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

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВґЯ УКРАЇНИ**

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**Болотова Ольга Володимирівна**

УДК 615.212.3:54.062:542.6:543.42.061/062:543.544/545

**ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ**

**КЕТОРОЛАКУ**

15.00.02-фармацевтична хімія та фармакогнозія

**АВТОРЕФЕРАТ**

**дисертації на здобуття наукового ступеня**

**кандидата фармацевтичних наук**

Харків-2005

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету Міністерства охорони здоров’я України.

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

**Бондар Володимир Степанович**

Національний фармацевтичний університет,

завідувач кафедрою токсикологічної хімії

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

**Гризодуб Олександр Іванович**

ДП „Науково-експертний фармакопейний центр”

зам. директора з наукової роботи

кандидат фармацевтичних наук, доцент

**Дмитрієвська Жанна Василівна**

Харківська медична академія післядипломної

освіти, доцент кафедри клінічної біохімії

та судово-медичної токсикології

**Провідна установа:** Запорізький державний медичний університет,

кафедра токсикологічної та неорганічної хімії

Захист відбудеться ” 11 ” листопада 2005 року о 12 00 год. на засіданні

Спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

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

Автореферат розісланий „ 10 ” жовтня 2005 р.

Вчений секретар

Спеціалізованої вченої ради, проф. МАЛОШТАН Л.М.

#### ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

***Актуальність теми****.*Особливе місце серед усіх медикаментів займають препарати групи нестероїдних протизапальних засобів (НПЗЗ) – як засоби, що застосовуються найчастіше, та як „лідери” за частотою побічних ефектів. Саме НПЗЗ є причиною половини усіх ускладнень фармакотерапії, а тому представляють досить великий інтерес в хіміко-токсикологічному відношенні.

В хіміко-токсикологічному відношенні практично не вивчений новий знеболюючий препарат піроло-пірольної групи НПЗЗ − кеторолак, що використовується в медичній практиці у вигляді солі трометаміну. Згідно з літературних даних описані випадки побічних реакцій та летальних отруєнь, викликаних прийомом кеторолаку. Але в літературі відсутні дані про методи ізолювання кеторолаку з біологічного матеріалу, виявлення та кількісного визначення, що придатні для цілей хіміко-токсикологічного аналізу. Відсутні відомості про оптимальні умови екстракції кеторолаку з водних розчинів, його розподіл в органах та біологічних рідинах організму, зберігання препарату в біологічному матеріалі.

Тому хіміко-токсикологічне дослідження кеторолаку 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), керівник В.П. Черних, номер держреєстрації 0198U007011 в УкрІНТЕІ.

***Мета і задачі дослідження.*** Метою даного дослідження є розробка ефективних та експресних методів виділення кеторолаку з біологічного матеріалу, методів його виявлення та кількісного визначення, що придатні для хіміко-токсикологічного та фармацевтичного аналізу.

Для досягнення цієї мети нами були поставлені такі задачі:

* запропонувати кольорові та осадові реакції для ідентифікації кеторолаку, виділеного з біологічного матеріалу;
* розробити чутливі методики виявлення кеторолаку за допомогою хроматографії в тонких шарах сорбенту (ТШХ), спектроскопії в ІЧ- та УФ-області спектра, високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та газо-рідинної хроматографії (ГРХ), які дозволяють відрізнити його від деяких інших препаратів групи НПЗЗ;
* розробити методики кількісного визначення кеторолаку, придатні для цілей хіміко-токсикологічного та фармацевтичного аналізу (УФ-спектрофотометрія, ВЕРХ, ГРХ);
* вивчити вплив природи органічних розчинників та рН середовища на екстракцію кеторолаку з водних розчинів;
* порівняти ефективність загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання органічних речовин (О.О. Васильєвої – виділення водою, підкисленою щавлевою кислотою; В.П.Крамаренка – виділення водою, підкисленою сірчаною кислотою; Стаса-Отто – виділення спиртом етиловим, підкисленим щавлевою кислотою) стосовно до кеторолаку;
* розробити ефективний та експресний індивідуальний метод ізолювання кеторолаку з біологічного матеріалу;
* запропонувати методики виділення кеторолаку з біологічних рідин організму (кров, сеча);
* вивчити розподіл кеторолаку в органах отруєних ним тварин;
* дослідити зберігання кеторолаку в трупному матеріалі при його гнилісному розкладанні;
* на підставі виконаних досліджень запропонувати схему хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на кеторолак.

***Об’єкт дослідження.***Кеторолак – ненаркотичний нестероїдний препарат з сильно вираженим знеболюючим ефектом, використовується у вигляді солі трометаміну для купірування сильних та помірних болей.

***Предмет дослідження.*** Методи ідентифікації та кількісного визначення кеторолаку, виділення з біологічного матеріалу та біологічних рідин (кров, сеча), розподіл в органах тварин, зберігання в трупному матеріалі.

***Методи дослідження****.* Для ідентифікації кеторолаку у витяжках з біологічного матеріалу використовували методи ТШХ, ВЕРХ, ГРХ, УФ- спектроскопії, кольорові та осадові реакції; для кількісного визначення – УФ-спектрофотометричний метод, ВЕРХ та ГРХ. Для ізолювання кеторолаку з біологічного матеріалу використовували загальноприйняті методи О.О.Васильєвої, В.П.Крамаренка, Стаса-Отто, а також метод ізолювання ефіром, який запропоновано нами. Вивчення розподілу кеторолаку проводили на піддослідних щурах після їх отруєння. Терміни зберігання кеторолаку визначали в секційному матеріалі (печінці).

