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

### Дульцева Олена Василівна

## УДК 615.074:615.9:615.22

# ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

#  АТЕНОЛОЛУ

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 хімічних наук, професор

**БОЛОТОВ Валерій Васильович**

Національний фармацевтичний університет,

завідувач кафедри аналітичної хімії

кандидат фармацевтичних наук, доцент

**ЧУБЕНКО Олександр Владкорович**

Харківська медична академія післядипломної

освіти, доцент кафедри клінічної біохімії та

судово-медичної токсикології

**Провідна установа:** Київська медична академія післядипломної

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

фармацевтичної хімії та фармакогнозії

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 «\_\_\_»\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2004 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради МАЛОШТАН Л.М.

#### ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

***Актуальність теми.*** За даними ВООЗ аритмія є однією з найнебезпечніших патологій серцево-судинних захворювань. Сучасна медична практика пропонує багато лікарських засобів різних фармакологічних груп для лікування аритмії. Найчастіше використовують β-адреноблокатори. Зустрічаються відомості про отруєння препаратами цієї групи як у випадку монотерапії, так і внаслідок посилення їх токсичної дії при комбінованому застосуванні з іншими лікарськими засобами.

Великої уваги заслуговує селективний β1-адреноблокатор - атенолол, який є відносно новим на вітчизняному ринку лікарських засобів. Широке використання атенололу, його токсичність, наявність випадків смертельних отруєнь викликає необхідність вивчення цього препарату в хіміко-токсикологічному відношенні. У літературі відсутні дані про надійні методи ізолювання атенололу з біологічного матеріалу, виявлення і кількісного визначення, що придатні для цілей хіміко-токсикологічного аналізу. Відсутні відомості про оптимальні умови екстракції атенололу з водних розчинів, розподіл препарату в органах і біологічних рідинах організму, зберігання препарату в біологічному матеріалі.

Тому хіміко-токсикологічне дослідження атенололу з метою створення сучасних та ефективних методів і засобів аналітичного контролю є актуальним.

***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 цього дослідження є розробка ефективних та експресних методів виділення атенололу з біологічного матеріалу, методів виявлення та кількісного визначення, що придатні для хіміко-токсикологічного та фармацевтичного аналізу.

Для досягнення цієї мети були поставлені такі задачі:

* запропонувати чутливі кольорові та осадові реакції для ідентифікації атенололу, виділеного з біологічного матеріалу;
* розробити чутливі методики виявлення атенололу за допомогою методу хроматографії в тонкому шарі сорбенту (ТШХ), що дозволяє ідентифікувати його та відрізнити від структурних аналогів і препаратів, які можуть застосовуватись разом з ним, а також для очищення витяжок з біологічного матеріалу, які містять атенолол, від співекстрактивних речовин;
* розробити методику виявлення атенололу за допомогою УФ-спектроскопії, газорідинної хроматографії (ГРХ) та препаратів, що можуть використовуватись разом з ним, за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ);
* розробити методи кількісного визначення атенололу, придатні для цілей фармацевтичного та хіміко-токсикологічного аналізу (ВЕРХ, ГРХ, спектрофотометричний, екстракційно-фотометричний);
* вивчити вплив природи органічних розчинників, рН середовища на екстракцію атенололу з водних розчинів;
* порівняти ефективність загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання атенололу (О.О.Васильєвої – виділення водою, підкисленою кислотою щавлевою; В.П.Крамаренка – виділення водою, підкисленою кислотою сірчаною; Стаса-Отто – виділення спиртом етиловим, підкисленим кислотою щавлевою);
* розробити ефективну та експресну індивідуальну методику ізолювання атенололу з біологічного матеріалу;
* запропонувати методики виділення атенололу з біологічних рідин організму (крові і сечі);
* вивчити розподіл атенололу в органах отруєних ним тварин;
* дослідити зберігання атенололу в трупному матеріалі при його гнилісному розкладанні;
* на підставі виконаних досліджень розробити схему хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на атенолол.

*Об`єкт дослідження.* Селективний β1-адреноблокатор – атенолол.

*Предмет дослідження.* Ідентифікація атенололу, кількісне визначення, виділення з біоматеріалу та біологічних рідин (кров, сеча), розподіл в органах тварин, зберігання в трупному матеріалі.

