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

# МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ’Я УКРАЇНИ

# НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

### БОНДАР НАТАЛІЯ МИКОЛАЇВНА

## УДК 615.22.224:54.061/.062:547.822.1

# ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ АМЛОДИПІНУ

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

### АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук

### Харків – 2006

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі токсикологічної хімії

Національного фармацевтичного університету,

Міністерство охорони здоров’я України.

**Науковий керівник**: кандидат хімічних наук, доцент

**МАМІНА ОЛЕНА ОЛЕКСАНДРІВНА**

Національний фармацевтичний університет

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

**БОЛОТОВ ВАЛЕРІЙ ВАСИЛЬОВИЧ**

Національний фармацевтичний університет,

завідувач кафедри аналітичної хімії

доктор фармацевтичних наук, професор

**БУРЯК ВАЛЕРІЙ ПРОКОПОВИЧ**

Запорізький державний медичний університет,

завідуючий кафедри токсикологічної та

неорганічної хімії

**Провідна установа:** Національна медична академія післядипломної

освіти ім. П.Л. Шупіка МОЗ України, кафедра

фармацевтичної хімії та фармакогнозії

Захист відбудеться 15 грудня 2006 року о 12 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті за ардесою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

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

Автореферат розісланий «13» листопада 2006 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради

д.біол.н. професор МАЛОШТАН Л.М.

#### ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

***Актуальність теми.*** У зв’язку з широким застосуванням блокаторів кальцієвих каналів у сучасній медичній практиці в останні роки відмічено істотний зріст гострих отруєнь препаратами цієї групи. Відсутність специфічних антидотів дозволяє віднести отруєння антагоністами іонів кальцію до розряду найбільш небезпечних як для дітей, так і для дорослих. Поява препаратів з повільним вивільненням субстанції ще більше ускладнила токсичну ситуацію і призвела до появи особливостей її перебігу, таких як інфаркти кишечника.

За останніми даними тільки в 2001 році було зареєстровано 9264 отруєння блокаторами кальцієвих каналів, з них в 15% випадків причиною отруєння був амлодипін (норваск), який приймався з лікувальною метою. Таким чином, обраний нами для дослідження препарат - амлодипін за результатами вивчення частоти отруєнь має високий потенціал токсичності та входить до домінуючої групи серцево-судинних засобів, які найчастіше призначаються лікарями – кардіологами.

Випадки важких та летальних отруєнь амлодипіном, випадкові, чи з метою суїциду, добре відомі і документовані. Але в літературі відсутні відомості з систематичного вивчення цього препарату в хіміко – токсикологічному відношенні. Тому хіміко-токсикологічне дослідження амлодипіну є актуальною проблемою.

***Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.*** Дисертацію виконано у відповідності до плану науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету з проблем МОЗ України ”Хімічний синтез, виявлення та аналіз нових фармакологічно активних речовин, встановлення зв’язку ”структура-дія”, створення нових лікарських препаратів” (1998-2002), номер держреєстрації 0198U007011 в УкрІНТЕІ.

***Мета та задачі дослідження****.* Метою цих досліджень була розробка ефективних та експресних методик ізолювання з біологічного матеріалу, виявлення та кількісного визначення амлодипіну, що придатні для хіміко-токсикологічного аналізу.

Для досягнення цієї мети було поставлено такі задачі:

* розробити чутливі методики виявлення амлодипіну та його метаболіту - (4RS)-2-[(2-аминоетокси)метил]-4-(2-хлорфеніл)-6-метилпіридин-3,5-дикарбонової кислоти за допомогою методів хроматографії в тонких шарах сорбенту, спектроскопії в ІЧ- та УФ-області спектра та методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) і вивчити можливість їх застосування для ідентифікації амлодипіну у присутності інших препаратів серцево – судинної групи, які можуть застосовуватися разом;
* розробити методики кількісного визначення амлодипіну, придатні для цілей хіміко-токсикологічного та фармацевтичного аналізу (УФ-спектрофотометрія, екстракційна фотометрія, метод ВЕРХ);
* вивчити вплив природи органічних розчинників та рН середовища на екстракцію амлодипіну з водних розчинів;
* порівняти ефективність загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання органічних речовин основного характеру (О.О. Васильєвої – виділення водою, підкисленою кислотою оксалатною; В.П.Крамаренка – виділення водою, підкисленою кислотою сульфатною; Стаса-Отто – виділення спиртом етиловим, підкисленим кислотою оксалатною; В. А. Карташова – виділення ацетоном; Е.М. Саломатіна – виділення ацетонітрилом; та метод виділення хлороформом) стосовно до амлодипіну;
* розробити ефективні та експресні індивідуальні методики ізолювання амлодипіну з біологічного матеріалу;
* запропонувати методики виділення амлодипіну з біологічних рідин організму (кров, сеча);
* вивчити розподіл амлодипіну в органах тварин, що отруєні препаратом;
* дослідити зберігання амлодипіну в трупному матеріалі при його гнилісному розкладанні;
* на підставі виконаних досліджень розробити схему хіміко-токсикологічного аналізу об’єктів біологічного походження на амлодипін.

***Об`єкт дослідження.***Амлодипін - препарат з групи антагоністів іонів кальцію, який широко застосовується в сучасній кардіологічній практиці.

***Предмет дослідження****.* Методи ідентифікації амлодипіну та його метаболіту - (4RS)-2-[(2-аминоетокси)метил]-4-(2-хлорфеніл)-6-метилпіридин-3,5-дикарбонової кислоти, методики кількісного визначення та виділення з біоматеріалу, розподіл в органах тварин, зберігання в трупному матеріалі.

***Методи дослідження****.* Для ідентифікації амлодипіну та його метаболіту в модельних розчинах та витяжках з біологічного матеріалу використовували методи тонкошарової та високоефективної рідинної хроматографії, ІЧ- та УФ- спектроскопії; для кількісного визначення – УФ-спектрофотометричний, екстракційно-фотометричний методи, метод ВЕРХ. Для ізолювання амлодипіну з біологічного матеріалу використовували загальноприйняті методи О.О.Васильєвої, В.П.Крамаренка, Стаса-Отто, В. А. Карташова, Е.М. Саломатіна та метод ізолювання хлороформом, а також методику ізолювання сумішшю метанолу та ацетонітрилу (2:3), запропоновану нами.