***Наукова новизна одержаних результатів****.* Вперше виконано систематичні хіміко-токсикологічні дослідження кеторолаку.

Запропоновано кольорові та осадові реакції, методи ВЕРХ, ГРХ та ТШХ, УФ-спектроскопії для виявлення кеторолаку, який виділено з біологічного матеріалу. Розроблено нові методики кількісного визначення кеторолаку, які придатні для цілей хіміко-токсикологічного, фармацевтичного та криміналістичного аналізу, за допомогою методів УФ-спектрофотометрії, ГРХ та ВЕРХ.

Вивчено умови (природа органічного розчинника, рН середовища) екстракції кеторолаку з водних розчинів, на основі чого розроблена методика його ізолювання з біологічного матеріалу та біологічних рідин.

Вперше проведено порівняльне вивчення загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання органічних речовин кислого характеру стосовно до кеторолаку. Розроблено ефективний та експресний індивідуальний метод ізолювання кеторолаку з біологічного матеріалу за допомогою ефіру.

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

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

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

На підставі виконаних досліджень запропоновано схему хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на кеторолак.

***Практичнее значення отриманих результатів.*** Розроблені методики виявлення та кількісного визначення кеторолаку, який виділено з біологічного матеріалу, можуть використовуватись на практиці при судово-хімічних дослідженнях для вирішення питань отруєння кеторолаком, в клінічних лабораторіях з метою визначення кеторолаку в біологічних рідинах, а також у фармацевтичному та криміналістичному аналізі.

Розроблені методики хіміко-токсикологічного дослідження кеторолаку впроваджені в практику судово-хімічних лабораторій: лабораторії Харківського обласного бюро судово-медичної експертизи (акт від 17.09.02 р.), лабораторії Тернопільського обласного бюро судово-медичної експертизи (акт від 19.05.04 р.), лабораторії Луганського обласного бюро судово-медичної експертизи (акт від 30.04.03 р.); лабораторії фізико-хімічних методів аналізу ДП “Дослідний завод ДНЦЛЗ” (акт від 25.04.03 р., акт від 17.11.03 р.), а також в навчальний процес Запорізького державного медичного університету (акт від 12.05.04 р.), Тернопільської державної медичної академії (акт від 18.05.04 р.), Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького (акт від 21.10.04 р.) та Харківської медичної академії післядипломної освіти (акт від 15.11.2004 р.)

***Особистий внесок здобувача:***

* проведено аналіз літературних даних з методів виявлення та кількісного визначення, фармакології та токсикології препарату групи НПЗЗ - кеторолаку;
* розроблено методи ідентифікації та кількісного визначення кеторолаку у витяжках з біологічного матеріалу та біологічних рідин (кольорові та осадові реакції, методи ТШХ, ВЕРХ кеторолаку та деяких інших препаратів групи НПЗЗ, що можуть застосовуватись разом з ним; ГРХ, ІЧ- , УФ-спектроскопії);
* вивчено умови екстракції кеторолаку з водних розчинів органічними розчинниками в залежності від рН середовища;
* проведено порівняльну оцінку ефективності ізолювання кеторолаку з біологічного матеріалу загальноприйнятими в хіміко-токсикологічному аналізі методами;
* запропоновано методику ізолювання кеторолаку з секційного матеріалу за допомогою ефіру діетилового;
* запропоновано методики виділення кеторолаку з біологічних рідин організму (крові, сечі);
* досліджено розподіл кеторолаку в органах отруєних ним тварин, а також зберігання препарату в біологічному матеріалі при його гнилісному розкладанні;
* розроблено схему дослідження біологічного матеріалу на кеторолак**.**

Персональний внесок у усіх опублікованих наукових працях зі співавтором (Бондарем В.С.) вказується за текстом дисертації.

***Апробація результатів дисертації****.* результати дисертаційної роботи доповідались на V національному зґїзді фармацевтів України “Досягнення сучасної фармації та перспективи ії розвитку у новому тисячолітті” (Харків, 1999 р.), науковій конференції молодих вчених та студентів НФАУ (Харків, 2000 р.), науково-практичній конференції “Вчені України - вітчизняній фармації” (Харків,2000 р.), Всеукраїнської науково-практичній конференції “Фармація ХХІ століття” (Харків, 2002 р.).

***Публікації.*** По темі дисертації опубліковано 8 наукових робіт, з них 4 статті (у провідних наукових фахових виданнях) та 4 тези доповідей.

***Об`єм і структура дисертації***. Дисертаційна робота складається з вступу, 5 розділів, загальних висновків, списку літературних джерел, додатків. Загальний обсяг дисертації складає 147 сторінок. В роботі приведено 1 схема, 29 рисунків та 20 таблиц. Перелік використаних літературних джерел вміщує 170 назв, з яких 82 - іноземна.

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

* методики виявлення кеторолаку за допомогою осадових, кольорових реакцій, ТШХ, ГРХ та ВЕРХ, УФ-та ІЧ-спектроскопії;
* методики кількісного визначення кеторолаку УФ-спектроскопічним, ВЕРХ та ГРХ методами;
* умови екстракції кеторолаку органічними розчинниками;
* методики ізолювання кеторолаку з секційного матеріалу та біологічних рідин (кров, сеча);
* результати розподілу кеторолаку в органах отруєних ним тварин і його зберігання в біологічному матеріалі.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**



Кеторолаку трометамін - (±)-5-бензоїл-2,3-дигідро-1Н-піролізин-1-карбонова кислота, сіль з 2-аміно-2- (гідроксиметил)-1,3-пропандіол (1:1)

Кеторолаку трометамін - C15H13NО3·. C4H11NО3, молекулярна маса 376,4.