*Методи дослідження.* Для ідентифікації атенололу в водних розчинах та витяжках з біологічного матеріалу використовували методи тонкошарової хроматографії, УФ-спектроскопії, кольорові та осадові реакції, ВЕРХ, ГРХ методи; для кількісного визначення – УФ-спектрофотометричний, екстракційно-фотометричний, ВЕРХ, ГРХ методи. Для ізолювання атенололу з біологічного матеріалу використовували загальноприйняті методи О.О.Васильєвої, В.П.Крамаренка, Стаса-Отто, а також методику ізолювання органічними розчинниками, на основі розробок проф. Болотова В.В.

***Наукова новизна отриманих результатів.*** Вперше виконаносистематичне дослідження атенололу в хіміко-токсикологічному відношенні.

Розроблено кольорові реакції, методи хроматографії в тонкому шарі сорбенту, УФ-спектроскопії, ВЕРХ, ГРХ, придатні для виявлення атенололу, виділеного з біологічного матеріалу. Запропоновано реакції та методи, які дозволяють виявити препарат у присутності інших серцево-судинних засобів, що можуть застосовуватися разом з ним та відрізнити його від структурних аналогів.

Розроблено нові методики кількісного визначення атенололу, які придатні для цілей хіміко-токсикологічного, фармацевтичного та криміналістичного аналізу за допомогою методів УФ-спектрофотометрії, екстракційної фотометрії, високоефективної рідинної та газорідинної хроматографій.

Вивчено умови оптимальної екстракції (рН середовища, природа органічного розчинника) його з водних розчинів органічними розчинниками, які покладено в основу розробленої методики виділення атенололу з біологічного матеріалу та біологічних рідин.

Проведено порівняльне вивчення загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання речовин стосовно атенололу. Розроблено ефективні індивідуальні методики виділення атенололу з тканин органів і біологічних рідин (крові, сечі).

Вивчено розподіл атенололу в органах отруєних ним тварин, що дозволяє вибрати оптимальні об’єкти для проведення хіміко-токсикологічного аналізу.

Визначено термін зберігання атенололу в біологічному матеріалі при його гнилісному розкладанні.

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

***Практичне значення отриманих результатів***. Розроблено методики виявлення та кількісного визначення атенололу, який виділено з біологічного матеріалу, що можуть використовуватися в практиці хіміко-токсикологічних та криміналістичних досліджень для вирішення питання про отруєння атенололом, в клінічних лабораторіях з метою виявлення вмісту атенололу в біологічних рідинах, а також у фармацевтичному аналізі.

Розроблені методики хіміко-токсикологічного аналізу атенололу впроваджено в практику судово-хімічних лабораторій (Харківського обласного бюро судово-медичної експертизи (акт від 17.09.02 р.), Луганського обласного бюро судово-медичної експертизи (акт від 30.04.03 р.), Головного бюро судово-медичної експертизи МОЗ України (акт від 24.09.04 р.)), а також в навчальний процес Запорізького медичного університету (акт від 14.05.02 р.), Львівського медичного університету (акт від 22.05.02 р.), Харківської медичної академії післядипломної освіти (акт від 27.03.02 р.), Національного медичного університету ім. Богомольця (акт від 20.05.04 р.), Одеського державного медичного університету (акт від 12.04.04 р.).

***Особистий внесок здобувача:***

* проведено аналіз літературних даних з методів виявлення, кількісного визначення та фармакологічних властивостях селективного β1-адреноблокатора – атенололу;
* розроблено методики ідентифікації та кількісного визначення атенололу (кольорові та осадові реакції, метод хроматографії в тонких шарах сорбенту, УФ-спектроскопії, екстракційної фотометрії, високоефективної рідинної та газорідинної хроматографії);
* вивчено умови екстракції атенололу з водних розчинів органічними розчинниками в залежності від рН середовища та підібрано оптимальні умови ізолювання препарату з об`єктів біологічного походження;
* вивчено розподіл в атенололу органах отруєних тварин, межі виявлення в біологічному матеріалі та його зберігання;
* запропоновано схему хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на атенолол.

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

***Апробація результатів дисертації.*** Основні результати дисертаційної роботи викладені та обговорені на V національному з’їзді фармацевтів України (Харків, 1999 р.), наукових конференціях молодих вчених та студентів НФАУ (Харків 2000, 2001рр.), IX конгресі світової федерації українських лікарських товариств, присвяченого 25-річчю СФУЛТ (Луганськ, 2002 р.), Всеукраїнській науково-практичній конференції ”Фармація ХХІ століття (Харків 2002 р.), III міжнародній науково-практичній конференції "Наука та соціальні проблеми суспільства: медицина, фармація, біотехнологія"(Харків, 2003р.).

