; Стаса-Отто – ізолювання спиртом етиловим, підкисленим кислотою щавлевою) відносно до бромгексину та амброксолу;
* розробити ефективні часткові методи виділення бромгексину та амброксолу з біологічного матеріалу при їх сумісній присутності;
* запропонувати методи виділення бромгексину та амброксолу з біологічних рідин організму (крові і сечі);
* вивчити розподіл бромгексину та амброксолу в органах отруєних ними тварин;
* вивчити зберігання бромгексину та амброксолу в трупному матеріалі при його гнитті;
* на основі проведених досліджень розробити схему хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на бромгексин та амброксол.

*Об'єкти дослідження.* Препарати муколітичої дії – бромгексин та його метаболіт амброксол.

***Предмет дослідження.* Розробка методів ідентифікації бромгексину та амброксолу, їх кількісного визначення, виділення з біологічного матеріалу, розподіл в органах отруєних ними тварин, зберігання в трупному матеріалі при його гнитті.**

*Методи дослідження****.* Для ідентифікації бромгексину та амброксолу у водних розчинах і витяжках з біологічного матеріалу використовували метод тонкошарової хроматографії, УФ- спектроскопії, кольорові та осадові реакції, електрофорез на папері; для кількісного визначення – фотоколориметричний, УФ-спектрофотометричний, екстракційно-фотометричний методи. Для ізолювання бромгексину та амброксолу з біологічного матеріалу використовували загальноприйняті методи О.О. Васильєвої, В.П.Крамаренко, Стаса-Отто, а також часткові методи ізолювання хлороформом, запропонований нами для бромгексину і метод ізолювання** **спиртом етиловим - для амброксолу та бромгексину.**

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше виконано систематичні дослідження бромгексину та амброксолу в хіміко-токсикологічному відношенні.

Розроблено кольорові та осадові реакції, методи хроматографії в тонких шарах сорбенту, УФ-спектроскопії, електрофорезу на папері, які придатні для виявлення бромгексину та амброксолу, виділеного з біологічного матеріалу. Запропоновані реакції і методи дозволяють знайти зазначені препарати при їх сумісній присутності та в присутності інших засобів муколітичної та відхаркувальної дії, які можуть застосовуватися разом з ними.

Розроблено УФ-спектрофотометричні, фотоелектроколориметричні методи кількісного визначення бромгексину та амброксолу. Розроблено екстракційно-фотометричний метод кількісного визначення для бромгексину, який засновано на утворюванні іонного асоціату з метиловим оранжевим.

Вивчено умови (рН середовища, природу органічного розчинника) екстракції бромгексину та амброксолу з водних розчинів органічними розчинниками, що покладено в основу розробки методик виділення препаратів з біологічного матеріалу та біологічних рідин.

Вперше проведено порівняльне вивчення загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання отруйних та сильнодіючих речовин відносно до бромгексину та амброксолу. Розроблено ефективні часткові методики виділення бромгексину та амброксолу при їх сумісній присутності з тканин органів та біологічних рідин (крові, сечі).

Вивчено розподіл бромгексину та амброксолу в органах отруєних ними тварин, що дозволяє вибрати оптимальні об'єкти при проведенні хіміко-токсикологічного аналізу.

Визначено терміни зберігання препаратів у біологічному матеріалі при його гнитті.

На основі проведених досліджень запропонована схема хіміко-токсикологічного дослідження біологічного матеріалу на вміст у ньому бромгексину та амброксолу.

**Практичне значення отриманих результатів.** Розроблено методики виявлення і кількісного визначення бромгексину та амброксолу, виділених з біологічного матеріалу. Застосовано загальноприйняті методи виділення отруйних та сильнодіючих речовин відносно до бромгексину та амброксолу. Запропоновано ефективні часткові методи виділення бромгексину та амброксолу при їх сумісній присутності з тканин органів та біологічних рідин (крові, сечі), які можуть використовуватися в практиці хіміко-токсикологічних і криміналістичних досліджень для рішення питання про отруєння бромгексином і амброксолом, у клінічних лабораторіях - з метою виявлення вмісту бромгексину та амброксолу в біологічних рідинах, а також у фармацевтичному аналізі.

Розроблені методики хіміко-токсикологічного аналізу бромгексину та амброксолу впроваджено в практику судово-хімічної лабораторії обласного бюро судово-медичної експертизи м.Харкова (акт від 17.09.02 р. ), а також у навчальний процес Львівського медичного університету (акт від 22.05.02 р.), Запорізького медичного університету (акт від 20.09.01 р.), на кафедрі клінічної біохімії і судово-медичної токсикології Харківської медичної академії післядипломної освіти (акт від 27.03.02 р.) і на кафедрі фармацевтичної хімії та фармакогнозії Київської медичної академії післядипломної освіти (акт від 14.11.02-14.01.03 р., 06.01.03-08.02.03 р.).