Кеторолак - C15H13NО3, молекулярна маса 255,27

Кеторолак – новий знеболюючий препарат піроло-пірольной групи НПЗЗ, використовується у вигляді солі трометаміну для купірування сильних та помірних болей.

**Об′єкти та методи дослідження**

Об'єктами дослідження для вирішення поставлених задач були: кеторолак (C15H13NО3) (вільна кислота) та деякі інши НПЗЗ.

Для дослідження використовували загальноприйняті у хіміко-токсикологічному аналізі методи ізолювання (Стаса-Отто, О.О. Васильєвої, В.П. Крамаренка), осадові, кольорові реакції, УФ-та ІЧ-спектроскопію, методи ТШХ, ВЕРХ, ГРХ та дослідження на тваринах.

**Ідентифікація кеторолаку**

Нами вивчена можливість використання для виявлення кеторолаку при хіміко-токсикологічних дослідженнях кольорових та осадових реакцій, методів ТШХ, ГРХ, ВЕРХ та УФ-спектроскопії.

Досліджено кольорові реакції кеторолаку та деяких інших препаратів групи НПЗЗ з концентрованими сірчаною та азотною кислотами, реактивами Ердмана, Маркі, Фреде, Манделіна та Лібермана. Найбільш селективним та чутливим є реактив Лібермана, який дозволив відрізнити кеторолак від інших НПЗЗ (чутливість реакції становить 200 мкг у пробі).

При дослідженні мікрокристалоскопічних реакцій на кеторолак використовували наступні осадові реактиви: розчин таніну, пікринову кислоту, реактиви Вагнера, Драгендорфа, фосфорно-молібденову кислоту. Найбільш чутливими реактивом виявилась кислота пікринова, яка з кеторолаком утворює білий кристалічний осад (чутливість реакції складала 200 мкг в пробі ).

Досліджено умови виявлення кеторолаку та деяких інших НПЗЗ за допомогою методу ТШХ на пластинках ВЕТШХ, Силуфол, Сорбфіл та зворотно-фазної пластинки RP-18 “Merck” з використанням систем розчинників кислого, нейтрального та лужного характеру.

Вивчено поведінку кеторолаку в системі ТШХ-скринінгу, що використовується в практиці судово-токсикологічних лабораторій в Україні, у присутності деяких препаратів (діазепам, фенобарбітал, антипірин, кофеїн, АСК, індометацин та ін), які при ізолюванні можуть потрапляти в «кислу» витяжку разом з кеторолаком.

На попередньому етапі ТШХ-скринінгу препарати досліджували в загальних системах: хлороформ-ацетон (8:2), етилацетат, етилацетат-метанол-25% розчин аміаку (85:10:2,5), толуол-ацетон-етанол-25% розчин аміаку (45:45:7,5:2,5). Як проявники використовували УФ-світло, розчин калію перманганату, розчини ртуті нітрату і дифенілкарбазону, розчин заліза (III) хлориду та реактив Драгендорфа за Муньє з додатковою обробкою 20% розчином кислоти сірчаної.

Встановлено, що в даних системах кеторолаку не заважають фенобарбітал, діазепам, кофеїн та антипірин, решта досліджуваних речовин (індометацин, ібупрофен, ніфлумова кислота, саліцилова кислота, АСК) находяться в одній хроматографічної зоні з кеторолаком і при цьому дають з проявниками однаково забарвлені плями.

На другому етапі хроматографування проводили в часткових системах розчинників, оптимальних для розділення зазначених препаратів: хлористий метилен - ацетон - оцтова кислота (95:5:2), гексан-хлороформ-мурашина кислота (10:95:0,3) на пластинках Сорбфіл та в системі метанол –вода - оцтова кислота (80:20:1) на пластинці RP-18 (“Merck”). Як проявники використовували УФ-світло, послідовну обробку 0,5 н розчином міді сульфату і 0,3 н розчином калію йодиду, яка при взаємодії з кеторолаком та індометацином дає перехід забарвлення плями від зеленого кольору (після обробки 0,5 н розчином міді сульфату) до коричневого (після обробки 0,3 н розчином калію йодиду), а також реактив Лібермана, що дозволяє відрізнити кеторолак (пляма оранжево-жовтого кольору) від індометацину (пляма чорного кольору).

Досліджено поведінку кеторолаку в УФ-області спектра в різних розчинниках. Встановлено, що в області спектра від 280 нм до 360 нм кеторолак в спирті етиловому та спирті метиловому має максимум поглинання при довжині хвилі 318±2 нм, у 0,1 М розчині калію гідроксиду – 323±2 нм, у хлороформі – 312±2 нм, у бензолі - 309±2 нм.

ІЧ-спектр кеторолаку (в таблетках з KBr) характеризується наявністю смуг поглинання з частотою 3374, 2924, 1588, 1563, 1382, 1278, 1051,731 см-1.

Крім того, досліджено умови виявлення кеторолаку з використанням інструментальних хроматографічних методів (ВЕРХ та ГРХ).