***Публікації.*** За результатами дисертаційного дослідження опубліковано 7 друкованих робіт, з них 3 статті (у провідних наукових фахових виданнях) та 4 тез доповідей.

***Об’єм і структура дисертації.*** Робота викладена на 145 сторінках, вміщує в собі 37 таблиць, 21 рисунок та 1 схему. Складається з вступу, п’яти розділів, загальних висновків та списку літератури (155 джерел, з яких 60 - іноземних авторів) та додатків.

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

* методи виявлення атенололу за допомогою осадових, кольорових реакцій, хроматографії в тонких шарах сорбенту, газорідинної та високоефективної рідинної хроматографії, УФ-спектроскопії;
* методики кількісного визначення атенололу екстракційно-фотометричними, УФ-спектроскопічними, ВЕРХ та ГРХ методами;
* умови екстракції атенололу органічними розчинниками;
* методики ізолювання атенололу з органів трупу та біологічних рідин (кров, сеча);
* результати розподілу атенололу в органах отруєних ним тварин і його зберігання в біологічному матеріалі.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

|  |
| --- |
|  |

##### Атенолол - 4-(2-окси-3-ізопропіламінопропокси) фенілацетамід

Загальна формула - С14Н22N2О3, молекулярна маса 266,3. Препарат є кардіоселективним β1 – адреноблокатором.

**Об’єкти та методи дослідження**

Об’єктами дослідження для вирішення поставлених завдань були: атенолол, препарати, які використовуються разом з ним (фенігідин, еналаприл, резерпін, тимолол),структурні аналоги (амфетаміни), об’єкти біологічного походження (печінка, мозок, сеча, кров, нирки, селезінка, серце, шлунок та кишечник із вмістом).

З методів, обраних для дослідження використовувались загальноприйняті у хіміко-токсикологічному аналізі методи ізолювання (Стаса-Отто, О.О. Васильєвої, В.П.Крамаренка), осадові, кольорові реакції, УФ-спектроскопія, ТШХ, ВЕРХ, ГРХ та дослідження на тваринах.

**Ідентифікація атенололу**

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

При проведенні осадових реакцій використовували наступні реактиви: Марме, Зонненшейна, Бертрана, Вагнера, Драгендорфа, реактив Драгендорфа, модифікованого за Мун’є, кислоту пікринову, сіль Рейнеке, розчин кадмію йодиду.

Найбільш чутливими виявилися реактиви Драгендорфа та пікринова кислота (межа виявлення 10 мкг в пробі).

Нами вивчено кольорові реакції на атенолол та деякі інші препарати, які діють на серцево-судинну систему. Найбільш чутливими виявилися реактиви Неслера та Лібермана, які дозволяють виявити до 10 мкг атенололу в пробі.

Крім хімічних методів нами розроблено умови виявлення атенолол методом хроматографії в тонких шарах сорбенту з використанням різних шарів носіїв (пластини для високоефективної тонкошарової хроматографії (виробництва Естонії), пластини “Sorbfil”) та систем розчинників. Найбільш придатною кислою системою для ідентифікації атенололу виявилась система етилацетат – кислота мурашина – вода (10:13:7) та нейтральна система – хлороформ – етанол (9:1). Ефективний поділ атенололу при сумісній присутності з еналаприлом, резерпіном, фенігідином, тимололом досягнуто в системі бутанол – оцтова кислота – вода (40:1:1), а з структурними аналогами (амфетаміни) – в загальній скринінговій системі - хлороформ – метанол (9:1).

Як проявники були використані пари йоду, 0,02% розчин бромтимолового синього у 0,01 М розчині NaOH, реактив Драгендорфа, модифікований за Мун’є, опромінення УФ-світлом, 1% розчин нингідрину, тривкий чорний К. Найбільш чутливими проявниками виявилися реактив Драгендорфа модифікований за Мун’є (чутливість 0,75 - 1,0 мкг в пробі), та пари йоду (1,0 – 1,5 мкг в пробі) на пластинках “Sorbfil”.

Досліджено поведінку атенололу в УФ-області спектра в різних розчинниках: воді, 0,1М розчині кислоти хлористоводневої, етанолі, хлороформі, концентрованій сірчаній кислоті. Для атенололу характерні дві смуги поглинання при λmax1=274±2 нм та λmax2=280±2 нм, тільки в концентрованій сірчаній кислоті спостерігається зміщення максимуму поглинання в довгохвильову область (λmax=285±2 нм), що дає можливість застосування УФ-спектроскопії для ідентифікації атенололу.