**Особистий внесок здобувача:**

- проведено аналіз літературних даних по методах виявлення, кількісного визначення і фармакологічних властивостях муколітичних препаратів бромгексину та амброксолу;

- розроблено методики ідентифікації і кількісного визначення бромгексину та амброксолу (кольорові та осадові реакції, метод хроматографії в тонких шарах сорбенту, електрофорезу на папері, УФ-спектроскопії, фотоколориметрії, УФ-спектрофотометрії, екстракційної фотометрії);

* вивчено умови екстракції бромгексину та амброксолу з водних розчинів органічними розчинниками в залежності від рН середовища;

- підібрано ефективні умови ізолювання препаратів з об'єктів біологічного походження;

- розроблено ефективні часткові методи виділення бромгексину та амброксолу при їх сумісній присутності з тканин органів і біологічних рідин (крові, сечі);

- вивчено розподіл бромгексину та амброксолу в органах отруєних ними тварин, межі виявлення їх у біологічному матеріалі і терміни їх зберігаємості;

* запропоновано схему хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на бромгексин та амброксол.

Персональний внесок у всіх опублікованих наукових працях зі співавторами (Болотовим В.В., Бондарем В.С., Маміною О.О., Карпушіною С.А., Костіною Т.А.) вказується за текстом дисертації.

**Апробація результатів дисертації.**

Основні результати дисертаційної роботи повідомлено та обговорено на V Національному з'їзді фармацевтів України “Досягнення сучасної фармації і перспективи її розвитку в новому тисячолітті”, (Харків, 1999), Всеукраїнській науково-практичній конференції “Вчені України – вітчизняній фармації” (Харків, 2000), Всеукраїнській науково-практичній конференції “Фармація ХХІ століття” (Харків, 2002).

Робота доповідалась та обговорювалась на міжкафедральному семінарі Національного фармацевтичного універсітету.

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 9 робіт, у тому числі 4 наукові статті, 5 тез доповідей.

**Структура й обсяг роботи.** Дисертація складається з вступу, огляду літератури (розділ 1), експериментальної частини (розділи 2-5), загальних висновків і списку використаних джерел, що включає 172 джерела літератури, з них 41 - іноземних авторів. Робота викладена на 147 сторінках друкованого тексту, ілюстрована 43 таблицями, 12 малюнками і 3 схемами.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

  

І ІІ ІІІ

Бромгексин (І) (бісальвон, сольвін, флегамін) - N-(2-аміно-3,5-дибромбензил)-N-метилциклогексиламіно гідрохлорид.

Амброксол (ІІ) (амбробене, амбросан, лазолван) є метаболітом бромгексину, за хімічною структурою представляє - транс-4-[(2-аміно-3,5- дибромбензил) аміно]-циклогексанола гідрохлорид.

# Ідентифікація бромгексину та амброксолу

Нами була вивчена можливість використання для виявлення бромгексину та амброксолу кольорових, мікрокристалоскопічних реакцій, методів хроматографії в тонких шарах сорбенту, УФ-спектроскопії і електрофорезу на папері.

Запропоновано кольорові реакції на бромгексин та амброксол та деякі інші препарати муколітичної та протикашльової дії (лібексин, тусупрекс, глауцин, дімедрол) з різними кольоровими реактивами. Найбільш чутливими виявилися реактиви Ердмана та Манделіна (межа виявлення складає 10 мкг з обома реактивами), а для амброксолу - реактиви Фреде та Манделіна (межа виявлення складає 15 мкг і 20 мкг відповідно для першого і другого).

Крім того, нами вивчено реакції утворення азобарвника на основі зазначених препаратів з використанням як азоскладового компоненту реактиву Браттона-Маршалла (N-(1-нафтил)-етилендіамина дигідрохлорид). Межа виявлення складає для бромгексину – 0,2 мкг, для амброксолу - 1 мкг. Встановлено значну різницю в часі реакцій азосполучення для даних препаратів. Зазначені розходження, очевидно, пов'язані з тим, що в молекулі амброксолу поряд з процесом діазотування протікає процес нітрозування вторинної аміногрупи бокового ланцюга. В продукті, який при цьому утворюється (ІІІ) може мати місце внутрішньомолекулярна іон-дипольна взаємодія між групою діазонію та поляризованої нітрозогрупою, що і приводить до зазначеної різниці в часі розвитку забарвлення при одержанні азобарвників на основі цих препаратів. Реакцію утворення азобарвника варто вважати найбільш специфічною та селективною для бромгексину та амброксолу тому, що інші муколітичні та протикашльові препарати не мають первинної аміногрупи і не можуть давати цієї реакції.

У роботі також вивчені мікрокристалоскопічні реакції на бромгексин та амброксол з наступними реактивами: сіллю Рейнеке, кислотою пікриновою, амонію тетрароданоцинкатом, амонію тетрароданофератом, амонію тетрароданокупратом, амонію тетрароданокобальтатом, реактивами Драгендорфа і Драгендорфа (модифікація за Муньє), що давали з препаратами аморфні осади різного кольору. Найбільш чутливими виявилися для бромгексину та амброксолу реактив Драгендорфа (модифікація за Муньє), що утворює з препаратами аморфні осади коричневого кольору, мінімум, який відкривається – 0,5 мкг і 1 мкг відповідно, і пікринова кислота – аморфні осади жовтого кольору, мінімум, який відкривається – 1,0 мкг і 2,0 мкг відповідно.

