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

### МЕДВЕДЄВА Юлія Петрівна

 УДК 612.22.009:615.07

# ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

# ДИЛТІАЗЕМУ

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 кафедри токсикологічної хімії

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

 **ПЕТЮНІН Геннадій Павлович,**

Харківська медична академія післядипломної освіти,

 завідувач кафедри клінічної біохімії та судово-медичної

 токсикології

 кандидат фармацевтичних наук

 **ЛЕОНТЬЄВ Дмитро Анатолійович**

ДП “ДНЦЛЗ” МОЗ та НАН України,

 старший науковий співробітник

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

 кафедра неорганічної та токсикологічної хімії

 Захист відбудеться «\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2005 року о \_\_\_\_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 «\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2005 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради, проф. 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 й для дорослих. Поява препаратів з повільним вивільненням субстанції ще більше ускладнила токсичну ситуацію і призвела до появи особливостей її перебігу, таких як інфаркти кишечника.

 Більшість летальних випадків зареєстровано при вживанні верапамілу та дилтіазему, тому що ці препарати викликають глибоку міокардиальну депресію і важку периферічну дилатацію на відміну від ніфедипіноподібних ліків, які також викликають періферічну вазодилатацію, але меншу міокардиальну супресію. Обраний нами для дослідження препарат цієї групи дилтіазем за результатами вивчення частоти призначень лікарів – кардіологів входе до домінуючої групи.

 Випадки важких та летальних отруєнь дилтіаземом, 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 дилтіазему 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 дилтіазему, що придатні для хіміко-токсикологічного аналізу.

 Для досягнення цієї мети було поставлено такі задачі:

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

*Об`єкт дослідження.* Визначення препарату з групи блокаторів кальцієвих каналів дилтіазему при токсикологічному аналізі.

 *Предмет дослідження.* Методи ідентифікації дилтіазему та його метаболіту, методики кількісного визначення та виділення з біоматеріалу, розподіл в органах тварин, зберігання в трупному матеріалі.

 *Методи дослідження.* Для ідентифікації дилтіазему та його метаболіту в модельних розчинах та витяжках з біологічного матеріалу використовували методи тонкошарової та високоефективної рідинної хроматографії, УФ- спектроскопії, електрофорез на папері; для кількісного визначення – УФ-спектрофотометричний, екстракційно-фотометричний методи, метод високоефективної рідинної хроматографії. Для ізолювання дилтіазему з біологічного матеріалу використовували загальноприйняті методи О.О.Васильєвої, В.П.Крамаренка, Стаса-Отто, В. А. Карташова, а також методики ізолювання метанолом та ацетонітрилом, запропоновані нами.

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

 Запропоновано методи високоефективної рідинної хроматографії, хроматографії в тонкому шарі сорбенту, УФ-спектроскопії, електрофорезу на папері для виявлення дилтіазему та його основного метаболіту. Розроблено методики кількісного визначення дилтіазему, 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 дилтіазему 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 дилтіазему. Розроблено ефективні та експресні індивідуальні методики ізолювання дилтіазему з біологічного матеріалу за допомогою ацетонітрилу та метанолу.

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

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

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

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

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

 Розроблені методики хіміко-токсикологічного аналізу дилтіазему впроваджено в практику судово-хімічних лабораторій (Луганського обласного бюро судово-медичної експертизи (акт від 30.04.03 р.), Тернопільського обласного бюро судово-медичної експертизи (акт від 19.05. 04 р.)), в практичну роботу лабораторії фізико-хімічних методів аналізу ДАК “Укрмедпром” ДП Дослідний завод ДНЦЛЗ (акт від 15.10 04 р.), а також у навчальний процес Тернопільської державної медичної академії (акт від 18.05.04 р.), Запорізького державного медичного університету (акт від 12.05. 04 р.), та Львівського національного медичного університету (акт від 21.10. 04 р.).

***Особистий внесок здобувача:***

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

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

***Апробація результатів дисертації****.*Основні результати дисертаційної роботи викладені та обговорені на міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених “Вчені майбутнього” (Одеса, 2003), науково-практичній конференції з міжнародною участю “Створення, виробництво, стандартизація, фармакоекономіка лікарських засобів та біологічно активних добавок” (Тернопіль, 2004 ), ІІІ міжнародній науково-практичній конференції “Динаміка наукових досліджень`2003” (Дніпропетровськ, 2003), VII міжнародній науково – практичній конференції “Наука і освіта` 2004” (Дніпропетровськ 2004), ІІІ міжнародній науково-практичній конференції “Наука і соціальні проблеми суспільства: медицина, фармація, біотехнологія” (Харків, 2003), всеукраїнській науково-практичній конференції “Проблеми діагностики, профілактики та лікування екзогенних та ендогенних інтоксикацій” (Чернівці, 2004), міжнародній конференції “Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики” (Запоріжжя, 2004).