Газохроматографічне дослідження атенололу проводили на хроматографі моделі 3700 з полум’яно-іонізаційним детектором. Були використані двометрові колонки з 3% SЕ-30, твердий носій N-AW-DMCS (0,16 – 0,20 мм) та режим програмування температур 150-290˚С з підвищенням температури 20 ˚С /хв. Температура інжектора та детектора – 250˚С. Ідентифікацію проводили, використовуючи метод внутрішніх стандартів. Як стандарти були використані сполуки з різною хроматографічною поведінкою: дифеніламін, анестезин та новокаїнамід (найбільш придатним виявився анестезин), рис.1.

|  |
| --- |
| ГЖХ |
| Рис. 1. Схема хроматограми атенололу (ГРХ). |

 Крім того проводили хромато-масспектрометричне дослідження на хроматографі Agilent Technologies, модель 6850 з мас-селективним детектором (модель 5973), колонка капілярна НР-5МS, 25м х 0,25мм, температура інжектора 280°С, температура інтерфейса - 280°С. Температура колонки програмована від 90°С (затримка 2 хв) – до 300°С (затримка 10 хв), швидкість нагріву колонки 20°С/хв,об’єм проби 1 мкл. Умови детектування: енергія іонізації – 70 еВ, режим сканування від 32 до 800 абс.од.маси. Час утримання атенололу – 12,28 хв. Мас-спектр – m/z: 72, 30, 56, 89, 43, 107, 41, 73 (рис.2).

|  |
| --- |
| Graphic2 |
| Рис.2. Мас-спектр атенололу. |

Крім вищенаведених методів для ідентифікації атенололу використано високочутливий метод ВЕРХ. Встановлено, що при хроматографуванні абсолютний час утримання атенололу становить 7,6 хв, абсолютний об’єм утримання – 761 мкл (рис. 3). В результаті дослідження встановлено, що розроблені умови хроматографування, придатні також для розділення суміші препаратів (атенолол, тимолол, еналаприл, фенігідин) (рис. 4.).

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| Рис. 3. Хроматограма атенололу (метод ВЕРХ). | Рис.4.Хроматограма суміші атенололу (1),тимололу (2), еналаприлу (3), фенігідину (4) (метод ВЕРХ). |

**Кількісне визначення атенололу**

Розроблено методики УФ-спектрофотометричного визначення спиртових та хлороформних розчинів атенололу: межі визначення атенололу в спиртових розчинах становлять від 20 до 150 мкг/мл, а для хлороформних розчинів - від 14 до 200 мкг/мл. Відносна помилка методів складає ±2,02% і ±1,96% відповідно. Розрахунок вмісту атенололу в досліджуваних розчинах проводили за градуювальним графіком.

Нами також запропонована методика кількісного визначення атенолола методом екстракційної фотометрії, яка заснована на утворенні іонного асоціату атенололу з бромтимоловим синім.

Оптичну густину забарвлених хлороформних розчинів вимірювали на фотоколориметрі КФК-2 (світлофільтр з λеф = 590 ±10 нм, товщина шару рідини 20 мм), як розчин порівняння використовували контрольний дослід. Оптична густина забарвлених розчинів підпорядковується основному закону світлопоглинання в межах концентрацій від 20 до 150 мкг атенололу в пробі, що аналізується. Розрахунок вмісту атенололу в розчинах, що досліджували, проводили за допомогою градуювального графіка. Відносна помилка визначень становила ±2,02 %.

Розроблені методики придатні для кількісного визначення атенололу в водних розчинах, а також в витяжках з біологічного матеріалу, причому УФ-спектроскопія після додаткового хроматографічного очищення.

Крім того, запропоновано методику кількісного визначення атенололу методом високоефективної рідинної хроматографії. Визначення проводили на хроматографі ”Міліхром А-02”. Для визначення вмісту атенололу в об`єктах досліджень використовували, побудований градуювальний графік (рис.5). Лінійність побудованого графіка спостерігалась в інтервалі концентрацій від 5 до 200 мкг/мл, з відносною помилкою середнього результату ± 1,8 %.

|  |
| --- |
|  |
| Рис.5. Градуювальний графік для кількісного визначення атенололу методом ВЕРХ. |

Газохроматографічне дослідження атенололу проводили на хроматографі моделі 3700 з полум`яно-іонізаційним детектором у тих самих умовах, що ідентифікацію. Для побудови градуювального графіка готували метанольні розчини препарату. Як внутрішній стандарт використовували анестезин, об’єм проби складав 2 мкл. Лінійна залежність спостерігалась в діапазоні концентрацій 20-250 мкг/мл. Відносна помилка кількісного визначення складала ±2,11 %.