Крім хімічних методів нами розроблено умови виявлення бромгексину та амброксолу методом хроматографії в тонких шарах сорбенту з використанням різних шарів і систем розчинників. Як тонкі шари використовували скляні пластинки для високоефективної тонкошарової хроматографії ( ВЕТШХ, виробництва Естонії, силікагель КСКГ, фракція 5:20 мкм, товщина шару130±25 мкм, розмір пластинки 20х20 мм), пластинки Сорбфіл (силікагель СТХ-ІІА, фракція 5:17мкм, тип підкладки ПЕТФ-І), скляні пластинки фірми Меrск Німеччина (силікагель GF-254, розмір пластинки 10х10 мм).

При хроматографуванні вивчено шість систем розчинників. Найбільш ефективні значення Rf бромгексину мають місце в системах н-бутанол-кислота оцтова -вода (66:17:17) (пластинки Меrск, ВЕТШХ) і гексан-толуол-діетиламін (75:15:10) (пластинки Сорбфіл), для амброксола – у системах –н-бутанол- кислота оцтова-вода (66:17:17) (пластинки Меrск, ВЕТШХ), толуол-ізопропиловий спирт-аміак (80:19:2) (пластинки Сорбфіл) і гексан-толуол-диетиламін (75:15:10) (пластинки ВЕТШХ), а ефективний поділ досліджуваних препаратів досягнуто в системах толуол-ізопропиловий спирт-аміак (80:19:2), гексан-толуол-діетиламін (75:15:10), етилацетат-метанол-діетиламін (30:20:1,5) (пластинки Сорбфіл), і етилацетат-толуол-діетиламін (30:20:1,5) (пластинки ВЕТШХ).

Детектування бромгексину та амброксолу проводили з використанням реактиву Драгендорфа та за допомогою реакції утворення азобарвника з реактивом Браттона-Маршалла. Межа виявлення зазначеними реактивами складає для бромгексину 0,05 мкг і 0,2 мкг відповідно, для амброксолу –0,05 мкг і 1 мкг відповідно. При проявленні плям бромгексину та амброксолу за допомогою реакції утворення азобарвника плями бромгексину забарвлюються негайно, а плями амброксолу – через 2-3 хв, і їх колір поступово посилюється протягом 20 хв.

Метод ТШХ нами був використаний і для виявлення бромгексину та амброксолу в присутності деяких інших лікарських препаратів муколітичної та протикашльової дії (лібексин, тусупрекс, глауцин, димедрол). Найбільшою поділяючою здатністю для препаратів, які можуть застосовуватися разом з бромгексином та амброксолом, володіють системи розчинників толуол-ізопропиловий спирт-аміак (80:19:2) і етилацетат-метанол-діетиламін (30:20:1,5) (пластинки Сорбфіл).

Вивчено УФ-спектри бромгексину та амброксолу, а також продуктів їх діазотування в 0,1 М розчині кислоти хлороводневої (рис.1).

Рис.1. УФ- спектри 10 –4М розчинів бромгексину (1) і амброксолу (2) у 0,1М розчині кислоти хлороводневої, а також продуктів їх діазотування (3) та (4) відповідно.

**λ, нм**

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 350 400

0,1

0,2

0,3

0,4

0,5

0,6

0,7

0,8

0,9

48 46 44 42 40 38 36 34 32 30 28 26 24

# D

1

2

3

4

**ν∙10-3, см-1**

Встановлено, що спектри бромгексину та амброксолу характеризуються наявністю двох смуг поглинання (λmax1 =245 нм і λmax2 = 310 нм для бромгексину, а для амброксолу - λmax1 =244 нм і λmax2 = 308 нм) і практично збігаються, що не дозволяє їх використовувати для ідентифікації препаратів при їх сумісній присутності. Для цієї мети виявилися більш придатними УФ- спектри продуктів діазотування, які значно відрізняються і можуть бути використані для відмінності препаратів.

Умови виявлення бромгексину та амброксолу вивчено і за допомогою електрофорезу на папері. Довжина шляху фреза (ДШФ) бромгексину складає 64±0,5 мм, а амброксолу 76±0,5 мм,що дозволяє ідентифікувати препарати при їх сумісній присутності.

Вивчені методи можуть бути використані для виявлення бромгексину та амброксолу, виділених з біологічного матеріалу, при чому УФ-спектроскопія – після додаткового хроматографічного очищення.

**Кількісне визначення бромгексину та амброксолу.**

Для кількісного визначення бромгексину та амброксолу нами розроблено фотоелектроколориметричний, УФ-спектрофотометричний і екстракційно-фотометричний методи, які придатні у хіміко-токсикологічному аналізі.

Фотоелектроколориметричний метод визначення бромгексину та амброксолу, заснований на реакції утворення азобарвника, де як азоскладовий компонент використовували реактив Браттона-Маршалла. При цьому встановлені значні розходження в часі реакції азосполучення продуктів діазотування бромгексину та амброксолу: 15 та 90 хвилин відповідно. Оптичну густину отриманих розчинів вимірювали за допомогою фотоколориметра КФК-2 (світлофільтр із λеф.=490±10 нм, товщина шару рідини 10 мм). Як розчин порівняння використовували контрольний дослід. Оптична густина забарвлених розчинів для бромгексину підкоряється основному закону світлопоглинання в межах концентрацій від 20 до 140 мкг (у 5 мл кінцевого об’єму), а для амброксолу - від 20 до 100 мкг (у 5 мл кінцевого об’єму).