***Публікації*.** За результатами дисертаційного дослідження опубліковано 10 друкованих робіт, з них 4 статті (у провідних наукових фахових виданнях) та 6 тез доповідей.

***Об`єм і структура дисертації.*** Робота викладена на 131 сторінці, вміщує в собі 32 таблиці, 13 рисунків, 1 схему. Складається з вступу, 6 розділів, загальних висновків та списку літератури (134 джерела, з яких 52 іноземних авторів) та додатків.

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

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

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

 

Дилтіазем - (2S, 3S )–3–ацетилоксі–5-[2-( диметил–аміно ) етил]-2- (4-метоксифеніл )-2,3- дигідро-1,5 – бензотіазепін – 4 ( 5Н ) – он гідро хлорид.

 Загальна формула - C 22H 27ClN 2O 4S, молекулярна маса 451,0

 Препарат відносять до групи блокаторів кальцієвих каналів.

**Об'єкти та методи дослідження**

 Об’єктом дослідження було обрано визначення препарату з групи блокаторів кальцієвих каналів дилтіазему 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), УФ-спектроскопія, електрофорез на папері, екстракційна фотометрія, ТШХ, ВЕРХ та дослідження на тваринах.

 **Ідентифікація дилтіазему та його метаболіту**

 Нами було досліджено можливість використання методів ТХШ, ВЕРХ та УФ - спектрофотометрії для ідентифікації дилтіазему та його метаболіту.

 Оскільки метод ТШХ в даний час в лабораторіях України використовують як скринінговий метод, то на першому етапі аналізу було проведено хроматографування дилтіазему, його метаболіту та деяких препаратів серцево–судинної групи в загальних системах розчинників на пластинках Сорбфіл та дослідження дії проявників, рекомендованих для загальних систем, до цих препаратів. Хоч дилтіазем, як слабка основа, потрапляє і до кислої, і до лужної хлороформної витяжки, але надійне значення величини Rf вдалося отримати тільки в системах, рекомендованих для речовин лужної природи. Система хлороформ – діоксан – ацетон – 25% р-н аміаку (47,5:45:5:2,5) виявилася оптимальною для розділення дилтіазему та його основного метаболіту (метаболіт залишається на старті, а Rf дилтіазему складає близько 0,39). Розрізнити плями дилтіазема та його основного метаболіту, окрім значення Rf , можливо за допомогою УФ – світла. Так, плями метаболіту в УФ – світлі мають блакитну флюоресценцію, а виявити плями нативного препарату таким чином неможливо.

 На другому етапі проводили хроматографування зазначених препаратів в часткових системах з використанням різних типів хроматографічних пластинок та різних проявників. Оптимальною системою для розділення досліджуваних препаратів визнано систему етилацетат – метанол – 25% р-н аміаку (80:10:10). З випробуваних проявників селективним до дилтіазему є реактив Лібермана, який при взаємодії з препаратом дає темно – фіолетове забарвлення, не характерне для інших досліджуваних препаратів. Відрізнити дилтіаем та його основний метаболіт за допомогою реакцій забарвлення неможливо, оскільки він дає аналогічне до нативного препарату забарвлення з усіма проявниками, з якими реагує дилтіазем.

 Для ідентифікації дилтіазему, його метаболіту та розділення від деяких препаратів серцево – судинної групи було також застосовано такий високочутливий та сучасний метод, як ВЕРХ. Хроматографічний аналіз дилтіазему проводили на рідинному хроматографі “Hewlett Packard” HP 1100 (США) з УФ – детектором. Для проведення аналізу використовували колонку хроматографічну обернено-фазну Supelcosil LC - ABZ (сорбент – октадецилсилікагель з привитою фазою С18) розміром 250 мм \* 4,6 мм, з розміром пор 5 мкм. Рухому фазу, яка складалася з розчину А (ацетонітрил) та розчину Б (фосфатний буфер з рН 3) подавали в градієнтному режимі. Температура термостату колонки – 300С, детектування проводили при довжині хвилі 240 нм. Встановлено, що при даних умовах хроматографування абсолютний час утримання дилтіазему становить 7,542 хв., а абсолютний об`єм утриманя 15084 мкл (рис.1). Абсолютний час утримання для метаболіту, отриманого нами в результаті проведення кислотного гідролізу препарату та метаболіту, який було знайдено в екстракті з кишечника отруєних дилтіаземом щурів, співпадав і складав 6,461 хв., що дало нам змогу ідентифікувати отриману нами сполуку як метаболіт дилтіазему (рис. 2 - 3).