**Вивчення умов екстракції атенололу 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 атенололу з водних розчинів в залежності від рН середовища та природи органічних розчинників, які широко застосовуються в хіміко-токсикологічному аналізі (свіжоперегнані хлороформ, діетиловий ефір, гексан, ізоаміловий спирт, суміш хлороформ – ізоаміловий спирт (9:1), гексан, вуглець чотирихлористий).

Для створення необхідних значень рН водних розчинів використовували універсальну буферну суміш Бріттона – Робінсона і визначали потенціометрично.

Результати визначення ступеня екстракції атенололу різними органічними розчинниками залежно від рН середовища свідчать про те, що екстракція препарату має місце тільки в лужних розчинах. Як видно з рис. 6 хлороформом екстрагується 31,5% атенололу. Тому для підвищення ступеня екстракції до хлороформу додавали ізоаміловий спирт у співвідношенні 9 до 1, що дозволило збільшити кількість екстрагованої речовини до 81,3%.

Таким чином, кращим з наведених вище екстрагентів для виділення атенололу з водних витяжок є суміш хлороформ – ізоаміловий спирт (9:1), а гексан та діетиловий ефір зручно використовувати для екстракційного очищення витяжок, що містять препарат.

|  |
| --- |
|  |
| Рис. 6. Ступінь екстракції атенололу різними органічними розчинниками у залежності від рН водного середовища |

**Виділення атенололу з біологічного матеріалу**

Нами були досліджені умови ізолювання атенололу 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 кислотою щавлевою), Стаса-Отто (ізолювання спиртом, підкисленим кислотою щавлевою). При цьому використовували модельні суміші препарату з печінкою. Під час досліджень було встановлено, що за методом В.П.Крамаренка вдається виділити 52,23 % препарату, за методом О.О.Васильєвої - 47,96%, за методом Стаса-Отто – 37,59%.

Отримані дані свідчать про те, що метод В.П.Крамаренка є ефективним, але тривалим за часом. Тому ми поставили задачу розробити експресну та ефективну індивідуальну методику ізолювання атенололу з витяжок з біологічного матеріалу. Методика заснована на попереднім розтиранні подрібненого біологічного матеріалу з безводним натрієм сульфатом та ізолюванням атенололу 100 мл сумішшю хлороформ – ізоаміловий спирт (9:1). Суміш пропускали крізь колонку з подрібненим біоматеріалом, за цих умов утворюється до 90 мл елюату, який тричі збовтують з 10 мл 0,01 М кислоти хлороводневої. Екстракційну очистку проводили за допомогою ефіру діетилового. Ефірні шари відокремлювали і надалі не досліджували. Потім кислу водну витяжку підлужували 20% розчином натрію гідроксиду до рН 9-10 за універсальним індикатором і тричі екстрагували новими порціями суміші хлороформу та ізоамілового спирту (9:1) по 10 мл. Лужні хлороформні витяжки об’єднували та аналізували. Паралельно проводили контрольний дослід. При цьому розроблена методика ізолювання атенололу за допомогою суміші хлороформ – ізоаміловий спирт (9:1) дозволяє виділити 63,84% препарату з біологічного матеріалу.

**Виявлення атенололу у витяжках з біологічного матеріалу**

Для виявлення атенололу у витяжках з біологічного матеріалу використовували метод хроматографії в тонкому шарі сорбенту, кольорові реакції, УФ-спектроскопію, а для кількісного визначення препарату - екстракційно-фотометричний та УФ-спектрофотометричний методи.

Слід зазначити, що для виявлення та визначення атенололу, виділенного з біологічного матеріалу, методом УФ-спектрофотометрії необхідне додаткове очищення витяжок за допомогою ТШХ (пластинки Сорбфіл з нанесеними зразками витяжок спочатку хроматографували в гексані. При цьому атенолол залишався на лінії старту, а співекстрактивні речовини мігрували в бік фінішу. Після цього пластини висушували та вміщували в камеру з системою розчинників етилацетат – мурашина кислота – вода (10:13:7)), у цих умовах спостерігався задовільний розподіл плям атенололу від співекстрактивних речовин.