Розрахунок вмісту бромгексину та амброксолу в досліджуваних розчинах проводили за градуювальним графіком.

Методи придатні для кількісного визначення бромгексину та амброксолу у витяжках з біологічного матеріалу. Відносна помилка методів складає ±1,30% та ±2,32% для бромгексину та амброксолу відповідно.

Розроблено методики УФ-спектрофотометричного визначення бромгексину та амброксолу. Показано, що світлопоглинання розчинів бромгексину та амброксолу в 0,1М розчині кислоти хлороводневої при λmax =310 нм і λmax =308 нм відповідно підкоряється закону Бугера-Ламберта-Бера для бромгексину в межах концентрацій від 10 до 140 мкг бромгексину в 1 мл розчину, а для амброксолу - від 10 до 100 мкг у 1 мл розчину. Відносна помилка методів складає ±0,78% та ±0,98% відповідно. Методи придатні для кількісного визначення бромгексину та амброксолу у витяжках з біологічного матеріалу після їх додаткової хроматографічної очистки.

Нами також запропонована методика кількісного визначення бромгексину методом екстракційної фотоелектроколориметрії, яка заснована на утворенні іонного асоціату бромгексину з метиловим оранжевим.

Оптичну густину забарвлених хлороформних розчинів вимірювали за допомогою фотоколориметра КФК-2 (світлофільтр із λеф. = 540 ± 10 нм, товщина шару рідини 20 мм). Як розчин порівняння використовували контрольний дослід. Оптична густина забарвлених розчинів підкоряється основному закону світлопоглинання в межах концентрацій від 20 до 190 мкг бромгексину в пробі. Розрахунок вмісту бромгексину в досліджуваних розчинах проводили за допомогою градуювального графіку.

Метод придатний для кількісного визначення бромгексину у витяжках з біологічного матеріалу. Відносна помилка методу складає ±1,98%.

### Вивчення умов екстракції бромгексину та амброксолу.

#### Одним з найважливіших етапів хіміко-токсикологічного аналізу є ізолювання отруйних і сильнодіючих речовин з біологічного матеріалу. Важливим фактором, який впливає на процес ізолювання речовин є ступінь екстракції сполук з водних розчинів органічними розчинниками. Тому ми попередньо провели дослідження ступеню екстракції бромгексину та амброксолу з водних розчинів в залежності від рН середовища органічними розчинниками. Для екстракції бромгексину та амброксолу з водних розчинів використовували свіжоперегнані хлороформ, діетиловий ефір і гексан. Необхідні значення рН водних розчинів створювали універсальною буферною сумішшю Бріттона-Робінсона. Значення рН водних розчинів контролювали потенціометрично.

Показано, що бромгексин починає екстрагуватися зазначеними розчинниками при рН 2 (ступінь екстракції хлороформом - 79 %, гексаном-19%, діетиловим ефіром–26%). Максимум екстракції бромгексину хлороформом і діетиловим ефіром має місце при рН 6 та рН 7 відповідно (ступінь екстракції 88 і 85% відповідно) (рис.2). Встановлено, що для екстракції бромгексину з кислих водних витяжок краще використовувати хлороформ, а гексан зручно застосовувати для очищення витяжок з біологічного матеріалу від соекстрактивних речовин.

На відміну від бромгексину амброксол з сильно кислих розчинів практично не екстрагується (при рН 2 ступінь екстракції хлороформом- 4 %, діетиловым ефіром–6%, гексаном амброксол не екстрагується). Максимум екстракції амброксолу хлороформом і діетиловым ефіром має місце при рН 10 (ступінь екстракції 98 і 89% відповідно) (рис. 3). Такий чином для екстракції амброксолу з підлужених водних розчинів краще використовувати хлороформ, а гексан зручно застосовувати для очищення кислих водних витяжок з біологічного матеріалу від соекстрактивних речовин.

#### 

|  |  |
| --- | --- |
| 3  1  2 | 1  2  3 |
| Рис.2 Залежність ступеня екстракції бромгексина різними органічними розчинниками з водних розчинів у залежності від рН середовища:  1 – хлороформ, 2 – діетиловий ефір, 3– гексан. | Рис.3 Залежність ступеня екстракції амброксола різними органічними розчинниками з водяних розчинів у залежності від рН середовища: 1 – хлороформ, 2 – діетиловий ефір, 3 – гексан |

Встановлені розходження в ступенях екстракції досліджуваних препаратів дозволяють розділити їх екстракційно хлороформом (при рН 2 екстрагується тільки бромгексин, а при рН 10 – амброксол і бромгексин).

# Виділення бромгексину та амброксолу з біологічного матеріалу.

У зв'язку з відсутністю в літературі даних про методи виділення бромгексину та амброксолу з біологічного матеріалу, ми поставили за мету вивчити методи, що широко застосовуються в сучасному хіміко-токсикологічному аналізі для виділення отруйних та сильнодіючих речовин відносно бромгексину та амброксолу: спиртом етиловим, підкисленим кислотою щавлевою, а також водою, підкисленою кислотою щавлевою або сірчаною.