***Наукова новина одержаних результатів.*** Вперше виконано систематичне хіміко-токсикологічне дослідження амлодипіну.

Запропоновано методи високоефективної рідинної хроматографії, хроматографії в тонкому шарі сорбенту, УФ-спектроскопії для виявлення амлодипіну та його основного метаболіту. Розроблено методики кількісного визначення амлодипіну, які придатні для цілей хіміко-токсикологічного та криміналістичного аналізу на основі методів УФ-спектрофотометрії, екстракційної фотометрії та високоефективної рідинної хроматографії.

Вивчено умови (природа органічного розчинника, рН середовища) екстракції амлодипіну з водних розчинів органічними розчинниками, на основі чого розроблена методика його ізолювання з біологічного матеріалу для хіміко-токсикологічних досліджень.

Вперше проведено порівняльне вивчення загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання органічних речовин основного характеру стосовно до амлодипіну. Розроблено ефективну та експресну індивідуальну методику ізолювання амлодипіну з біологічного матеріалу за допомогою суміші метанолу та ацетонітрилу (2:3).

Запропоновано методики виділення амлодипіну з біологічних рідин (крові, сечі).

Вперше вивчено розподіл амлодипіну в органах отруєних тварин, що дозволяє вибрати оптимальні об`єкти для проведення хіміко-токсикологічного аналізу.

Вперше досліджено зберігання амлодипіну в біологічному матеріалі при його гнилісному розкладанні.

На підставі виконаних досліджень запропоновано схему хіміко-токсикологічного дослідження біологічного матеріалу на вміст у ньому амлодипіну.

***Практичне значення одержаних результатів****.*Розроблені методики виявлення та кількісного визначення амлодипіну, який виділено з біологічного матеріалу, можна використовувати на практиці при судово-хімічних дослідженнях для вирішення питань про отруєння амлодипіном, в клінічних лабораторіях з метою визначення амлодипіну в біологічних рідинах, а також у фармацевтичному та криміналістичному аналізі.

Розроблені методики хіміко-токсикологічного аналізу амлодипіну впроваджено в практику судово-хімічних лабораторій (Луганського обласного бюро судово-медичної експертизи (акт від 20.02.05 р.), Харківського обласного бюро судово-медичної експертизи (акт від 01.02. 05 р.), Львівського обласного бюро судово-медичної експертизи (акт від 30,04.2005)), а також у навчальний процес Тернопільської державної медичної академії (акт від 30.05.05 р.), Запорізького державного медичного університету (акт від 28.03. 05 р.), та Львівського національного медичного університету (акт від 04.05. 05 р.).

***Особистий внесок здобувача:***

* проведено аналіз даних літератури стосовно фармакологічних та токсикологічних властивостей препарату з групи блокаторів кальцієвих каналів амлодипіну, існуючих методів його ідентифікації та кількісного визначення;
* розроблено методи ідентифікації амлодипіну та його основного метаболіту - (4RS)-2-[(2-аминоетокси)метил]-4-(2-хлорфеніл)-6-метилпіридин-3,5-дикарбонової кислоти у витяжках з біологічного матеріалу та біологічних рідин (методи тонкошарової та високоефективної рідинної хроматографії, ІЧ- та УФ-спектрофотометрії) і вивчено можливість їх застосування для відділення від препаратів, що можуть застосовуватись разом з амлодипіном або викликають подібну клінічну картину інтоксикації;
* розроблено методики кількісного визначення амлодипіну на основі методів УФ – спектрофотометрії, екстракційної фотометрії та методу ВЕРХ;
* вивчено умови екстракції амлодипіну з водних розчинів органічними розчинниками в залежності від рН середовища;
* проведено порівняльну оцінку ефективності ізолювання амлодипіну з біологічного матеріалу загальноприйнятими в хіміко-токсикологічному аналізі методами;
* запропоновано методику ізолювання амлодипіну з секційного матеріалу за допомогою суміші метанолу та ацетонітрилу (2:3);
* запропоновано методики виділення амлодипіну з біологічних рідин організму (крові, сечі);
* досліджено розподіл амлодипіну в органах отруєних тварин, а також зберігання препарату в біологічному матеріалі;
* розроблено схему хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на амлодипін.

Персональний внесок у всіх опублікованих наукових працях зі співавторам (Бондарем В.С. та Маміною О.О.) вказується за текстом дисертації.

***Апробація результатів дисертації****.* Основні результати дисертаційної роботи викладені та обговорені на науковій студентській конференції (Харків, 2002), всеукраїнській науково-практичній конференції “Фармація XXI століття” (Харків, 2002), IX конгресі світової федерації українських лікарських товариств, присв´ячений 25-річчю СФУЛТ (Луганськ, 2002), науково-практичній конференції з міжнародною участю “Створення, виробництво, стандартизація, фармакоекономіка лікарських засобів та біологічно активних добавок” (Тернопіль, 2004 ), VII міжнародній науково – практичній конференції “Наука і освіта` 2004” (Дніпропетровськ, 2004), всеукраїнській науково-практичній конференції “Проблеми діагностики, профілактики та лікування екзогенних та ендогенних інтоксикацій” (Чернівці, 2004), VI національному з´їзді фармацевтів України „Досягнення та перспективи розвитку фармацевтичної галузі Украни” (Харків, 2005), науково-практичній конференції з міжнародною участю Стан та перспективи судово-токсикологіної служби та наукових досліджень” (Харків, 2005), II міжнародній науково-практичній конференції „Науковий потенціал світу – 2005” (Дніпропетровськ, 2005), IV міжнародній науково-практичній конференції „Динаміка наукових досліджень´2005” (Дніпропетровськ, 2005).

***Публікації*.** За результатами дисертаційного дослідження опубліковано 15 друкованих робіт, з них 5 статей (у фахових наукових виданнях) та 10 тез доповідей.

***Об`єм і структура дисертації.*** Робота викладена на 151 сторінці, вміщує в собі 37 таблиць, 19 рисунків, 1 схему. Складається з вступу, 6 розділів, загальних висновків та списку літератури (139 джерел, з яких 56 іноземних авторів) та додатків.

***На захист виносяться наступні результати експериментальних випробувань і їх теоретичне обгрунтування****:*

* методи ідентифікації амлодипіну і його основного метаболіту за допомогою хроматографії в тонких шарах сорбенту, високоефективної рідинної хроматографії, ІЧ- та УФ-спектроскопії;
* методики кількісного визначення амлодипіну на основі екстракційно-фотометричного і УФ - спектрофотометричного методів та методу ВЕРХ;
* умови екстракції амлодипіну органічними розчинниками;
* методики ізолювання амлодипіну з секційного матеріалу та біологічних рідин (кров, сеча);
* результати розподілу амлодипіну в органах отруєних ним тварин і його зберігання в біологічному матеріалі.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**



Амлодипіну бесилат - 3-етил-5-метил (4RS)-2-[(2-аміноетокси)метил]-4-(2-хлорфеніл)-6-метил-1,4-дигідропіридину-3,5-дикарбоксилату бензенсульфонат.