Дослідження за допомогою методу ВЕРХ проводили на рідинному хроматографі “Hewlett Packard” НР 1100 (США) з діодно-матричним детектором на колонці Supelсosil ABZ розміром 2504,6 мм, з розміром частинок 5 мкм. Як рухому фазу застосовували систему розчинників ацетонітрил – 0,002 М розчин кислоти сірчаної (40:60), швидкість рухомої фази – 1,5 мл/хв, температура термостату колонки - 30оС. Детектування проводили при довжині хвилі 312 нм. Виявлення кеторолаку проводили за часом утримання (tR), який дозволяє одержувати надійні результати у процесі ідентифікації препарату при паралельному хроматографуванні стандартного розчину кеторолаку. Використання діодно-матричного детектора при цьому дозволяє ідентифікувати кеторолак не тільки за часом утримання піка (рис.1) , але й за УФ-спектром отриманого піка препарату (рис.2).

Рис.1.ВЕРХ-хроматограма розчину

кеторолаку (20 мк/мл)

Рис.2. УФ-спектр кеторолаку в 96% спирті,

отриманий з ВЕРХ-хроматограми

Крім того, розроблені умови хроматографування були використані для ідентифікації кеторолаку в присутності ряду препаратів, які можуть використовуватись разом з ним (ацетилсаліцилова кислота та трамадол).

Рис. 3. ВЕРХ-хроматограма розчину трамадолу (1), ацетилсаліцилової

кислоти (2) та кеторолаку (3)

Попереднє дослідження УФ-спектрів препаратів показало, що АСК і трамадол в концентрації 400 мкг/мл у 96% спирті етиловому при довжині хвилі 312 нм мають низьке значення оптичної густини, що не заважає ідентифікувати кеторолак в зазначених умовах. Аналіз суміши проводили при довжинах хвиль 254; 275 та 280 нм.

Як що за допомогою методу ВЕРХ можливо виявити та розділити кеторолак у нативному вигляді, то при використані методу ГРХ ми зіштовхнулися з деякими труднощами, повґязаними з тим, що кеторолак у нативному вигляді не хроматографується. Тому нами було запропановано хроматографувати кеторолак у вигляді його продукту етерифікації (ПЕК). Продукт етерифікації одержували при взаємодії кеторолаку зі спиртом метиловим при нагріванні в присутності каталізатора ацетилу хлористого**.** Одержаний ПЕК визначали на газовому хроматографі фірми “Hewlett Packard” НР 6890 з полум’яно-іонізаційним детектором , на капілярній кварцевій колонці НР-1 розміром 25 м \* 0,32 мм, з товщиною шару нерухомої фази (метилсилоксан) 0,17 мкм, температура термостату колонки програмується – спочатку температуру 80оС підтримують протягом 2 хвилин, потім підвищують температуру зі швидкістю 40оС/хв до 300оС і дану температуру підтримують протягом 5 хв; температура інжектора – 320оС, температура детектора - 330оС; об’ємна швидкість газу-носія (гелій) – 2мл/хв, ділення потоку – 1:2. Для проведення аналізу використовували метод внутрішнього стандарту. Як стандарт використовували ментиловий ефір ізовалеріанової кислоти. Відносний час утримання метилового ефіру кеторолаку становить близько 1,4 (час утримання ментилового ефіру ізовалеріанової кислоти прийнято за 1) (рис.4).

Рис.4. ГРХ-хроматограма розчину ПЕК

Рис.5. ВЕРХ-хроматограма суміші розчинів кеторолаку та ПЕК

За допомогою тонкошарової хроматографії та високоефективної рідинної хроматографії встановлено, що значення Rf та час утримання одержаної сполуки та кеторолаку не співпадають (рис.5). Також встановлено, що в процесі етерифікації препарат практично на 100% переходить в продукт етерифікації кеторолаку .

**Кількісне визначення кеторолаку.**

Для кількісного визначення кеторолаку нами були розроблені доступні і надійні УФ-спектроскопічна методика, а також методики ВЕРХ та ГРХ.

Запропонована нами методика УФ-спектрофотометричного визначення кеторолаку дозволяє визначати препарат від 1,4 мкг до 20 мкг в 1 мл 96% спирту етилового. Відносна помилка визначення складає ±2,88%. Для розрахунку кількостей кеторолаку в розчинах використовували градуювальний графік.

Розроблена методика кількісного визначення кеторолаку з застосуванням методу ВЕРХ у спиртових розчинах та розчинах рухомої фази, які дозволяють визначити його в області концентрації від 0,2 мкг до 100 мкг у 1 мл розчину. Відносна помилка визначення складає від ±1,23 до ±1,49 %. Розрахунок вмісту кеторолаку в досліджуваних розчинах проводили за градуювальними графіками .

Кількісне визначення кеторолаку методом ГРХ проводили у тих самих умовах, що ідентифікацію за продуктом його взаємодії зі спиртом метиловим, використовуючи метод внутрішнього стандарту. Для визначення вмісту кеторолаку в обґєктах досліджень використовували градуювальний графік залежності відношення площ піків ПЕК до площ піків ментилового ефіру ізовалеріанової кислоти (S1/S0) від відношення їх концентрацій у розчині (C1/C0). Розроблена методика дозволяє визначати від 1 мкг до 100 мкг кеторолаку в 1 мл розчину. Відносна помилка визначення складає ±1,50 %, а межа визначення становить 0,5 мкг/мл.