Найбільший вихід бромгексину був отриманий за методом В.П.Крамаренка (ізолювання водою, підкисленою кислотою сірчаною) - 21,52%, а для амброксолу – за методом О.О.Васильєвої (ізолювання водою, підкисленою кислотою щавлевою) – 40,51 %. Значно менший вихід бромгексину та амброксолу дає метод Стаса-Отто (ізолювання спиртом, підкисленим кислотою щавлевою) –

5,76 % та 11,63% відповідно.

Отримані дані свідчать про те, що кожний з вивчених методів не дозволяє ефективно ізолювати обидва препарати при їх сумісній присутності. Тому ми спробували розробити ефективні часткові методики ізолювання цих препаратів. Для ізолювання бромгексину нами запропоновано ефективний метод виділення за допомогою хлороформу, що дозволяє ізолювати 58-61% препарату, виділеного з біологічного матеріалу.

Методика ізолювання бромгексину з біологічного матеріалу за допомогою хлороформу заснована на розтиранні біологічного матеріалу з потрійною кількістю безводного натрію сульфату, перенесенні його в скляну колонку та наступному елююванні хлороформом. 1/3 отриманого елюата випаровують на водяній бані, залишок розчиняють у 0,1 М розчині кислоти хлороводневої та в отриманому розчині виявляють і кількісно визначають бромгексин зазначеними нижче методами.

Нами встановлено, що в зазначених умовах амброксол на відміну від бромгексину не ізолюється.

Для ізолювання амброксолу нами запропоновано ефективний метод виділення за допомогою 96% спирту етилового, який дозволяє ізолювати 41-43% препарату, виділеного з біологічного матеріалу.

За цією методикою біологічний матеріал підготовляють і елююють хлороформом, як зазначено вище для бромгексину. Отриманий хлороформний елюат надалі не досліджують, а біологічний матеріал, що залишився, із сульфатом натрію переносять у центрифужні склянки, тричі настоюють з 96% спиртом етиловим. Після кожного настоювання завись центрифугують і спиртову витяжку зливають. Об'єднані спиртові витяжки випаровують на водяній бані, до отриманого залишку додають 10% розчин щавлевої кислоти і проводять екстракцію хлороформом. Отриману «кислу» хлороформну витяжку відставляють і надалі не досліджують. Водну кислу витяжку, що залишилася, підлуговують 25% розчином аміаку і проводять екстракцію хлороформом. В отриманій "лужній " хлороформній витяжці проводять виявлення і кількісне визначення амброксолу.

Таким чином, сполучення часткових методик ізолювання бромгексину хлороформом та амброксолу 96% спиртом етиловим (після елюювання біологічного матеріалу хлороформом, у який переходить бромгексин) дозволило нам одночасно ефективно ізолювати обидва препарати при їх сумісній присутності.

Нами також встановлено, що запропонована методика ізолювання 96% спиртом етиловим може бути використана і для ізолювання бромгексину, якщо суміш біологічного матеріалу з безводним натрію сульфатом попередньо не елюювати хлороформом. При цьому метод дозволяє ізолювати 40,51% бромгексину, що перевищує результати за методом В.П. Крамаренко та Стаса-Отто.

Для виявлення бромгексину та амброксолу у витяжках з біологічного матеріалу використовували метод ТШХ, кольорові реакції, УФ-спектрофотометрію, а також для кількісного визначення препаратів фотоелектроколориметричний, УФ-спектрофотометричний та екстракційно-фотометричний методи.

Для виявлення бромгексину та амброксолу, виділених з біологічного матеріалу, методом УФ-спектрофотометрії, а також для кількісного визначення даним методом необхідне додаткове очищення витяжок за допомогою хроматографії в тонких шарах сорбенту. При цьому використовували пластинки Сорбфіл. У випадку з бромгексином пластинки з нанесеними пробами поміщали в хроматографічну камеру і тричі елюювали гексаном. При цьому плями бромгексину залишалися на старті, а плями соекстрактивних речовин мігрували у бік фінішу. Після цього пластинки висушували і поміщали в камеру із системою розчинників гексан-толуол-діетиламін (75:15:10). Пластинки з амброксолом без попереднього елюювання гексаном тричі елюювали в зазначеній системі. У цих умовах спостерігався задовільний поділ плям бромгексину та амброксолу від соекстрактивних речовин.

Для виявлення і кількісного визначення бромгексину та амброксолу методом УФ-спектрофотометрії проводили попереднє хроматографічне очищення, як зазначено вище. Після цього ретельно елюювали препарат із фрагменту шару сорбенту, що відповідав плямам бромгексину та амброксолу за допомогою хлороформу і 96% спирту етилового відповідно. Екстракт відфільтровували і випарювали. Сухий залишок розчиняли в 0,1М розчині кислоти хлороводневої. Проводили ідентифікацію і кількісне визначення бромгексину та амброксолу в отриманому розчині за допомогою методу УФ-спектрофотометрії.