Загальна формула - С26Н31ClN2O8S, молекулярна маса 567,1

Препарат відносять до групи блокаторів кальцієвих каналів.

**Об'єкти та методи дослідження**

Об’єктом дослідження було обрано визначення препарату з групи блокаторів кальцієвих каналів амлодипіну та деяких інших препаратів серецево-судинної групи при токсикологічному аналізі.

З методів, обраних для дослідження, використовувались загальноприйняті у хіміко-токсикологічному аналізі методи ізолювання (Стаса-Отто, О. О. Васильєвої, В. П. Крамаренка,

В. А. Карташова, Е.М. Саломатіна та метод ізолювання хлороформом), ІЧ- та УФ-спектроскопія, екстракційна фотометрія, ТШХ, ВЕРХ та дослідження на тваринах.

**Ідентифікація амлодипіну та його метаболіту**

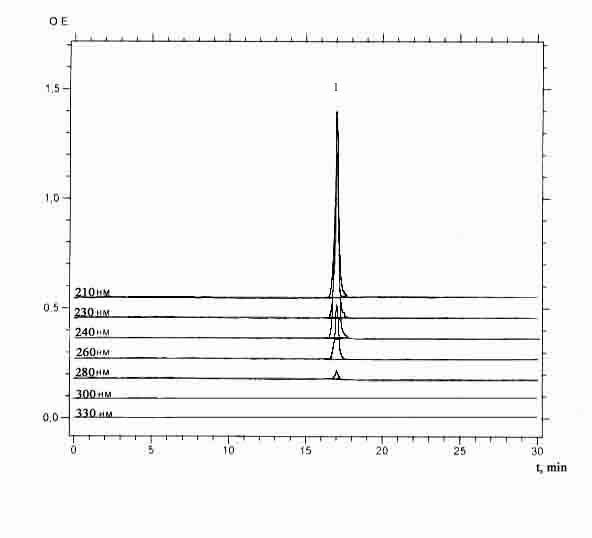
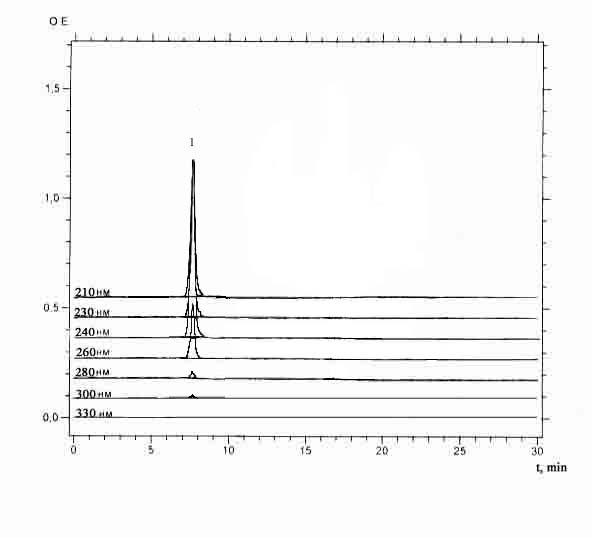
Нами було досліджено можливість використання методів ТХШ, ВЕРХ та УФ - спектрофотометрії для ідентифікації основи амлодипіну та його метаболіту - (4RS)-2-[(2-аминоетокси)метил]-4-(2-хлорфеніл)-6-метилпіридин-3,5-дикарбонової кислоти.

Оскільки метод ТШХ в даний час в лабораторіях України використовують як скринінговий метод, то на першому етапі аналізу було проведено хроматографування основи амлодипіну, його метаболіту та деяких препаратів серцево–судинної групи (атенололу, пропранололу, верапамілу, фенігедину та еналаприлу) в загальних системах розчинників на пластинках ВЕТШХ та дослідження дії проявників, рекомендованих для загальних систем, до цих препаратів. Хоч амлодипін, як основа середньої сили, потрапляє і до кислої, і до лужної хлороформної витяжки, але надійне значення величини Rf вдалося отримати тільки в системах, рекомендованих для речовин лужної природи. Системи хлороформ-ацетон (90:10) та хлороформ-діоксан-ацетон-25% р-н амоніяку (47,5:45:5:2,5) виявилися найбільш придатними для розділення амлодипіну та його метаболіту (в першому випадку амлодипін залишається практично на старті, Rf дорівнює 0,10, а Rf метаболіту складає близько 0,34, в другому випадку Rf амлодипіну складає 0,31, а Rf метаболіту 0,11). Розрізнити усі досліджувані препарати за значенням Rf дозволяють системи толуол-ацетон-етанол-25% розчин амоніяку (45:45:7,5:2,5) та етилацетат-метанол-25% розчин амоніяку (85:10:2,5). Відрізнити амлодипін та отриманий метаболіт можливо також за допомогою методу ВЕРХ.

На другому етапі проводили хроматографування зазначених препаратів в часткових системах з використанням різних типів хроматографічних пластинок та різних проявників. Оптимальними системами для розділення досліджуваних препаратів є системи етилацетат – метанол – 25% р-н амоніаяку (80:10:10) (при застосуванні пластин ВЕТШХ). Системами, які забезпечують надійне значення Rf для амлодипіну на усіх типах використаних пластин, є метанол – хлороформ (1:9) та хлороформ – ацетон – 25% р-н амоніяку (15:15:1). З випробуваних проявників селективним до амлодипіну є реактив Лібермана, який при взаємодії з препаратом дає оранжеве забарвлення. Відрізнити амлодипін та його основний метаболіт за допомогою реакцій забарвлення неможливо, оскільки він дає аналогічне до нативного препарату забарвлення з усіма проявниками, з якими реагує амлодипін.

### Для ідентифікації амлодипіну, його метаболіту та розділення від деяких препаратів серцево – судинної групи було також застосовано такий високочутливий та сучасний метод, як ВЕРХ. Хроматографічний аналіз амлодипіну проводили на мікроколонковому рідинному хроматографі “Міліхром А-02” (Новоросійськ, АТ “Еконова”). Для дослідження застосовували колонку довжиною 75 мм та діаметром 2 мм, яка була наповнена сорбентом з неполярною фазою – Nucleosil-100-5, С18. Аналіз проводили у зворотньо-фазовому варіанті, який найбільш широко застосовується для лікарських препаратів [99 - 102]. Детектування препаратів виконувалося двопроменевим мультихвильовим УФ-спектрофотометром при наступних довжинах хвиль: 210, 230, 240, 260, 280, 300, 330 нм. Точність довжини хвилі 0,5 нм. Оптимальний тиск (1,9 МПа) при додаванні елюєнту в колонку забезпечувався двоступеневим насосом з об´ємом одного ступеня – 2500мкл. Для створення оптимального температурного режиму використовували колонковий нагрівач. Температура колонки -35°С. Автоматичний відбір проб забезпечували запрограмованим автосамплером. Об´єм проби – 5 мкл. Концентрація препаратів – 500 мкг/мл, час проведення аналізу – 30 хв.