  

 Рис. 1. Хроматограма дилтіазему Рис. 2. Хроматограма метаболіту

 (метод ВЕРХ) дилтіазему (метод ВЕРХ)

 

 Рис. 3. ВЕРХ хроматограма витяжки, отриманої з кишечника отруєного дилтіаземом щура

 **При досліджені поведінки дилтіазему при сумісній присутності з деякими препаратами серцево-судиної групи за даних умов спостерігалося їх задовільне розділення (рис. 4).**

 

**Рис. 4. Хроматограма метопрололу, дилтіазему, верапамілу та**

 **ніфедипіну при сумісній присутності.**

 Досліджено поведінку дилтіазему в УФ-області спектра в різних розчинниках: воді, 0,1М розчині кислоті хлористоводневої, метанолі та хлороформі. В усіх досліджених розчинниках в області довжини хвиль від 220 до 310 нм дилтіазем має чіткий максимум світлопоглинаня: у воді та в 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої при 234 ± 1 нм, в хлороформі при 243 ± 1 нм, в метанолі при 238 ± 1 нм. (рис. 5).

2

3

4

1

 λ, нм

Рис.5. УФ – спектри дилтіазему в різних розчинниках (10 мкг/мл):

1. воді;
2. хлороформі;
3. метанолі;
4. 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої;

**Кількісне визначення дилтіазему.**

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

 Методика кількісного визначення дилтіазему, розроблена на основі методу екстракційної фотометрії, заснована на утворенні іонного асоціату препарату з метиловим оранжевим. Було експериментально встановлено, що іонний асоціат дилтіазему з кислотним барвником - метиловим оранжевим у слабко кислому середовищі ( рН = 4,6 ) екстрагується хлороформом і забарвлює його в жовтий колір. Вільний барвник за цих умов хлороформом не екстрагується. Оскільки інтенсивність забарвлення отриманих розчинів була незначною, то для підвищення чутливості методу отриманий іонний асоціат розкладали додаванням до хлороформного розчину 1% розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі. Барвник при цьому звільнюється та надає розчину інтенсивного червоного забарвлення. Кількість барвника, що звільнилась, еквівалентна кількості дилтіазему в іонному асоціаті. Оптичну густину забарвлених розчинів вимірювали на фотоколоріметрі КФК-2 (світлофільтр з λеф = 540 нм, товщина кювети 10 мм). Експериментальні дані свідчать, що світлопоглинання забарвлених розчинів підкоряється закону Бугера – Ламберта – Бера в межах концентрацій від 25 до 270 мкг дилтіазему в 15 мл кінцевого об`єму. Розрахунок вмісту дилтіазему в розчинах, що досліджували, проводили за допомогою градуювального графіка. Відносна помилка визначень становила 1,73%.

 Розроблено методики УФ- спектрофотометричного кількісного визначення дилтіазему в водних, метанольних, хлороформних розчинах та розчинах препарату в 0,1 М кислоті хлористоводневій. Межі визначення дилтіазему в водних, хлороформних розчинах та розчинах препарату в 0,1 М кислоті хлористоводневій становлять від 2,0 до 25,0 мкг/мл з відносними помилками методів 3,26%, 1,71% і 0,81% відповідно, а в метанольних розчинах від 3,0 до 26,0 мкг/мл з відносною помилкою 2,61%.

 Кількісне визначення дилтіазему за методом ВЕРХ проводили в умовах, наведених для ідентифікації препарату. Для визначення вмісту дилтіазему в об`єктах досліджень використовували побудований градуювальний графік (рис. 6). Лінійність побудованого графіка спостерігається в інтервалі концентрацій від 0,5 до 100,0 мкг/мл, відносна помилка середнього результату ± 1,39%.

 

Рис. 6. Градуювальний графік для кількісного визначення дилтіазему методом ВЕРХ.