Нами була запропонована методика виділення бромгексину та амброксолу з крові, що заснована на осадженні формених елементів крові розчином кислоти хлороводневої, екстракції бромгексину з підкисленої плазми хлороформом, підлуговуванні кислого водного розчину, що залишився, 50% розчином натрію гідроксиду до рН 8,0-9,0 і екстракції амброксолу з підлуженої плазми хлороформом. Запропонований метод дозволяє виділити з крові від 42% до 52% бромгексину і від 78% до 80% амброксолу.

Розроблена нами методика виділення бромгексину та амброксолу з сечі заснована на підкисленні сечі 0,1 М розчином кислоти хлороводневої до рН 2,0-3,0 і екстрагуванні бромгексину хлороформом. Після відділення хлороформу кислий водний шар підлуговують 20% розчином натрію гідроксиду до рН 10,0 та екстрагували амброксол хлороформом. В отриманих хлороформних витяжках бромгексин та амброксол ідентифікували методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту, кольоровими реакціями, УФ-спектрофотометрично. Кількісне визначення бромгексину та амброксолу в отриманих витяжках виконували УФ - спектрофотометричним методом. Запропонований метод дозволяє виділити від 59% до 61 % бромгексину та від 60% до 62% амброксолу з сечі.

Токсичні речовини, потрапляючи в організм, розподіляються в різних органах і тканинах нерівномірно, що пов'язано з їх фізичними і хімічними властивостями. Звичайно для рішення задач хіміко-токсикологічного аналізу на дослідження беруть ті органи і рідини, у яких міститься максимальна кількість препарату. При вивченні розподілу бромгексину та амброксолу в органах отруєних тварин (щурів) після перорального введення досліджували ряд органів і біологічних рідин (серце, мозок, печінка, нирки, легені, кишечник і шлунок з вмістом, сечу) . Виділення, виявлення і кількісне визначення бромгексину та амброксолу проводили за допомогою запропонованих нами методів.

Результати досліджень показали, що найбільшу кількість бромгексину можна знайти в шлунку з вмістом, легенях і нирках, а амброксолу – у легенях, шлунку з вмістом, нирках і печінці. Зазначені об'єкти становлять найбільший інтерес для хіміко-токсикологічного аналізу.

Вивчення зберігаємості бромгексину та амброксолу в трупному матеріалі при його гнитті показало, що через 40 діб в ньому ще можна визначити до 12% бромгексину та до 13% амброксолу. При більш тривалому зберіганні бромгексин та амброксол не визначали.

На основі проведених досліджень запропонована схема хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на бромгексин та амброксол.

**ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ**

1. Запропоновано кольорові і мікрокристалоскопічні реакції, а також методи ТШХ, УФ-спектрофотометрії, які придатні для виявлення бромгексину та амброксолу, виділених з біологічного матеріалу.
2. Розроблено доступні і чутливі методи кількісного визначення бромгексину та амброксолу:

а) фотоколориметричний, заснований на реакції утворення азобарвника продуктів діазотування препаратів, де як азоскладовий компонент є N-(1-нафтил)-етилендіаміна дигідрохлорид; оптична густина забарвлених розчинів підкоряється основному закону світлопоглинання в межах концентрацій від 20 до 120 мкг бромгексину в 5 мл кінцевого об’єму; для амброксолу - від 20 до 100 мкг амброксолу в 5 мл кінцевого об’єму; встановлена значна різниця в часі реакцій азосполучення для зазначених препаратів і представлені пояснення цьому факту;

б) екстракційно-фотометричний, заснований на утворенні іонного асоціату бромгексину з метиловим оранжевим; оптична густина забарвлених розчинів підкоряється основному закону світлопоглинання в межах концентрацій від 20 до 190 мкг бромгексину в 16 мл кінцевого об’єму;

в) УФ-спектрофотометричний, заснований на вимірі оптичної густини розчинів бромгексину та амброксолу в 0,1 М розчині кислоти хлороводневої при λmax310 нм і λmax308 нм відповідно, оптична густина розчинів підкоряється основному закону світлопоглинання в межах концентрацій від 10 до 100 мкг у 1 мл для обох препаратів.

Методи придатні для кількісного визначення бромгексину та амброксолу у водних розчинах і у витяжках з біологічного матеріалу. Причому УФ-спектрофотометричний метод після додаткового хроматографічного очищення.