Встановлено, що при даних умовах хроматографування абсолютний час утримання амлодипіну становить 7,60±0,02 хв., а абсолютний об`єм утриманя 760 мкл (рис.1), абсолютний час утримання амлодипіну бесилату становить 17,02±0,02 хв., а абсолютний об`єм утриманя 1702 мкл (рис. 1-2). Абсолютний час утримання для метаболіту, отриманого нами в результаті проведення лужного гідролізу препарату та метаболіту, який було знайдено в екстракті з кишечника отруєних амлодипіном щурів, співпадав і складав 18,3±0,02 хв., що дало нам змогу ідентифікувати отриману нами сполуку як метаболіт амлодипіну - (4RS)-2-[(2-аминоетокси)метил]-4-(2-хлорфеніл)-6-метилпіридин-3,5-дикарбонової кислоти (рис. 3 - 4).

 Рис. 1. Хроматограма основи амлодипіну Рис. 2. Хроматограма амлодипіну бесилату

(метод ВЕРХ) (метод ВЕРХ)

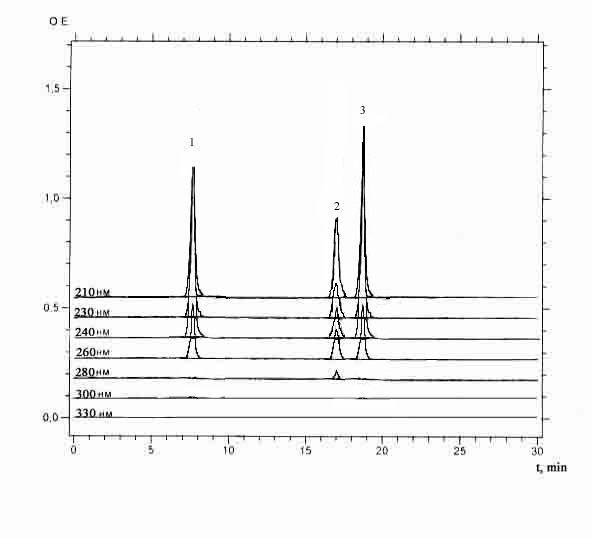
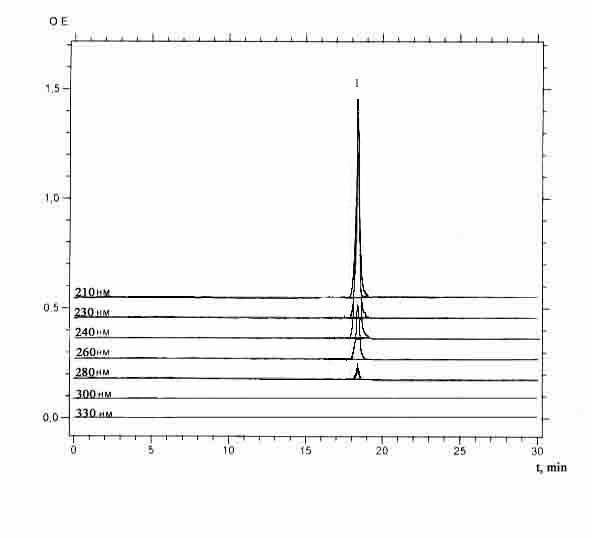
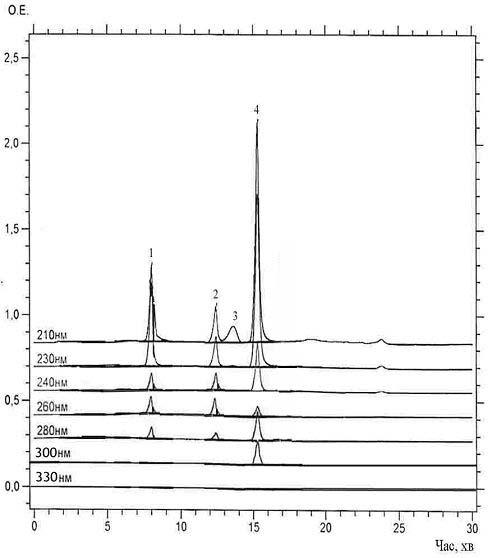


Рис. 3. Хроматограма метаболіту амлодипіну – Рис. 4. Хроматограма витяжки, отриманої

(4RS)-2-[(2-аминоетокси)метил]-4-(2-хлорфеніл) з кишечника отруєного амлодипіном

-6-метилпіридин-3,5-дикарбонової кислоти щура (1-основа амлодипіну;

2-амлодипіну бесилат; 3-метаболіт)

 **При досліджені поведінки амлодипіну при сумісній присутності з деякими препаратами серцево-судиної групи за даних умов спостерігалося їх задовільне розділення (рис. 5).**

**Рис. 5. Хроматограма амлодипіну в суміші з іншими кардіологічними препаратами:**

**1-амлодипін, 2-метопролол,**

**3-еналоприл, 4-анаприлін (пропранолол).**

Досліджено поведінку амлодипіну в УФ-області спектра в різних розчинниках: воді, 0,1М розчині кислоті хлоридної в метанолі, хлороформі та метанолі. В усіх досліджених розчинниках в області довжини хвиль від 220 до 390 нм амлодипін має чіткий максимум світлопоглинаня:

в 0,1 М розчині кислоти хлоридної в метанолі, в хлороформі та в метанолі - при λ = 245± 2, та при λ = 365 ± 2 нм; в воді – при λ = 237 ± 2 нм та при λ = 365 ± 2 нм (рис. 6).



**А**

**λ, нм**

4

2

1

3

Рис.6. УФ – спектри амлодипіну в різних розчинниках (25 мкг/мл):

1. - у воді; 2 - в метанолі; 3 - в 0,1М розчині кислоти хлоридної в метанолі; 4 - в хлороформі;

**Кількісне визначення амлодипіну.**

Для кількісного визначення амлодипіну нами було розроблено доступні і надійні екстракційно-фотометорична, УФ-спектроскопічна методики, а також методика ВЕРХ.