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

Одним із важливих чинників, які впливають на процес ізолювання, є ступінь екстракції препарату з водних розчинів органічними розчинниками. Нами було досліджено ступінь екстракції кеторолаку з водних розчинів в залежності від рН середовища та природи органічних розчинників, які широко застосовуються в хіміко-токсикологічному аналізі (свіжоперегнані хлороформ, діетиловий ефір та бензол). Для створення необхідних значень рН водних розчинів використовували універсальну буферну суміш Бріттона-Робінсона. рН буферних розчинів контролювали потенціометрично. Використовували розчини з рН від 2,0 до 12,0. Визначали кількісний вміст кеторолаку спектрофотометрично за градуювальним графіком.

Рис.6. Залежність ступеню екстракції кеторолаку ( середнє з п′яти визначень)

від рН середовища: 1 - екстракція хлороформом;

2- екстракція ефіром;

3-екстракція бензолом.

Зазначено, що максимум екстракції препарату при використанні хлороформу має місце при рН 2,0-3,0 ступінь екстракції при цьому складає 67,5-68,0 %, діетилового ефіру - при рН 3,0-4,0 (ступінь екстракції - біля 91,4-98,5%), а при використанні бензолу максимум екстракції спостерігається при рН 2,0-3,0 (ступінь екстракції складає біля 99-97,5%) (рис.6.). При рН 9,0-12,0 діетиловий ефір та хлороформ на відміну від бензолу практично не екстрагують кеторолак. Таким чином, для екстракції препарату з кислих водних витяжок можна використовувати бензол або діетиловий ефір, а для очищення лужних водних витяжок з біологічного матеріалу від співекстрактивних речовин зручно застосовувати діетиловий ефір або хлороформ.

**Виділення кеторолаку з біологічного матеріалу.**

Спочатку нами були досліджені умови ізолювання кеторолаку з об’єктів біологічного походження за допомогою методів, які є загальноприйнятими у хіміко-токсикологічному аналізі: В.П.Крамаренка (ізолювання водою, підкисленою сірчаною кислотою), О.О.Васильєвої (ізолювання водою, підкисленою щавлевою кислотою), Стаса-Отто (ізолювання спиртом, підкисленим щавлевою кислотою). При цьому використовували модельні суміші препарату з печінкою. Під час досліджень було встановлено, що за методом В.П.Крамаренка вдається виділити 7,92-8,20 % препарату, за методом О.О.Васильєвої – 30,92-32,82 %, за методом Стаса-Отто – 8,75-8,95% (рис. 7).

Рис.7. Результати ізолювання кеторолаку з біологічного матеріалу

Результати виділення кеторолаку з біологічного матеріалу за допомогою загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів свідчать про їх недостатню ефективність. Тому ми розробили експресну та ефективну індивідуальну методику ізолювання кеторолаку з біологічного матеріалу, що заснована на зневодженні біологічного матеріалу шляхом розтирання його наважки з безводним натрієм сульфатом з послідуючим елююванням діетиловим ефіром. При цьому розроблена методика ізолювання кеторолаку за допомогою діетилового ефіру дозволяє виділити 75-78% препарату з біологічного матеріалу.

**Виявлення кеторолаку у витяжках з біологічного матеріалу**

Для виявлення кеторолаку у витяжках з біологічного матеріалу використовували методи ТШХ, УФ-спектрофотометрії та ВЕРХ, а для кількісного визначення препарату – методи УФ-спектрофотометрії та ВЕРХ.

Для виявлення кеторолаку у витяжках з біологічного матеріалу методом ТШХ використовували пластинки Silicagel 60 F254 (“Merck”) (Rf біля 0,3 -0,4) та Сорбфіл (Rf біля 0,5 -0,6), систему розчинників: хлористий метилен- ацетон -оцтова кислота (95:5:2). В зазначених умовах спостерігалось задовільне розділення плям кеторолаку та соекстрактивних речовин. Останні розташовувалися вище і нижче плям кеторолаку.

УФ-спектр кеторолаку, виділеного з біологічного матеріалу, мав ті ж сами смуги поглинання, що й УФ-спектр стандартного розчину кеторолаку ( лmax = 318±2 нм). Як розчин порівняння використовували спиртову витяжку із біологічного матеріалу, що отримана у контрольному досліді. Ідентифікацію кеторолаку у витяжках за допомогою методу ВЕРХ проводили за часом утримання піку кеторолаку та за отриманим спектром піку кеторолаку з хроматограм розчинів витяжок з біологічного матеріалу в порівнянні з піком кеторолаку та його спектром на хроматограмі розчину порівняння.

**Виділення кеторолаку з біологічних рідин**

Нами запропоновано методики виділення кеторолаку з біологічних рідин організму (крові, сечі).

Методика виділення кеторолаку з крові заснована на осадженні формених елементів крові 0,1 М розчином кислоти хлороводневої (з центрифугуванням), очищенні водної витяжки ефіром діетиловим після підлуговування 25% розчином аміаку, та екстракції препарату за допомогою ефіру при рН 3,0-4,0. Методика дозволяє виділити біля 57-58% препарату.

Виділення кеторолаку з сечі засновано на підлуговуванні її 25% розчином аміаку до рН=9-10, очищенні лужної водної витяжки діетиловим ефіром та екстракції препарату діетиловим ефіром при рН 3,0-4,0. Методика дозволяє виділити біля 76-78% препарату.