1. Вивчено умови екстракції бромгексину та амброксолу з водних розчинів у залежності від рН середовища. Встановлено, що екстракція бромгексину має місце вже в кислих розчинах, а оптимальним розчинником для екстракції бромгексину з водних розчинів є хлороформ (ступінь одноразової екстракції складає 79%). А гексан зручно використовувати для екстракційного очищення водних витяжок з біологічного матеріалу від соекстрактивних речовин у кислому середовищі. Зазначено, що для екстракції амброксолу з лужних водяних витяжок краще використовувати хлороформ і діетиловий ефір (ступінь одноразової екстракції складає 98-89% відповідно), а гексан зручно застосовувати для очищення кислих водяних витяжок з біологічного матеріалу від соекстрактивних речовин.
2. Вперше проведена порівняльна оцінка виділення бромгексину та амброксолу з біологічного матеріалу загальноприйнятими в хіміко-токсикологічному аналізі методами (встановлено, що зазначені методи дозволяють виділити від 6 до 21% бромгексину і від 12 до 40% амброксолу), а також розроблений більш ефективний і експресний частковий метод ізолювання бромгексину за допомогою хлороформу, що дозволяє виділити 58-61% препарату з біологічного матеріалу. Для амброксолу розроблений частковий метод ізолювання за допомогою етилового спирту, що дозволяє виділити 42-44% препарату. Встановлено, що використання як загальноприйнятих так і приватних методів ізолювання дозволяє розділити бромгексин та амброксол. Однак запропоновані методи дозволяють більш ефективно визначати препарати при їх сумісній присутності.
3. Запропоновано методики виділення бромгексину та амброксолу з біологічних рідин організму (крові і сечі), що дозволяють ізолювати до 51% і 61% бромгексину відповідно, і до 80% і 62% амброксолу відповідно.
4. Вивчено умови виявлення бромгексину та амброксолу у витяжках з біологічного матеріалу методами ТШХ, УФ-спектроскопії і кольоровими реакціями. Для кількісного визначення препаратів у витяжках з біологічного матеріалу були використані розроблені фотоколориметричний, екстракційно-фотометричний і спектрофотометричний методи.
5. Вивчено розподіл бромгексину тай амброксолу в органах отруєних ними тварин при пероральному введенні препаратів. Установлено, що найбільша кількість бромгексину знаходиться в шлунку з вмістом, легенях і нирках; амброксолу - у шлунку з вмістом, легень, нирках і печінці. Ці органи рекомендований використовувати при судово-хімічних дослідженнях біологічного матеріалу у випадку летальних отруєнь препаратами.
6. Вивчено збереження бромгексину та амброксолу в біологічному матеріалі при його гнитті. Установлено, що за допомогою методу ізолювання хлороформом через 40 діб з тканини печінки, що піддалася гнильним змінам, можна виділити до 12% бромгексину, а за допомогою методу ізолювання 96% спиртом етиловим –до 13 % амброксолу.
7. На основі проведених досліджень запропонована схема хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на бромгексин та амброксол.

**Список опублікованих праць за темою дисертації**

1. Полуян С.М., Болотов В.В., Маміна О.О. Фотоколориметричні методи визначення бромгексину // Вісник фармації. – 1997. - № 1. – С.15-16.

Особисто здобувачем проведено розробка фотоколориметричного та екстракційно-фотометричного методів кількісного визначення бромгексину;

1. Полуян С.М., Болотов В.В., Бондар В.С., Карпушина С.А. Ідентифікація бромгексину за допомогою тонкошарової хроматографії, кольорових реакцій та електрофорезу на папері // Вісник фармації. – 2000. - № 2 (22). – С.11-13.

Особисто здобувачем проведено розробка методів ідентифікації бромгексину та амброксолу за допомогою тонкошарової хроматографії, кольорових реакцій та електрофорезу на папері

1. Болотов В.В., Полуян С.М., Костіна Т.А. Применение УФ-спектроскопии и фотоколориметрии для обнаружения и определения бромгексина и амброксола // Фізіологічно активні речовини. – 2000. - № 2 (30). – С. 48-51.

Особисто здобувачем проведено вивчення умов використання УФ-спектроскопії для ідентифікаціїї бромгексину та амброксолу; розробка фотоколориметричного методу кількісного визначення препаратів

1. Болотов В.В., Полуян С.М. Порівняльна оцінка методів виділення бромгексину та амброксолу з біологічного матеріалу // Вісник фармації.- 2003. - №1(33).- С. 21-25.
2. Ідентифікація бромгексину методом хроматографії в тонких шарах сорбенту / С.М.Полуян, В.С.Бондар // Тез. доп. V Націон. з’їзду фармацевтів України “Досягнення сучасної фармації та перспективи її розвитку у новому тмсячолітті”. – Харків. – 1999. – С.516-517.
3. Полуян С.М., Болотов В.В. Фотоколориметрическое определение бромгексина и амброксола // Тез. доп. Всеукраїнської наук.-практ. конф. “Вчені України – вітчизняній фармації” – Х.: НФАУ, 2000. – С. 204-206.
4. Дифауи Муиз Бен Мухамед, Полуян С.М. Исследование степени экстракции амброксола из водных растворов органическими растворителями в зависимости от рН // Тез доп. Наукової конференції молодих вчених та студентів – Х.: НФАУ, 2001. – С.54.
5. Полуян С.М., Болотов В.В. Розподіл бромгексину та амброксолу в органах отруєних щурів. // Тез. доп. ІХ конгресу світової федерації українських лікарських товариств присвячений 25-річчю СФУЛТ – Луганськ – Київ – Чикаго, 2002.-С.468.
6. Полуян С.М., Болотов В.В. Порівняльна оцінка методів ізолювання амброксолу з біологічного матеріалу.// Тез.доп. Всеукраїнської наук.-практ. конф. – Харків, 2002. – С.117-118.

**Полуян С.М.**  «Хіміко-токсикологічне дослідження бромгексину та амброксолу». – Рукопис.

Дисертація на здобуття вченого ступеня кандидата фармацевтичних наук зі спеціальності 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія.-Національний фармацевтичний універсітет, Харків, 2003.

Дисертаційна робота присвячена хіміко-токсикологічному аналізу муколітичних препаратів бромгексину та його метаболіту амброксолу.