Методика кількісного визначення амлодипіну, розроблена на основі методу екстракційної фотометрії, заснована на утворенні іонного асоціату препарату з метиловим оранжевим та бромтимоловим синім. Було експериментально встановлено, що іонний асоціат амлодипіну з кислотним барвником - метиловим оранжевим екстрагується хлороформом у слабкокислому ( рН = 4,6 ), а з бромтимоловим синім у нейтральному або слабколужному (рН = 7,0-8,0) сердовищі при цьому розчини забарвлюються в жовтий колір. Вільний барвник за цих умов хлороформом не екстрагується. Оскільки інтенсивність забарвлення отриманих розчинів незначна, то для підвищення чутливості методу отриманий іонний асоціат з метиловим оранжевим розкладали додаванням до хлороформного розчину 1% розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі, з бромтимоловим синім – 0,02 М розчину натрію гідроксиду. Барвники при цьому звільнюються та надають розчинам відповідно інтенсивного червоного та синього забарвлення. Кількість барвника, що звільнилась, еквівалентна кількості амлодипіну в іонному асоціаті. Оптичну густину забарвлених розчинів вимірювали на фотоколоріметрі КФК-2 (світлофільтр з λеф = 540 нм, товщина кювети 10 мм - при використанні метилового оранжевого; та λеф = 590 нм, товщина кювети 20 мм - при використанні бромтимолового синього). Експериментальні дані свідчать, що відносні невизначеності методів відповідно 2,40% та 2,92%, підпорядкування основному закону світлопоглинання Бугера – Ламберта – Бера знаходиться в межах 20,0 – 160,0 мкг в пробі та 10 – 90 мкг в пробі відповідно. Розрахунок вмісту амлодипіну в розчинах, що досліджували, проводили за допомогою градуювального графіка.

Розроблено методики кількісного визначення амлодипіну за допомогою методу УФ-спектрофотометрії в хлороформному розчині (відносна невизначеність 1,64%, підпорядкування основному закону світлопоглинання знаходиться в межах 5,0 - 30,0 мкг/мл) та в 0,1 М розчині кислоти хлороводневої в метанолі (відносна невизначеність 1,80%, підпорядкування основному закону світлопоглинання знаходиться в межах 10,0 -70,0 мкг/мл).

Кількісне визначення амлодипіну за методом ВЕРХ проводили в умовах, наведених для ідентифікації препарату. Для визначення вмісту амлодипіну в об`єктах досліджень використовували побудований градуювальний графік (рис. 7). Лінійність побудованого графіка спостерігається в інтервалі концентрацій від 5,0 до 500,0 мкг/мл, відноснаневизначеність 1,30 **%**.



**S, мм**

**С, мкг/мл**

Рис. 7. Градуювальний графік для кількісного визначення амлодипіну методом ВЕРХ.

**Вивчення умов екстракції амлодипіну з водних розчинів.**

Для розробки оптимальних умов ізолювання амлодипіну з біологічного матеріалу необхідно було дослідити екстракцію препарату з водних розчинів деякими органічними розчинниками в залежності від рН середовища. Для створення необхідних значень рН водних розчинів використовували універсальну буферну суміш Бріттона – Робінсона і контролювали значення рН готових розчинів потенціометрично. Графічне зображення результатів дослідження наведено на рис. 8. Експериментальні дані свідчать, що амлодипін найкраще екстрагується усіма використаними органічними розчинниками з лужного середовища. При цьому максимальна кількість препарату екстрагується при значеннях рН від 7,0 до 8,0 і складає близько 81,3% для хлороформу, 56,7% для діетилового ефіру та 44,7% для бензолу. Всі досліджені органічні розчинники можна використовувати для екстракції амлодипіну з лужних витяжок. Діетиловий ефір практично не екстрагує амлодипін з водного середовища при рН = 2,0, (3,3%), що можна використовувати для очищення у процесі виділення препарату з об`єктів біологічного походження.

Рис. 8. Залежність ступеня екстракції амлодипіну (R – середнє з 5ти визначень ) з водних розчинів від природи органічних розчинників при різних значеннях рН середовища

**Виділення амлодипіну з біологічного матеріалу.**

На першому етапі дослідження було проаналізовано ефективність ізолювання амлодипіну з біологічного матеріалу при використанні загальноприйнятих методів ізолювання речовин, важливих у токсикологічному відношенні: методу О.О. Васильєвої (ізолювання водою, підкисленою кислотою оксалатною), методу В.П. Крамаренка (ізолювання водою, підкисленою кислотою сульфатною), методу Стаса-Отто (ізолювання спиртом етиловим, підкисленим кислотою оксалатною), методу В. А. Карташова (ізолювання ацетоном), методу Е.М. Саломатіна (ізолювання підкленим ацетонітрилом) та ізолювання хлороформом. Встановлено, що дані методи дозволяють виділити від 20 до 76% препарату з біологічного матеріалу.

За допомогою розробленої методики ізолювання амлодипіну з біологічного матеріалу з використанням суміші метанолу та ацетонітрилу (2:3) можна ізолювати близько 80-82% препарату відповідно.

**Виявлення амлодипіну в витяжках з біологічного матеріалу.**

Для виявлення амлодипіну у витяжках з біологічного матеріалу використовували метод хроматографії в тонких шарах сорбенту на пластинках ВЕТШХ (силікагель КСК, тип підкладки скло, розмір пластинок 20х20 см) та УФ-спектрофотометрію.

**Виділення амлодипіну з біологічних рідин**

Нами також запропоновані методики виділення амлодипіну з біологічних рідин організму (крові, сечі). Методика виділення амлодипіну з крові заснована на осадженні формених елементів крові 10% розчином кислоти хлоридної (з центрифугуванням), очищенні кислої водної витяжки ефіром діетиловим, та екстракції препарату за допомогою хлороформу.

Виділення амлодипіну з сечі засновано на підкисленні проб 0,1 М розчином кислоти хлоридної до рН 2,0-3,0, очищенні кислої водної витяжки ефіром діетиловим та екстракції препарату хлороформом. Розроблені методики дозволяють виділити близько 51-55% амлодипну з крові та 78-79% з сечі (рис. 9)



Рис. 9. Результати ізолювання амлодипіну з біологічних рідин.

**Вивчення розподілу амлодипіну в органах отруєних ним тварин**

Результати вивчення розподілу амлодипіну в органах отруєних тварин (щурів) через 5 годин після внутрішньошлункового введення препарату показали, що амлодипіну в найбільших кількостях знаходиться у шлунку і кишечнику із вмістом, легенях, сечі та селезінці (рис. 10).