Для виявлення та кількісного визначення атенолол методом УФ-спектрофотометрії проводили попереднє хроматографічне очищення, як зазначено вище. Після цього ретельно елюювали препарат із фрагменту шару сорбенту, що відповідав плямі атенололу з допомогою суміші хлороформ – ізоаміловий спирт (9:1). Екстракт відфільтровували, розділяли на дві частини і випаровували. Сухі залишки розчиняли в концентрованій сірчаній кислоті та спирті етиловому. Проводили виявлення та кількісне визначення атенололу в отриманому розчині за допомогою вище наведених методів.

**Виділення атенололу з біологічних рідин**

Нами також запропоновані методики виділення атенололу з біологічних рідин організму (крові, сечі).

Методика виділення атенололу з крові заснована на осадженні клітинних елементів крові та сечі 0,1М розчином кислоти хлороводневої (з центрифугуванням), очищенні кислої водної витяжки ефіром діетиловим, наступним підлужненням 20% розчином натрію гідроксиду до рН 10,0 та екстракції препарату за допомогою суміші хлороформ – ізоаміловий спирт (9:1). Методика дозволяє виділити 47-52 % з крові та 59-61 % атенололу з сечі. Результати ізолювання атенололу з біологічних об΄єктів (печінка, кров, сеча) за розробленими методиками наведено на рис.7.

|  |
| --- |
|  |
| Рис. 7. Результати ізолювання атенололу з біологічних об΄єктівза розробленими методиками. |

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

Результати вивчення розподілу атенололу в органах отруєних тварин (щурів) через 6 годин після перорального введення препарату показали, що атенолол в найбільших кількостях знаходиться в шлунку та кишечнику із вмістом, нирках і печінці (рис.8).

|  |
| --- |
|  |
| Рис. 8. Розподіл атенололу в органах отруєних ним тварин (у відсотках до знайденого). |

**Зберігання атенолол в біологічному матеріалу при його гнилісному розкладанні**

Вивчено зберігання атенололу в трупному матеріалі при його гнилісному розкладанні. Вказано, що метод ізолювання за допомогою суміші хлороформ – ізоаміловий спирт (9:1) через 40 діб зберігання біологічного матеріалу (тканина печінки) дозволяє виділити 2,9 % атенололу (рис.9).

|  |
| --- |
|  |
| Рис. 9. Результати вивчення зберігання атенололу в біологічному матеріалі, що піддався гнилісним змінам. |

На основі проведених досліджень запропонована схема хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на атенолол (рис.10).

Хроматографічне очищення гексаном (пластинки Сорбфіл), з наступним елююванням сумішшю хлороформ-ізоаміловий спирт (9:1)

Ізолювання сумішшю хлороформ-ізоаміловий спирт (9:1)

10г подрібнених органів, розтертих з 30 г Na2SO4 (безв.)

Екстракція 0,01 М розчином HCl

Органічний
розчин не
досліджують

Ефірний розчин не досліджують

## Екстракційне очищення ефіром

Підлужують 20% NaOH до pH 9-10

Рекстракція сумішшю хлороформ-ізоаміловий спирт (9:1)

# Лужна водна витяжка

Лужний водний розчин не досліджують

Ідентифікація
(1/3 витяжки)

Кількісне визначення (2/3 витяжки)

ТШХ в системі етилацетат-кислота мурашина-вода (10:13:7); хлороформ-етанол (9:1)

ВЕРХ

УФ-спектроскопія
1. етанольний розчин
2. розчин в H2SO4(конц.)

УФ-спектрофотометрія
(визначають в етанольному розчині)

Екстракційна фотометрія з використанням бромтимолового синього

Лужна органічна витяжка

Кисла водна витяжка

Кисла водна витяжка

# Органічна витяжка

Рис.10. Схема хіміко-токсикологічного дослідження на атенолол.

**ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ**

1. Запропоновано кольорові та осадові реакції, а також методи ТШХ, УФ-спектроскопії, які придатні для виявлення атенололу, виділених з біологічного матеріалу.
2. Запропоновано методики виявлення атенололу за допомогою методу ТШХ, що дозволяють ідентифікувати його та відрізнити від структурних аналогів, а також препаратів, які можуть застосовуватись разом з ним;
3. Розроблено доступні та чутливі методи кількісного визначення атенололу:

а) екстракційно-фотометричний, заснований на утворенні іонного асоціату атенололу з бромтимоловим синім; оптична густина забарвлених розчинів підпорядковується основному закону світлопоглинання в межах концентрацій від 20 до 150 мкг атенололу у 10 мл кінцевого об`єму; відносна помилка методу становить ±2,02 %;