У дисертації запропоновано методи виявлення бромгексину та амброксолу за допомогою кольорових і мікрокристалоскопічних реакцій, ТШХ, УФ-спектроскопії. Розроблено фотоколориметричні, УФ-спектрофотометричні методи кількісного визначення бромгексину та амброксолу, а також екстракційно-фотометричний метод для бромгексину.

Вивчено умови екстракції бромгексину та амброксолу з водних розчинів у залежності від рН середовища. Проведено порівняльне вивчення загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів виділення речовин (методи Стаса-Отто, О.О.Васильєвої, В.П.Крамаренко) стосовно до бромгексину та амброксолу. Розроблено ефективні, експресні часткові методи виділення цих препаратів з біологічного матеріалу. Для бромгексину - за допомогою хлороформу та 96% спирту етилового, а для амброксолу – частковий метод ізолювання за допомогою 96% спирту етилового. Розроблено методики ізолювання бромгексину та амброксолу при їх сумісній присутності.

Запропоновано методики виділення бромгексину та амброксолу з біологічних рідин організму (крові і сечі). На основі проведених досліджень запропоновано схема хіміко-токсикологічного аналізу бромгексину та амброксолу у витяжках з біологічного матеріалу.

**Ключові слова:** бромгексин, амброксол, кольорові і мікрокристалоскопічні реакції, хроматографія, спектрофотометрія, фотоелектроколориметрія, екстракційна фотоелектроколориметрія, методи ізолювання, біологічний матеріал, кров, сеча.

**Полуян С.М.**  «Химико-токсикологическое исследование бромгексина и амброксола». – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – Национальная фармацевтическая академия Украины, Харьков, 2003.

Диссертационная работа посвящена химико-токсикологическому анализу муколитических препаратов бромгексина и его метаболита амброксола.

В диссертации предложены методы обнаружения бромгексина и амброксола при помощи цветных и микрокристаллоскопических реакций, ТСХ, УФ-спектроскопии. Разработаны фотоколориметрические, УФ- спектрофотометрические методы количественного определения бромгексина и амброксола, а так же и экстракционно-фотометрический метод для бромгексина.

Изучены условия экстракции бромгексина и амброксола из водных растворов в зависимости от рН среды. Проведено сравнительное изучение общепринятых в химико-токсикологическом анализе методов выделения веществ (методы Стаса-Отто, А.А.Васильевой, В.Ф.Крамаренко) применительно к бромгексину и амброксолу. Разработаны эффективные и экспрессные частные методы выделения этих препаратов из биологического материала для бромгексина с помощью хлороформа, а для амброксола - частный метод изолирования с помощью 96% спирта этилового. Разработаны методики изолирования бромгексина и амброксола при их совместном присутствии.

Предложены методики выделения бромгексина и амброксола из биологических жидкостей организма (крови и мочи). Изучено распределение препаратов в органах отравленных ними животных, а также сберегаемость амброксолв и бромгексина в трупном материале при его гниении. На основе проведенных исследований предложена схема химико-токсикологического анализа бромгексина и амброксола в вытяжках из биологического материала.

**Ключевые слова:** бромгексин, амброксол, цветные и микрокристаллоскопические реакции, хроматография, спектрофотометрия, фотоэлектроколориметрия, экстракционная фотоэлектроколориметрия, методы изолирования, биологический материал, кровь, моча.

**Poluyan S.M.** “The chemico-toxicological investigation of Bromhexine and Ambroxole”. – Manuscript.

The thesis on reception of a scientific degree of the candidate of pharmaceutical sciences on a speciality 15.00.02 – pharmaceutical chemistry and pharmacognosy; National Pharmaceutical University, Kharkov, 2003.

The thesis is devoted to chemico-toxicological analysis of mucolytic preparations Bromhexine and its metabolite Ambroxole.

The Bromhexine and Ambroxole detection by the method of color and microcrystalloscopic reactions, thin-layer chromatography, UV-spectroscopy are offered in the thesis. The reseach of electrophoretic behavior of Bromhexine and Ambroxole has been carried out.

The photoelectrocolorimetric, UV-spectrophotometric methods of Bromhexine and Ambroxole quantitative determination, as well as the extraction- photometric method of Bromhexine are elaborateded.

The conitions of Bromhexine and Ambroxole extraction from aqueous solutions in dependence on pH medium have been studied.

The comparative study of generally accepted in chemico-toxicological analysis of base substances extractive method (Stas-Otto, Vasilyeva, Kramarenko methods) related to Bromhexine and Ambroxole is conducted.

The effective and expressive particular extractive methods of these preparations from biological material, for Bromhexine with the help chloroform and for Ambroxole with the help alcohol, are carried out.

The methods of Bromhexine and Ambroxole isolation in their common presence is carried out.

The extractive method of Bromhexine and Ambroxole from biological liquids of organism (blood, urine) are offered.

On the basis of accomplished researches the scheme of Bromhexine and Ambroxole chemico-toxicological analysis in extracts from biological material is offered.

**Key words**: Bromhexine, ambroxole, color and microcrystalloscopic reactions, chromatography, spectrophotometry, photoelectrocolorimetry, extraction- photometry, methods of isolation, biological material, blood, urine.

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