кров



сеча

селезінка

серце

легені

Рис. 10. Розподіл амлодипіну в органах отруєних ним тварин (у відсотках до знайденого)

печінка

кишечник

шлунок

нирки

**Зберігання амлодипіну в біолгічному матеріалі при його гнилісному розкладанні**

Вивчено зберігання амлодипіну в трупному матеріалі при його гнитті. Визначено, що із застосуванням методу ізолювання амлодипіну за допомогою метанолу та ацетонітрилу (2:3) після 30-добового зберігання у біологічному матеріалі (тканина печінки) можна виділити близько 24% амлодипіну, а через 40 діб 3,52% препарату (рис.11).

Рис. 11. Результати вивчення зберігання амлодипіну в біологічному матеріалі при його гнитті.

На основі проведених досліджень запропонована схема спрямованого хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на амлодипін (рис.12).

**Настоювання 10 г подрібнених органів з сумшшю метанол-ацетонітрил (2:3) підкисленою 10% р-ном НСl**

**Лужний водний розчин не досліджується**

# Екстракція хлороформом (тричі)

**Рис. 12. Спрямований хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на амлодипін**

**Екстракційна фотометрія з метиловим оранжевим або з бромтимоловим синім**

**Метод ВЕРХ**

**УФ-спектрофотометрія (у 0,1 М**

**р-ні НСl в метанолі або у хлороформі)**

**Метод ВЕРХ**

**ТШХ в системі хлороформ-діоксан-ацетон-25% р-н амоніяку (47,5:45:5:2,5)**

**проявники: р-в Драгендорфа за Мун’є;**

**УФ-світло**

# Кількісне визначення

# 2/3 витяжки

**Ідентифікація**

**1/3 витяжки**

**Хлороформну витяжку фільтрують, випарюють до сухого залишку. Сухий залишок розчиняють в 15 мл хлороформу і аналізують**

**Підлуження очищеної водно-менатольно-ацетонітрильной витяжки 20% р-ном натрію гідроксиду (рН 7,0-8,0)**

**Органічна фаза не досліджується**

**Очищення витяжки від домішок діетиловим ефіром**

**ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ**

1. Запропоновано кольорові, осадові та мікрокристалоскопічні реакції, а також методи ТШХ, УФ-спектрофотометрії, та ІЧ-спектроскопії, які придатні для виявлення амлодипіну, виділеного з біологічного матеріалу.
2. Вивчено умови ідентифікації амлодипіну за допомогою методу ВЕРХ як окремої речовини, так і в суміші з іншими препаратами серцево-судинноі групи
3. Розроблено доступні та чутливі методики кількісного визначення амлодипіну у водних розчинах та витяжках з біологічного матеріалу:

- екстракційно-фотометрична, заснована на утворенні іонного асоціату з метиловим оранжевим (підпорядкування розчинів основному закону світлопоглинання в межах концентрацій 20,0 – 160,0 мкг препарату у 15 мл кінцевого об`єму; відносна невизначеність методу – 2,40%) та бромтимоловим синім (підпорядкування основному закону світлопоглинання знаходиться в межах 10,0 – 90,0 мкг в пробі, відносна невизначеність 2,92%).

-УФ-спектрофотометрична: в хлороформному розчині (відносна невизначеність 1,64%, підпорядкування основному закону світлопоглинання знаходиться в межах 5,0 - 30,0 мкг/мл) та в 0,1 М розчині кислоти хлоридної в метанолі (відносна невизначеність 1,80%, підпорядкування основному закону світлопоглинання знаходиться в межах 10,0 -70,0 мкг/мл).

- метод ВЕРХ: межі визначення препарату 5,0-500,0 мкг/мл, відносна невизначеність

методу 1,30%.

1. Вивчено умови екстракції амлодипіну з водних розчинів у залежності від рН середовища та природи органічного розчинника. При цьому максимальна кількість препарату екстрагується при значеннях рН від 7,0 до 8,0 і складає близько 81,3% для хлороформу, 56,7% для діетилового єфіру та 44,7% для бензолу. Всі досліджені органічні розчинники можна використовувати для екстракції амлодипіну з лужних витяжок. Діетиловий ефір практично не екстрагує амлодипін з водного середовища при рН = 2,0, (3,3%), що можна використовувати для очищення у процесі виділення препарату з об`єктів біологічного походження.
2. Вперше проведено порівняльну оцінку ефективності виділення амлодипіну з біологічного матеріалу загальноприйнятими у хіміко-токсикологічному аналізі методами, а також розроблено більш ефективний і експресний метод ізолювання амлодипіну метанолом і ацетонітрилом (2:3), який дозволяює виділити близько 82% препарату.
3. Вивчено умови виявлення амлодипіну у витяжках з біологічного матеріалу хімічними методами та методом ТШХ. Для кількісного визначення препарату у витяжках було застосовано екстракційно-фотометричний та УФ-спектрофотометричний методи.
4. Запропоновано методики виділення амлодипіну з біологічних рідин організму (крові, сечі), які дозволяють ізолювати близько 55% із сечі та близько 79% із сечі.
5. Вивчено розподіл амлодипіну в органах отруєних тварин при пероральному введенні. Встановлено, що для хіміко-токсикологічного дослідження при летальних отруєннях амлодипіном варто направляти на аналіз сечу, шлунок з вмістом, кишечник з вмістом, селезінку та нирки.
6. Досліджено зберігання амлодипіну в біологічному матеріалі при його гнитті, та встановлено, що за допомогою методу ізолювання метанолом та ацетонітрилом (2:3) через 30 діб із тканин печінки, яка піддалася гнилісним змінам, можливо виділити приблизно до 24% препарату, а через 40 діб 3,52% препарату.
7. На основі проведених досліджень запропоновано схему хіміко- токсикологічного дослідження біологічного матеріалу на амлодипін.

Розроблені методики хіміко-токсикологічного аналізу амлодипіну впроваджено в практику судово-хімічних лабораторій (Луганського обласного бюро судово-медичної експертизи (акт від 20.02.05 р.), Харківського обласного бюро судово-медичної експертизи (акт від 01.02. 05 р.), Львівського обласного бюро судово-медичної експертизи (акт від 30,04.2005)), а також у навчальний процес Тернопільської державної медичної академії (акт від 30.05.05 р.), Запорізького державного медичного університету (акт від 28.03. 05 р.), та Львівського національного медичного університету (акт від 04.05. 05 р.).

**СПИСОК ОПУБЛИКОВАХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Бондар Н.М., Бондар В.С., Маміна О.О. Розробка методів ідентифікації амлодипіну, придатних для хіміко-токсикологічного аналізу.//Вісник фармації. - 2004. - №2 (38). - С.18-22. Особистий внесок здобувача: розробка хімічних, хроматографічних та спектрофотометричних методів ідентифікації амлодипіну, статистична обробка даних, участь у написанні статті.
2. Бондар Н.М., Бондар В.С., Маміна О.О. Застосування високоефективної рідинної хроматографії в аналізі амлодипіну при його сумісній присутності з іншими препаратами серцево-судинної дії.//Фармацевтичний журнал .- 2004. - №4.- С. 74-78. Особистий внесок здобувача: розробка методики ідентифікації амлодипіну за допомогою ВЕРХ як окремої речовини, так і в суміші з іншими препаратами серцево-судинної групи, статистична обробка даних, участь у написанні статті.
3. Бондар Н.М., Бондар В.С., Маміна О.О. Дослідження умов екстракції амлодипіну з водних розчинів органічними розчинниками та його аналіз в біологічних рідинах організму.//Запорожский медицинский журнал.- 2004.-№5.-С.146-149. Особистий внесок здобувача: дослідження умов екстракції амлодипіну з водних розчинів органічними розчинниками, розробка методик ізолювання препарату з біологічних рідин організму (крові та сечі), статистична обробка даних, участь у написанні статті.
4. Маміна О.О., Бондар Н.М. Розробка методів кількісного визначення амлодипіну, придатних для хіміко-токсикологічного аналізу.// Фармацевтичний журнал.- 2005. - №5. – С. 87-92. Особистий внесок здобувача: розробка методик кількісного визначення амлодипіну за допомогою УФ-спектрофотометрії, екстракційної фотометрії та методу ВЕРХ, статистична обробка даних, участь у написанні статті.
5. Бондар Н.М., Бондар В.С., Маміна О.О. Дослідження ефективності методів ізолювання амлодипіну з біологічного матеріалу. //Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики. Збірник наукових статей, Запоріжжя: Вид-во ЗДМУ. – Вип.XV, Т.1. - 2006. – С. 70-75. Особистий внесок здобувача: дослідження по виділенню амлодипіну з біологічного матеріалу за допомогою загальноприйнятих методів у хіміко-токсикологічному аналізі, розробка власної методики ізолювання, статистична обробка даних, участь у написанні статті.
6. Бондар Н.М., Бондар В.С., Маміна О.О. Дослідження ступіню екстракції амлодипіну з водних розчинів. //В кн.: Тези доповідей наукової студентської конференції, Харків: Вид. НФаУ. - 2002.-С.25.
7. Бондар Н.М., Бондар В.С., Маміна О.О. Розробка методів ідентифікації амлодипіну для проведення хіміко-токсикологічних досліджень.// Тези доповідей ІХ конгрес світової федерації українських лікарських товариств, присвячений 25-річчю СФУЛТ(19-22 серпня 2002р., м. Луганськ).- Луганськ-Київ-Чикаго.- 2002.-С.456.
8. Бондар Н.М., Бондар В.С., Маміна О.О. Ізолювання амлодипіну з біологічного матеріалу та його ідентифікація. // В кн.: Тези доповідей всеукраїнської науково-практичної конференції (23-24 жовтня 2002р., м. Харків). Харків: Вид. НФаУ.- 2002.-С.106.
9. Бондар Н.М., Бондар В.С., Маміна О.О. Дослідження по ізолюванню амлодипіну з біологічних рідин організму.// В кн.: Матеріали VII міжнародної науково-практичної конференції “Наука і освіта 2004” 10-25 лютого 2004 року. Том 52. Хімія та хімічні технології.Дніпропетровськ.:- 2004. – С. 58-59.
10. Бондар Н.М., Бондар В.С., Маміна О.О. Кількісне визначення амлодипіну методом екстракційної фотометрії з використанням бромтимолового синього.// В кн.: „Створення, виробництво, стандартизація, фармакоекономіка лікарських засобів та біологічно активних добавок”. Матеріали науково практичної конференції з міжнародною участю. Тернопіль.: “Укрмедкнига”. – 2004. – С. 263-265.
11. Бондар Н.М., Бондар В.С., Маміна О.О. Вивчення умов екстракції амлодипіну з біологічного матеріалу.// В кн.: Проблеми діагностики, профілактики та лікування екзогенних та ендогенних інтоксикацій: Тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції. м. Чернівці, 16-18 жовтня 2004 року. Чернівці.: - 2004. – С.90-92.
12. Бондар Н.М., Бондар В.С., Маміна О.О. Порівняльна оцінка спектральних методів кількісного визначення амлодипіну.// В кн.: Матеріали VI Національного з′їзду фармацевтів України „Досягнення та перспективи розвитку фармацевтичної галузі України”. 28-30 вересня 2005 року. Харків.: Видавництво НФаУ - 2005. – С 145-147.
13. Бондар Н.М., Бондар В.С., Маміна О.О. Ідентифікація амлодипіну за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії.// В кн.: Матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції “Динаміка наукових досліджень 2005”. Том 65. Хімія. Дніпропетровськ.: Наука і освіта - 2005. – С. 3-4.
14. Бондар Н.М., Маміна О.О. Ізолювання амлодипіну з біологічного матеріалу за допомогою хлороформу.// В кн.: Матеріали II Міжнародної науково-практичної конференції „Науковий потенціал світу – 2005”. Том 9. – Дніпропетровськ: Наука і освіта – 2005. – С. 52-54.
15. Бондар Н.М., Бондар В.С., Маміна О.О. Ізолювання амлодипіну з біологічного матеріалу за допомогою метанолу та ацетонітрилу (4:6).// В кн.: Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю „Стан, перспективи судово-токсикологічної служби та наукових досліджень” 9-10 листопада 2005 р. – Х.: Вид-во НФаУ, 2005. – С. 35-36.

**Анотація**

**Бондар Н.М.** “Хіміко – токсикологічне дослідження амлодипіну”. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія. Національний фармацевтичний університет, Харків, 2006.

Дисертаційна робота присвячена хіміко – токсикологічному дослідженню препарата з групи блокаторів кальцієвих каналів – амлодипіна.

У роботі наведено умови виявлення та ідентифікації амлодипіну та його основного метаболіту за допомогою методів ТШХ, ВЕРХ, УФ – спектрофотометрії, а також доведено можливість їх застосування для ідентифікації амлодипіну у присутності інших препаратів серцево – судинної групи, які можуть застосовуватися разом. Розроблено доступні та чутливі методики кількісного визначення препарату в витяжках з біологічного матеріалу на основі методів екстракційної фотометрії, УФ – спектрофотометрії та ВЕРХ.