**Вивчення розподілу кеторолаку в органах отруених ним тварин**

Результати вивчення розподілу кеторолаку в органах отруєних тварин (щурів) через 6 годин після внутрішньо шлункового введення препарату показали, що кеторолак в найбільших кількостях знаходиться в шлунку та кишечнику з вмістом, печінці, нирках та сечі (рис.8).

Рис.8. Розподіл кеторолаку в органах отруєних ним тварин

(у відсотках до знайденого)

**Зберігання кеторолаку в біологічному матеріалу при його гнитті**

Вивчено зберігання кеторолаку в трупному матеріалі при його гнитті. Встановлено, що метод ізолювання за допомогою діетилового ефіру через 120 діб зберігання біологічного матеріалу (тканина печінки) дозволяє виділити біля 3,53 % кеторолаку.

На основі проведених досліджень запропонована схема хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на кеторолак (рис. 9).



10 г подріблених органів розтертих з 30 г Na2SO4 (безв.)

Ізолювання діетиловим ефіром (100 мл)

Ефірна витяжка

Екстракційне очищення ефіром після підлуговування ефірної витяжки 25% NH4OH, pH 9.0-10.0 3 рази по 10 мл

Лужна водна витяжка

Ефірний

розчин далі

не досліджують

Підкислювання 1М НСl pH 3.0-4.0

Кисла водна витяжка

Кислий водний

розчин далі

не досліджують

Ефірна витяжка

Екстракція ефіром 3 рази по 10 мл

Фільтрування крізь Na2SO4 (безв.), випаровування, розчинення у 96:% спирті

Спиртовий розчин кеторолаку

Ідентифікація

Кількісне визначення

ТШХ-дослідження в системах:

* хлористий метилен-ацетон

оцтова к-та (95:5:2) (Сорбфіл)

* гексан – хлороформ-

мурашина к-та (10:95:0,3)

(Сорбфіл)

* метанол-вода-оцтова кис-

лота (80:20:1) (RP-18 “Мerck”)

УФ-спектрофотометрія

ГРХ, ВЕРХ

ГРХ

( за продуктом етерифікації кеторолаку)

ВЕРХ у рухомої фазі

ацетонітрил –0,002М Н2SO4

( 20: 80)

УФ-спектрофотометрія

в етанольному розчині

Рис. 9. Схема хіміко-токсикологічного аналізу біологічного материалу на кеторолак

**ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ**

1. Вивчено умови виявлення кеторолаку за допомогою кольорових та осадових реакцій, а також методів ТШХ, ВЕРХ, ГРХ та УФ-спектрофотометрії, які придатні для виявлення кеторолаку, виділеного з біологічного матеріалу.
2. Вперше досліджено поведінка кеторолаку у системі ТШХ -скринінгу при ненаправленому дослідженні.
3. Розроблено доступні та чутливі методики кількісного визначення кеторолаку у витяжках з біологічного матеріалу:

* ВЕРХ: в спиртових розчинах та рухомій фазі (дозволяє визначити його в області концентрації від 0,2 мкг до 100 мкг в 1 мл; відносна помилка визначення складає ±1,23-1,49 %).
* УФ-спектрофотометричні: запропонована методика дозволяє визначати препарат від 1,4 мкг до 20 мкг у 1 мл 96 % спирту етилового. Відносна помилка визначення складає ± 2,88 %.
* ГРХ: за продуктом його взаємодії зі спиртом метиловим, яка дозволяє визначити від 1 мкг до 100 мкг кеторолаку у 1 мл розчину. Відносна помилка визначення складає ±1,50 %. За допомогою методів ТШХ та ВЕРХ встановлено, що значення Rf та відносний час утримання () одержаної сполуки та кеторолаку не співпадають. Встановлено, що в процесі етерифікації кеторолак практично на 100% переходить в продукт етерифікації кеторолаку (ПЕК).

1. Вивчено умови екстракції кеторолаку з водних розчинів у залежності від рН середовища. Встановлено, що оптимальним розчинником для екстракції кеторолаку з водних розчинів є ефір діетиловий при рН 3,0-4,0 (ступінь екстракції - 91,4-98,5 %) та бензол при рН 2,0-3,0 (ступінь екстракції – 97,5-99,0 %), а для екстракційного очищення водних витяжок з біологічного матеріалу у лужному середовищі зручно використовувати хлороформ чи ефір діетиловий.
2. Вперше проведено порівняльну оцінку виділення кеторолаку з біологічного матеріалу загальноприйнятими у хіміко-токсикологічному аналізі методами, а також розроблено більш ефективну та експресну методику ізолювання кеторолаку ефіром діетиловим, яка дозволяє виділити до 75-78 % препарату.
3. Вивчено умови виявлення кеторолаку в витяжках з біологічного матеріалу за допомогою методів ТШХ, ВЕРХ та УФ-спектрофотометрії. Для кількісного визначення препарату у витяжках із біологічного матеріалу застосовані ВЕРХ та УФ-спектрофотометричний методи.
4. Запропоновано методики виділення кеторолаку з біологічних рідин організму (крові, сечі), які дозволяють ізолювати до 57-58 % препарату із крові та до 76-78 % із сечі.
5. Вивчено розподіл кеторолаку в органах отруєних тварин при пероральному введенні. Встановлено, що для хіміко-токсикологічного дослідження при летальних отруєннях кеторолаком варто брати шлунок і кишечник із вмістом, нирки, печінку та сечу.
6. Вивчено зберігання кеторолаку в біологічному матеріалі при його гнитті. Встановлено, що за допомогою методу ізолювання ефіром діетиловим через 120 діб із тканин печінки, яка піддалася гнилісним змінам, можна виділити до 3,53% препарату.
7. На основі проведених досліджень запропоновано схему хіміко-токсикологічного дослідження біологічного матеріалу на кеторолак.