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

 Для розробки оптимальних умов ізолювання дилтіазему 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. 7. Експериментальні дані свідчать, що дилтіазем найкраще екстрагується усіма використаними органічними розчинниками з лужного середовища. При цьому максимальна кількість препарату екстрагується при значеннях рН від 6,0 до 8,0 для хлороформу та ізоамілового

спирту та від 7,0 до 9,0 для усіх інших розчинників і складає близько 99,0% для усіх вивчених органічних розчинників, тому усі досліджені органічні розчинники можна використовувати для екстракції дилтіазему з лужних витяжок. Діетиловий ефір та гексан практично не екстрагують дилтіазем з водного середовища при рН = 2,0, що можна використовувати для очищення у процесі виділення препарату з об’єктів біологічного походження.

4

3

5

1

 Рис. 7. Залежність ступеня екстракції дилтіазему (R – середнє з 5ти визначень ) з водних розчинів від природи органічних розчинників при різних значеннях рН середовища

4

3

2

 1 - хлороформ ;

 2 - діетиловий ефір ;

 3 - бензол ;

 4 - ізоаміловий спирт;

 5 – гексан.

**Виділення дилтіазему з біологічного матеріалу.**

 На першому етапі дослідження було проаналізовано ефективність ізолювання дилтіазему з біологічного матеріалу при використанні загальноприйнятих методів ізолювання речовин, важливих у токсикологічному відношенні: методу О.О. Васильєвої (ізолювання водою, підкисленою кислотою щавлевою), методу В.П. Крамаренка (ізолювання водою, підкисленою кислотою сульфатною), методу Стаса-Отто (ізолювання спиртом етиловим, підкисленим кислотою щавлевою), методу В. А. Карташова ( ізолювання ацетоном ). При цьому використовували модельні суміші препарату з печінкою. Під час досліджень було встановлено, що найбільша кількість препарату ізолюється за допомогою методу В. А. Карташова і складає близько 80%. Використання інших методів дає значно нижчі результати. Так, за методом О. О. Васильєвої можна виділити близько 30% дилтіазему, за методом В. П. Крамаренка – 18 – 20 %, а за методом Стаса – Отто лише 7% препарату.

 За допомогою розроблених методик ізолювання дилтіазему з біологічного матеріалу з використанням метанолу та ацетонітрилу можна ізолювати близько 60 % та 85% препарату відповідно. Таким чином, максимальна кількість дилтіазему ізолюється при використанні ацетонітрилу.

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

Для виявлення дилтіазему у витяжках з біологічного матеріалу використовували метод хроматографії в тонких шарах сорбенту на пластинках „Sorbfil”, а для кількісного визначення препарату екстракційно-фотометричною та УФ-спектроскопічною методиками.

 При виявленні препарату попередньо проводили очищення витяжок від співекстрактивних речовин за допомогою ТШХ. Для цього хроматографічні пластинки з нанесеними зразками витяжок спочатку хроматографували в хлороформі, при цьому дилтіазем та його метаболіт залишався на старті, а спвіекстрактівні речовини мігрували в бік фінішу. Після цього пластинки висушували та хроматографували в системах етанол–метанол–25% розчин амоніаку (80:10:10) і хлороформ – діоксан – ацетон – 25% р-н аміаку (47,5:45:5:2,5). Для проявлення плям використовували УФ - світло, реактив Драгендорфа в модифікації по Мун’є (оранжево-буре забарвлення плям) і реактив Лібермана (темно-фіолетове забарвлення плям). За даних умов хроматографування спостерігали задовільний розподіл плям препарату та співекстрактивних речовин.

 **Виділення дилтіазему з біологічних рідин**

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

Виділення дилтіазему з сечі засновано на підкисленні проб 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої до рН 2,0-3,0, очищенні кислої водної витяжки ефіром діетиловим та екстракції препарату хлороформом. Розроблені методики дозволяють виділити близько 62% дилтіазему з крові та 84% з сечі (рис 8).

Рис. 8. Результати ізолювання дилтіазему з біологічних рідин.

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

Результати вивчення розподілу дилтіазему в органах отруєних тварин (щурів) через 5 годин після внутрішньошлункового введення препарату показали, що дилтіазем в найбільших кількостях знаходиться у шлунку і кишечнику із вмістом, легенях, сечі та селезінці (рис. 9).