б) УФ-спектрофотометричний, заснований на вимірюванні оптичної густини розчинів атенололу в етанольному розчині при λmax274 нм; оптична густина розчинів підпорядковується основному закону світлопоглинання в межах концентрацій від 20 до 150 мкг/ мл, відносна помилка методу становить ±2,02 %; та хлороформному розчині - оптична густина розчинів підпорядковується основному закону світлопоглинання в межах концентрацій від 14 до 200 мкг/мл , відносна помилка методу становить ±1,96 %

1. Вивчено умови ідентифікації та кількісного визначення атенололу, як окремої речовини за допомогою методу ВЕРХ, так і в суміші з еналаприлом, тимололом, фенігідином. Межі визначення препарату становлять 5 – 200 мкг/мл, відносна помилка методу складає ± 1,8 %.
2. Вивчено умови ідентифікації та кількісного визначення атенололу методом ГРХ. Межі визначення препарату - 20 – 250 мкг/мл, відносна помилка методу ±2,11 %.
3. Вивчено умови екстракції атенололу з водних розчинів у залежності від рН середовища. Встановлено, що екстракція атенололу має місце тільки в лужних розчинах, а оптимальним розчинником для екстракції атенололу з водних розчинів є суміш хлороформ - ізоаміловий спирт (9:1) (ступінь одноразової екстракції складає близько 81%). При цьому гексан та діетиловий ефір зручно використовувати для екстракційного очищення водних витяжок з біологічного матеріалу від співекстрактивних речовин.
4. Вперше проведено порівняльну оцінку виділення атенололу з біологічного матеріалу загальноприйнятими в хіміко-токсикологічному аналізі методами (встановлено, що зазначені методи дозволяють виділити від 38 до 54% атенололу з біологічного матеріалу), а також розроблено більш ефективну і експресну методику ізолювання атенололу за допомогою суміші хлороформ - ізоаміловий спирт, яка дозволяє виділити 64-68% діючої речовини з біологічного матеріалу.
5. Запропоновано методики виділення атенололу з біологічних рідин організму (крові і сечі), які дозволяють ізолювати до 52 і 61% відповідно.
6. Вивчено умови виявлення атенололу у витяжках із біологічного матеріалу методами ТШХ й УФ-спектроскопії. Для кількісного визначення препаратів у витяжках із біологічного матеріалу застосовані екстракційно-фотометричний та спектрофотометричний методи.
7. Вивчено розподіл атенололу в органах отруєних тварин при пероральному введенні препарату. Встановлено, що найбільша кількість атенололу знаходиться в шлунку та кишечнику із вмістом, печінці та нирках. Ці органи рекомендовано відправляти на судово-хімічні дослідження біологічного матеріалу у випадку летальних отруєнь препаратом.
8. Вивчено зберігання атенололу в біологічному матеріалі при його гнилісному розкладанні. Показано, що за допомогою методики ізолювання сумішшю хлороформ - ізоаміловий спирт (9:1) через 40 діб з тканини печінки, що піддалася гнилісним змінам, можна виділити 2,9% атенололу.
9. На основі проведених досліджень запропоновано схему хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на атенолол.

**Список опублікованих праць за темою дисертації**

1. Дульцева О.В., Бондар В.С., Маміна О.О. Хроматографічні методи виявлення та кількісного визначення атенололу //Фармацевтичний журнал.- 2002.-№2.-С.68-71. Особистий внесок здобувача: розробка методів ідентифікації атенолола за допомогою тонкошарової та газорідинної хроматографій; розробка умов кількісного визначення атенололу методом ГРХ.
2. Дульцева О.В., Бондар В.С. Порівняльна оцінка методів виділення атенололу з біологічного матеріалу //Фармацевтичний журнал.- 2003.-№6.-С.63-67. Особистий внесок здобувача: дослідження виділення атенолол з біологічного матеріалу за допомогою методів О.О. Васильєвої, В.П.Крамаренка, Стаса-Отто; розробка часткової методики ізолювання; розробка методики кількісного визначення препарату.
3. Дульцева О.В., Бондар В.С., Маміна О.О. Розробка оптимальних умов аналізу атенололу методом високоефективної рідинної хроматографії, придатних для хіміко-токсикологічних досліджень //Вісник фармації.- 2003.-№4 (36).-С.34-36.Особистий внесок здобувача: дослідження умов хроматографування атенолол, тимолову, еналаприлу та фенігідину як окремих речовин; дослідження умов хроматографування суміші препаратів; розробка методики кількісного визначення атенололу.
4. Дульцева О.В., Бондар В.С., Маміна О.О. Розробка методів ідентифікації та кількісного визначення атенололу. //Вісник фармації.- 2001.-№3(27).-С.81.
5. Дульцева О.В., Бондар В.С., Маміна О.О. Розробка методів кількісного визначення атенололу. //В кн.: Тези доповідей наукової конференції молодих вчених та студентів, Харків: Вид. НФаУ - 2000.-С.47.
6. Бондар В.С., Маміна О.О., Дульцева О.В. Кількісне визначення атенололу методом екстракційної фотометрії //В кн.: Досягнення сучасної фармації та перспективи її розвитку у новому тисячолітті. Матеріали V національного з`їзду фармацевтів України, Харків: Вид. НФаУ - 1999.-С.490-491.
7. Дульцева О.В., Бондар В.С. Порівняльна оцінка методів ізолювання атенололу з біологічного матеріалу // Тези доповідей ІХ конгрес світової федерації українських лікарських товариств, присвячений 25-річчю СФУЛТ(19-22 серпня 2002р., м. Луганськ).- Луганськ-Київ-Чикаго.- 2002.-С.460.