**Список опубликовах праць за темою дисертації**

1. Бондар В.С., Болотова О.В. Ідентифікація кеторолаку за допомогою хімічних та фізико-хімічних методів // Вісник фармації.- 2002. - № 3 (31). – С. 30 – 33. Особистий внесок здобувача: ідентифікація кеторолаку за допомогою осадових реакцій та реакцій забарвлення, хроматографії в тонких шарах сорбенту, УФ- та ІЧ-спектрофотометрії; участь у написанні статті.
2. Бондар В. С., Болотова О.В. Застосування високоефективної рідинної хроматографії та УФ-спектрофотометрії для ідентифікації та кількісного визначення кеторолаку // Фізіологічно активні речовини – 2002. – № 2 (34).- С. 41 – 44. Особистий внесок здобувача: вивчення застосування високоефективної рідинної хроматографії та УФ-спектрофотометрії для ідентифікації та кількісного визначення кеторолаку; участь у написанні статті.
3. Бондар В. С., Болотова О.В. Газохроматографічний метод виявлення та кількісного визначення кеторолаку // Вісник фармації.- 2003. - № 2 (34). – С. 28 – 30. Особистий внесок здобувача: дослідження газохроматографічного методу виявлення та кількісного визначення кеторолаку; участь у написанні статті.
4. Бондар В.С., Болотова О.В. Дослідження методів виділення кеторолаку з об’єктів біологічного походження // Вісник фармації. – 2005. - № 2 (42). – С.13 – 15. Особистий внесок здобувача: вивчення методів виділення кеторолаку з обґєктів біологічного походження; участь у написанні статті.
5. Болотова О.В., Бондар В.С. Розобка методів ідентіфікаціїї кеторолаку // Досягнення сучасної фармації та переспективи розвитку у новому тисячолітті. Матеріали V національного зґїзду фармацевтів України: Тези доповідей. – Харків: „Вид-во УкрФА”, 1999. – С.488-489.
6. Болотова О.В., Бондар В.С. Хроматографічні методи ідентифікації кеторолаку // Вчені України – вітчизняній фармації. Матеріали науково-практичної конференції: Тези доповідей. – Харків: „Вид-во НФаУ”, 2000. – С.181-182.
7. Болотова О.В., Бондар В.С. Розробка фізико-хімічних методів ідентифікації кеторолаку // Наукова конференція молодих вчених та студентів. Матеріали науково-практичної конференції: Тези доповідей. -Харків: „Вид-во НФаУ”, 2000. – С.297.
8. Болотова О.В., Бондар В.С. Порівняльна оцінка методів ізолювання кеторолаку з біологічного матеріалу // Фармація ХХІ століття : Тези доповідей всеукраїнської науково- практичної конференції. – Харків : „Вид-во НФаУ” - 2002. – С.105-106.

**Болотова О.В. хіміко-токсикологічне дослідження кеторолаку. - Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за фахом 15.00.02. - Фармацевтична хімія та фармакогнозія. - Національний фармацевтичний університет, Харків, 2005.

Дисертаційна робота присвячена хіміко-токсикологічному дослідженню препарату групи нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗЗ) - кеторолаку.

В роботі представлені результати виявлення кеторолаку за допомогою кольорових і осадових реакцій, ТШХ, ІЧ- і УФ-спектроскопії, методів ВЕРХ та ГРХ. Вивчена поведінка кеторолаку в системі ТСХ-скринінгу.

Запропоновані надійні і чутливі методики кількісного визначення кеторолаку методами УФ-спектроскопії, ВЕЖХ та ГРХ.

Досліджено умови екстракції кеторолака з водних розчинів хлороформом, діетиловим ефіром і бензолом у залежності від рН середовища. Вивчено умови ізолювання кеторолака з біологічного матеріалу за допомогою загальноприйнятих в хіміко-токсикологічному аналізі методів О.О. Васильєвої, В.П. Крамаренка, Стаса-Отто.

Розроблена ефективна і експресна методика ізолювання кеторолаку з біологічного матеріалу за допомогою діетилового ефіру, яка дозволяє виділити 75-78 % препарату.

Запропоновано методики ізолювання кеторолака з біологічних рідин організму (кров і сечі), які дозволяють виділити 57-58% препарату з крові, і 76-78% з сечі.

Вивчено розподіл кеторолаку в органах отруєних ним тварин і його зберігання в біологічному матеріалі при його гнильному розкладанні. На підставі проведених досліджень запропонована схема хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на кеторолак.

**Ключові слова:** кеторолак, кольорові і осадкові реакції, хроматографія у тонких шарах сорбенту, спектрофотометрія, високоефективна рідинна хроматографія, газо-рідинна хроматографія, екстракція, біологічний матеріал, біологічні рідини, хіміко-токсикологічний аналіз.

**Болотова О.В.** Химико-токсикологическое исследование кеторолака. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02. – Фармацевтическая химия и фармакогнозия. – Национальный фармацевтический университет, Харьков, 2005.