сеча

серце

печінка

нирки

шлунок

кров

селезінка

легені

кишечник

Рис. 9. Розподіл дилтіазему в органах отруєних ним тварин (у відсотках до знайденого)

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

Вивчено зберігання дилтіазему в трупному матеріалі при його гнитті. Визначено, що із застосуванням методу ізолювання дилтіазему за допомогою ацетонітрилу через 30 діб можна виділити біля 25% препарату, а через 40 діб дилтіазем з біологічного матеріалу виділити неможливо (рис.10).

Рис. 10. Результати вивчення зберігання дилтіазему в біологічному матеріалі при його гнитті.

 На основі проведених досліджень запропонована схема спрямованого хімко-токсиколгічного аналізу біологічного матеріалу на дилтіазем (рис.11).

**Екстракція хлороформом**

**Хлороформний розчин випарюють до сухого залишку, який розчиняють у 2-3 краплях 0,1 М р-ну НCl, знов висушують. Сухий залишок розчиняють в 15 мл хлороформу і аналізують**

# Лужна водна витяжка

Ацетонітрильна витяжка

**5 г подрібнених органів**

**Лужний водний розчин не досліджується**

**Ізолювання ацетонітрилом**

Рис. 11. Схема спрямованого хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на дилтіазем

**Екстракційна фотометрія з метиловим оранжевим**

**Метод ВЕРХ**

**УФ-спектрофотометрія (у 0,1 М**

**р-ні НСl або у хлороформі)**

# Кількісне визначення

# 2/3 витяжки

**Метод ВЕРХ**

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

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

 **р-в Лібермана**

**Ідентифікація**

**1/3 витяжки**

**Підкислення 0,5 М р-ном НСl та очищення від домішок діетиловим ефіром**

**Кисла водно-ацетонітрильна витяжка**

**Підлуження 25% р-ном амоніаку до рН 8-9**

**Органічна фаза не досліджується**

 **ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ**

1. Проведено дослідження дилтіазему, його метаболіту та деяких інших препаратів серцево-судиної групи за допомогою методу ТШХ, вивчено поведінку цих препаратів в сучасній системі ТШХ скринінгу та запропоновано умови ТШХ, які придатні для виявлення дилтіазему, виділеного з біологічного матеріалу.
2. Вивчено умови ідентифікації дилтіазему і його метаболіту за допомогою методу ВЕРХ як окремих речовини, так і у суміші з іншими препаратами серцево-судинноі групи (метопрололом, верапамілом та ніфедипіном).

3. Розроблено доступні та чутливі методи кількісного визначення дилтіазему у водних розчинах та витяжках з біологічного матеріалу:

 - екстракційно-фотометричний, заснований на утворенні іонного асоціату з метиловим оранжевим (підпорядкування розчинів основному закону світлопоглинання в межах концентрацій 25,0-270,0 мкг препарату у 15 мл кінцевого об`єму; відносна помилка методу – 1,73 %);

 - УФ-спектрофотометричні: у воді (оптична густина розчинів підпорядковується основному закону світлопоглинання в межах концентрацій 2,0-25,0 мкг/мл препарату; відносна помилка методу – 3,26%), у 0,1 М розчині кислоти хлороводневої (оптична густина розчинів підпорядковується основному закону світлопоглинання в межах концентрацій 2,0-25,0 мкг/мл; відносна помилка методу –0,81 %), в метанолі (оптична густина розчинів підпорядковується основному закону світлопоглинання в межах концентрацій 3,0-26,0 мкг/мл препарату; відносна помилка методу – 2,61%) та у хлороформі (оптична густина розчинів підпорядковується основному закону світлопоглинання в межах концентрацій 2,0-25,0 мкг/мл препарату; відносна помилка методу – 1,71%);

* метод ВЕРХ: межі визначення препарату 0,5-100,0 мкг/мл, відносна помилка методу

 1,39%.