Вивчено умови екстракції амлодипіну з водних розчинів органічними розчинниками в залежності від рН середовища. Проведено порівняльне вивчення ефективності ізолювання амлодипіну з біологічного матеріалу за допомогою загальноприйнятих у хіміко – токсикологічному аналізі методів та запропоновано власну ефективну методику ізолювання препарату з біологічного матеріалу за допомогою суміші метанолу та ацетонітрилу (2:3).

Розроблено методики виділення амлодипіну з біологічних рідин організму (сечі та крові).Вивчено розподіл амлодипіну в органах отруєних ним тварин та зберігання в біологічному матеріалі при гнитті. На основі проведених досліджень запропоновано схему спрямованого хіміко – токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на амлодипін.

**Ключові слова:** амлодипін, тонкошарова хроматографія, спектрофотометрія, екстракційна фотометрія, високоефективна рідинна хроматографія, екстракція, біологічний матеріал, біологічні рідини, хіміко – токсикологічний аналіз.

**Аннотация**

**Бондарь Н.Н. «**Химико – токсикологическое исследование амлодипина». – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02. – фармацевтическая химия и фармакогнозия. Национальный фармацевтический университет, Харьков, 2006.

Диссертационная работа посвящена химико-токсикологическому исследованию препарата из группы блокаторов кальциевых каналов амлодипина, который широко применяется в современной кардиологической практике и при определённых условиях (превышение дозы при самолечении, несоблюдении рекомендаций врача или с целью суицида, нарушения метаболизма, индивидуальная лекарственная идиосинкразия) вызывающий тяжёлые побочные реакции, серьёзные интоксикации вплоть до летального исхода.

В работе представлены результаты обнаружения и идентификации амлодипина и его основного метаболита с помощью методов ТСХ, ВЭЖХ, УФ – спектрофотометрии, а также доказана возможность их использования для идентификации амлодипина в присутствии других препаратов сердечно – сосудистой группы, которые могут применяться совместно. Также изучено поведение амлодипина и некоторых других препаратов этой группы в современной системе ТСХ - скрининга.

Разработаны доступные и чувствительные методики количественного определения препарата в вытяжках из биологического материала на основе методов экстракционной фотометрии, УФ- спектрофотометрии (в водных, этанольных, хлороформных растворах и в 0,1 М растворе кислоты хлористоводородной в метаноле) и метода ВЭЖХ.

Изучены условия экстракции амлодипина из водных растворов органическими растворителями (хлороформом, диэтиловым эфиром и бензолом) в зависимости от рН среды. Показано, что препарат в наибольших количествах изолируется из щелочной среды при использовании всех исследованных органических растворителей. При этом максимальное количество амлодипина экстрагируется при значениях рН от 6,0 до 8,0 для хлороформа и изоамилового спирта и от 7,0 до 9,0 для всех других растворителей и составляет около 99,0%, поэтому все исследованные органические растворители можно использовать для экстракции препарата из щелочных вытяжек. Диэтиловый эфир и гексан практически не экстрагируют амлодипин из водной среды при рН = 2, что можно использовать для очистки в процессе выделения препарата из объектов биологического происхождения.

Проведено сравнительное изучение эффективности изолирования амлодипина из биологического материала с помощью общепринятых в химико – токсикологическом анализе методов (А. А. Васильевой, В. Ф. Крамаренко, Стаса – Отто, В. А. Карташова, Е.М. Саломатина, с помощью хлороформа). Предложена эффективная и экспрессная методика изолирования препарата из биологического материала с помощью смеси метанола и ацетонитрила (2:3), которая позволяет выделить около 80-82% амлодипина.

Разработаны методики выделения амлодипина из биологических жидкостей организма (мочи и крови), которые позволяют выделить около 52-55% препарата из крови и около 78-79% из мочи.

Изучено распределение амлодипина в органах отравленных им животных и установлено, что через 5 часов после внутрижелудочного введения препарата крысам наибольшее количество амлодипина находится в желудке и кишечнике с содержимым, лёгких, моче и селезёнке.

При изучении сохраняемости амлодипина в биологическом материале при гниении было определено, что с использованием метода изолирования с помощью смеси метанола и ацетонитрила (2:3) через 30 суток можно выделить около 25% препарата, а через 40 суток изолировать амлодипин из биологического материала невозможно.

На основе проведенных исследований была предложена схема направленного химико – токсикологического анализа биологического материала на амлодипин.

**Ключевые слова:** амлодипин, тонкослойная хроматография, спектрофотометрия, экстракционная фотометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, экстракция, биологический материал, биологические жидкости, химико – токсикологический анализ.

**Summary**

**Bondar N.N.** The chemical and toxicological investigation of amlodipine. – Manuscript.

The thesis for a receiving of the Ph. D. in pharmacy scientific degree by the specialty 15.00.02 – pharmaceutical chemistry and pharmacognosy. National Pharmaceutical University, Kharkiv, 2006.

The thesis is devoted to chemical and toxicological investigation of calcium channel blocker drug – amlodipine.

The results of amlodipine and its main metabolit identification by methods TLC, HPLC, UV – spectroscopy are presented in this thesis and possibility of this methods use in the presence of other cardiovascular drugs, which can be ordered together has been demonstrated. Accessible and sensitive methodologies based on the extraction-photometric, UV –spectrophotometric and HPLC methods for amlodipine quantitative determination in extracts from biological material have been elaborated.

The conditions of amlodipine extraction from water solutions by organic solvents depending on pH medium have been studied. Comparative study of amlodipine isolation effectiveness from a biological material by generally accepted in toxicological analysis methods has been carried out and the own effective and swift rapid methodologie of amlodipine isolation from a biological material by methanol and acetonitryl (2:3) have been offered.

The methodologies of amlodipine isolation from a biological liquids of organism (urine and blood) have been elaborated. The distribution of drug in organs of poisoned animals and safety in a biological material under putrefaction have been studied. The scheme of amlodipine directional toxicological analysis in a biological material has been offered on the basis of carried out investigations.

**Key words**: amlodipine, thin-layer chromatography, spectrophotometry, extraction photometry, high-pressure liquid chromatography, extraction, biological material, biological liquids, chemical and toxicological analysis.

Підписано до друку 09.11.2006. Формат 60x84 1/16

Папір офсетний. Друк різографія.

Умовний друк. арк. 1,16. Тираж 100 пр. Зам. № 77.

Віддруковано з оригінал-макету на ПП “Азамаєва В. П.”

Україна, 61144, м. Харків, вул. Г. Праці, 17, к. 284. Тел. 65-92-41

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