Диссертационная работа посвящена химико-токсикологическому исследованию препарата группы нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВС) - кеторолаку.

В работе представлены результаты обнаружения кеторолаку с помощью цветных и осадочных реакций, ИК- и УФ-спектроскопии, методов хроматографии в тонких слоях сорбента (ТСХ), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Кроме этого разработана методика идентификации кеторолака методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) по продукту этерификации кеторолака (ПЭК) со спиртом метиловым. С помощью методов ТСХ та ВЭЖХ установлено, что значение Rf и относительное время удерживания () полученного соединения и кеторолака не совпадают. Установлено, что в процессе этерификации кеторолак практически на 100% переходит в продукт этерификации кеторолака (ПЭК).

Разработана методика УФ-спектроскопического определения кеторолака, которая позволяет определить препарат от 1,4 мкг до 20 мкг в 1 мл 96 % спирту этилового. Относительная ошибка определения составляет ±2,88 %.

Также предложена методика количественного определения кеторолака методом ВЭЖХ в спиртовых растворах и подвижной фазе (позволяет определить препарат в области концентраций от 0,2 мкг до 100 мкг у 1 мл; относительная ошибка определения составляет ±1,23-1,49 %).

Предложена надежная и чувствительная методика количественного определения кеторолака методами ГЖХ по продукту его взаимодействия кеторолака со спиртом метиловым, которая позволяет определить от 1 мкг до 100 мкг кеторолака в 1 мл раствора. Относительная ошибка составляет ±1,50 %.

Исследованы условия экстрации кеторолака из водных растворов хлороформом, диэтиловым эфиром и бензолом в интервале рН от 2,0 до 12,0. Установлено, что оптимальным растворителем для екстракции кеторолака из водных растворов является эфир диэтиловый при рН 3,0-4,0 (степень экстракции - 91,4-98,5 %) и бензол при рН 2,0-3,0 (степень экстракции – 97,5-99,0 %), а для экстракционной очистки водных вытяжек из биологического материала в щелочной среде оптимально использовать хлороформ или эфир диэтиловый.

Изучены условия изолирования кеторолака из биологического материала с помощью общепринятых в химико-токсикологическом анализе методов А.А.Васильевой, В.Ф.Крамаренко, Стаса-Отто. Установлено, что методы Васильевой и Крамаренко позволяют виделить 30,92-32,82 % и 7,92-8,20 % препарату соответственно , а метод Стаса-Отто – 8,75-8,95%.

Разработана эффективная и экспрессная методика изолирования кеторолака из биологического материала с помощью диэтилового эфира, позволяющая выделить около 75-78% препарата. Предложены методики изолирования кеторолака из биологических жидкостей организма (крови и мочи), которые позволяют выделить 57-58% препарата из крови, и 76-78% из мочи.

Изучено распределение кеторолака в органах отравленных животных. Установлено, что через 6 ч после внутрижелудочного введения кеторолака крысам, наибольшее количество препарата содержится в желудке и кищечнике с содержимым, печени, почках и моче.

Исследована сохраняемость кеторолака в биологическом материале при его гнилостном разложении. Показано, что метод изолирования кеторолака с помощью диэтилового эфира через 120 суток хранения его в биологическом материале (ткань печени) позволяет выделить около 3,53 % кеторолака.

На основании проведенных исследований предложена схема химико-токсикологического анализа биологического материала на кеторолак.

**Ключевые слова:** кеторолак, цветные и осадочные реакции, хроматография в тонких слоях сорбента, спектрофотометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, газо-жидкостная хроматография, экстракция, биологический материал, биологические жидкости, химико-токсикологический анализ.

**Bolotova O.V.** „The chemical and toxicological investigation of ketorolac”. - Manuscript.

The thesis on reception of a scientific degree of candidate of pharmaceutical sciences on speciality 15.00.02 - pharmaceutical chemistry and pharmacognosy; National pharmaceutical university, Kharkov, 2005.

The thesis is devoted to the chemical and toxicological research of preparation of group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID)– ketorolac.

Colour and precipitation reactions, the methods of TLC, HPLC and GLC, IR- and UV-spectroscopy are offered in this thesis for identification of ketorolac. The reliable and sensible methods of quantitative determination of ketorolac are offered by the methods GLC, HPLC that UV-spectroscopy.

The conduct of ketorolak in the general scheme of TLC- screening is studied.

The terms of extraction of ketorolac from water solutions by chloroform, ether and benzene depending on pH medium are studied. The terms of isolation of ketorolac from biological material by the generally accepted in the the chemical and toxicological analysis methods of A.A.Vasileva, V.F.Kramarenko, Stasa-Otto are studied. The effective and express method of isolation of ketorolak from biological material by ether is developed. The methods of isolation of ketorolak from the biological liquids of organism (blood and urine) are offered.

Distribution of ketorolac in the organs of the poisoned animals and his keeping in biological material at his decomposition are studied.

On the basis of carried out researches the scheme of ketorolac chemical and toxicological analysis in extract of biological material is offered.

**Keywords:** ketorolac, precipitation and colour reactions, thin-layer chromatography, high-pressure liquid chromatography, gas-liquid chromatography, spectrophotometry, isolation, biological material, biological liquids, chemical and toxicological analysis.

Підписано до друку 5.10.2005. Формат 60x84 1/16

Папір офсетний. Друк ризографія.

Умовний друк. арк. 1,16. Тираж 100 пр. Зам. № 85

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>