1. Вивчено умови екстракції дилтіазему з водних розчинів у залежності від рН середовища та природи органічного розчинника. Встановлено, що дилтіазем найкраще екстрагується усіма використаними органічними розчинниками з лужного середовища. При цьому максимальна кількість препарату екстрагується при значеннях рН від 6,0 до 8,0 для хлороформу та ізоамілового спирту та від 7,0 до 9,0 для усіх інших розчинників і складає близько 99,0% для усіх вивчених органічних розчинників, тому усі досліджені органічні розчинники можна використовувати для екстракції дилтіазему з лужних витяжок. Діетиловий ефір та гексан практично не екстрагують дилтіазем з водного середовища при рН = 2,0, що можна використовувати для очищення у процесі виділення препарату з об`єктів біологічного походження.
2. Вперше проведено порівняльну оцінку ефективності виділення дилтіазему з біологічного матеріалу загальноприйнятими у хіміко-токсикологічному аналізі методами, а також розроблено більш ефективні і експресні методи ізолювання дилтіазему метанолом і ацетонітрилом, які дозволяють виділити близько 60% та 85% препарату відповідно.
3. Вивчено умови виявлення дилтіазему та його основного метаболіту у витяжках з біологічного матеріалу за допомогою методу ТШХ. Для кількісного визначення препарату у витяжках було застосовано екстракційно-фотометричний та УФ-спектрофотометричний методи.
4. Запропоновано методики виділення дилтіазему з біологічних рідин організму (крові, сечі), які дозволяють ізолювати близько 62% із крові та близько 84% із сечі.
5. Вивчено розподіл дилтіазему в органах отруєних тварин при пероральному введенні. Встановлено, що для хіміко-токсикологічного дослідження при летальних отруєннях дилтіаземом варто відправити шлунок та кишечник із вмістом, легені, сечу та селезінку.
6. Досліджено зберігання дилтіазему в біологічному матеріалі при його гнитті, та встановлено, що за допомогою методу ізолювання ацетонітрилом через 30 діб із тканин печінки, яка піддалася гнилісним змінам, можливо виділити приблизно до 25% препарату.
7. На основі проведених досліджень запропоновано схему спрямованого хіміко- токсикологічного дослідження біологічного матеріалу на дилтіазем.

**Список опубликовах праць за темою дисертації**

1.Медведєва Ю. П., Бондар В. С. Розробка методів ідентифікації дилтіазему.// Вісник фармації.- 2003. - № 1. – С. 26 – 29. Особистий внесок здобувача: розробка хімічних, хроматографічних (ТШХ), УФ-спектрофотометричних методів ідентифікації дилтіазему; участь у написанні статті.

2. Медведєва Ю. П., Бондар В. С. Дослідження умов екстракції дилтіазему органічними розчинниками з водних розчинів та його аналіз в біологічних рідинах організму.// Вісник фармації. – 2004, №4. – С. 19-22. Особистий внесок здобувача: дослідження умов екстракції дилтіазему з водних розчинів органічними розчинниками, розробка методик кількісного визначення дилтіазему, розробка методик ізолювання препарату з біолгічних рідин організму (крові та сечі); участь у написанні статті.

3. Медведєва Ю. П., Бондар В. С. Дослідження ефективності методів ізолювання дилтіазему з біологічного матеріалу.// Медична хімія. – 2004. - № 2 (6). – С. 97 – 100. Особистий внесок здобувача: дослідження по виділенню дилтіазему з біологічного матеріалу за допомогою загальноприйнятих методів у хіміко-токсикологічному аналізі; розробка часткових методик ізолювання; участь у написанні статті.

4. Бондар В. С., Медведєва Ю. П. Застосування ТШХ – скринінгу при хіміко – токсикологічному аналізі дилтіазему.// Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики. Збірник наукових статей. Т.ІІІ. – 2004. – С. 8 – 12. Особистий внесок здобувача: проведення досліджень по використанню ТШХ-скринінгу при хімко-токсикологічному аналізі дилтіазему; участь у написанні статті.

5. Медведєва Ю. П., Бондар В. С. Дослідження по ТШХ –скринінгу дилтіазему.// Матеріали ІІ Міжнародної науково – практичної конференції “Динаміка наукових досліджень ` 2003”. – Дніпропетровськ: Наука і освіта, 2003. – С. 38 – 39.

6. Бондар В. С., Медведєва Ю. П. Розробка методів кількісного визначення дилтіазему та їх використання для аналізу препарату в біологічних рідинах організму.// “Вчені майбутнього” Міжнародна науково – практична конференція молодих вчених:Тези доповідей. – Одеса, 2003. – С. 12.

7. Медведєва Ю. П., Бондар В. С. Екстракція дилтіазему органічними розчинниками з водних розчинів при різних значеннях рН // ІІІ Міжнародна науково – практична конференція “Наука і соцальни проблеми суспільства: медицина, фармація, біотехнологія”: Тези доповідей. – Харків: Вид-во НФаУ, 2003. – С. 205.

8. Медведєва Ю. П., Бондар В. С. Дослідження ефективності методів ізолювання дилтіазему з біологічного матеріалу.// Матеріали VII міжнародної науково - практичної конференції “Наука і освіта’2004”. – Дніпропетровськ: Наука і освіта, 2004. – С. 37.

9. Медведєва Ю. П., Бондар В. С. Застосування методу високоефективної рідинної хроматографії для аналізу дилтіазему.// Створення, виробництво, стандартизація, фармакоекономіка лікарських засобів та біологічно активних добавок. Матеріали науково-практичної конференції: Тези доповідей. – Тернопіль: “Укрмедкнига”, 2004. – С. 293 – 295.

10. Медведєва Ю. П., Бондар В. С. Вивчення розподілу дилтіазему в органах отруєних тварин та дослідження по його зберіганню в біологічному матеріалі при гнитті.// Всеукраїнська науково-практична конференція “Проблеми діагностики, профілактики та лікування екзогенних та ендогенних інтоксикацій”: Тези доповідей. – Чернівці, 2004. – С. 106 – 107

 **Медведєва Ю. П.** “Хіміко – токсикологічне дослідження дилтіазему”. – Рукопис.

 Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія. Національний фармацевтичний університет, Харків, 2005.

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

 У роботі наведено умови виявлення та ідентифікації дилтіазему та його основного метаболіту за допомогою методів ТШХ, ВЕРХ, УФ – спектрофотометрії та електрофорезу на папері, а також доведено можливість їх застосування для ідентифікації дилтіазему 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 дилтіазему з водних розчинів органічними розчинниками в залежності від рН середовища. Проведено порівняльне вивчення ефективності ізолювання дилтіазему з біологічного матеріалу за допомогою загальноприйнятих у хіміко – токсикологічному аналізі методів та запропоновано власні ефективні методики ізолювання препарату з біологічного матеріалу за допомогою метанолу та ацетонітрилу.

 Розроблено методики виділення дилтіазему з біологічних рідин організму (сечі та крові).Вивчено розподіл дилтіазему 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 дилтіазем.

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

 **Медведева Ю. П. «**Химико – токсикологическое исследование дилтиазема». – 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 из группы блокаторов кальциевых каналов дилтиазема, 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 дилтиазема и его основного метаболита с помощью методов ТСХ, ВЭЖХ, УФ – спектрофотометрии и электрофореза на бумаге, а также доказана возможность их использования для идентификации дилтиазема в присутствии других препаратов сердечно – сосудистой группы, которые могут применяться совместно. Также изучено поведение дилтиазема 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, метанольных , хлороформных растворах и в 0,1 М растворе кислоты хлористоводородной) и метода ВЭЖХ.

 Изучены условия экстракции дилтиазема из водных растворов органическими растворителями (хлороформом, гексаном, диэтиловым эфиром, бензолом и изоамиловым спиртом) 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 дилтиазема 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 дилтиазем из водной среды при рН = 2, что можно использовать для очистки в процессе выделения препарата из объектов биологического происхождения.

 Проведено сравнительное изучение эффективности изолирования дилтиазема из биологического материала с помощью общепринятых в химико – токсикологическом анализе методов (А. А. Васильевой, В. Ф. Крамаренко, Стаса – Отто, В. А. Карташова). Предложены эффективные и экспрессные методики изолирования препарата из биологического материала с помощью метанола и ацетонитрила, которые позволяют выделить около 60% и 85% дилтиазема соответственно.

 Разработаны методики выделения дилтиазема из биологических жидкостей организма (мочи и крови), которые позволяют выделить около 62% препарата из крови и около 84% из мочи.

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

 При изучении сохраняемости дилтиазема в биологическом материале при гниении было определено, что с использованием метода изолирования с помощью ацетонитрила через 30 суток можно выделить около 25% препарата, а через 40 суток изолировать дилтиазем из биологического материала невозможно.

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

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

**Medvedeva Yu. P.** The chemical and toxicological investigation of diltiazem – 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, 2004.

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

The results of diltiazem and its main metabolit identification by methods TLC, HPLC, UV – spectroscopy and electrophoresis on the paper 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 diltiazem quantitative determination in extracts from biological material have been elaborated.

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

 The methodologies of diltiazem isolation from 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 diltiazem directional toxicological analysis in a biological material has been offered on the basis of carried out investigations.

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

Підписано до друку 21.09.2005. 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>