**Дульцева О.В.** “Хіміко-токсикологічне дослідження атенололу”. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія. Національний фармацевтичний університет, Харків, 2005.

Дисертаційна робота присвячена хіміко-токсикологічному дослідженню препарату β-блокатору- атенололу.

У роботі представлені результати виявлення атенололу за допомогою кольорових та осадових реакцій, ТШХ, ВЕРХ, ГРХ, УФ – спектроскопії. Розроблено доступні та чутливі методики кількісного визначення препарату в водних розчинах та витяжках з біологічного матеріалу за допомогою методів УФ-спектрофотометрії, екстракційної фотометрії, ВЕРХ та ГРХ.

Вивчено умови екстракції атенололу з водних розчинів у залежності від рН середовища. Проведено порівняльне вивчення загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів виділення речовин з біологічного матеріалу ( методи Стаса-Отто, О.О. Васильєвої, В.П. Крамаренка) стосовно атенололу.

Запропоновано ефективну методику виділення атенолол з біологічного матеріалу за допомогою суміші хлороформ – ізоаміловий спирт (9:1).

Запропоновано методики виділення атенололу з біологічних рідин організму (крові, сечі). Вивчено розподіл атенололу в органах отруєних ним тварин та його зберігання в біологічному матеріалі при його гнилісному розкладанні. На основі проведених досліджень запропоновано схема хіміко-токсикологічного аналізу атенололу у витяжках з біологічного матеріалу.

**Ключові слова:** атенолол, кольорові та осадові реакції, тонкошарова хроматографія, спектрофотометрія, високоефективна рідинна хроматографія, газорідинна хроматографія, екстракція, біологічний матеріал, хіміко-токсикологічний аналіз, кров, сеча.

**Дульцева О.В.** Химико-токсикологическое исследование атенолола. – 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 β-блокатора – атенолола.

В работе представлены результаты обнаружения атенолола с помощью цветных и осадочных реакций (установлены наиболее чувствительные реактивы для обнаружения, а также определена их чувствительность), тонкослойной хроматографии (ТСХ) (на различных слоях-носителях и в различных системах кислого, щелочного и нейтрального характера), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) и УФ-спектроскопии.

Предложены условия разделения атенолола при совместном присутствии с некоторыми препаратами, которые могут использоваться вместе с ним (тимолол, фенигидин, эналаприл), с помощью методов ТСХ и ВЭЖХ.

Предложен простой и надежный метод экстракционно-фото­метри­чес­кого определения атенолола в водных растворах и вытяжках из биологического материала, основанный на образовании ионного ассоциата препарата с бромтимоловым синим. Метод позволяет обнаружить от 20 до 150 мкг/мл атенолола с относительной ошибкой ±2,02%. Также предложен УФ-спектро­фотометрический метод количественного определения атенолола в водных растворах. Метод позволяет обнаружить от 20 до 150 мкг/мл препарата в спиртовом растворе с относительной ошибкой 2,02% и в хлороформном растворе – 14-200 мкг/мл с относительной ошибкой 1,96%.

Исследованы условия экстрации атенолола из водных растворов хлороформом, диэтиловым эфиром, гексаном, смесью хлороформ – изоамиловый спирт (9:1), бензолом в интервале рН от 2,0 до 11,98. Показано, что экстракция препарата проходит только при рН больше 9, наибольшее количество экстрагируется смесью хлороформ – изоамиловий спирт (9:1) зависит от рН (степень экстракции около 81%), а диэтиловый эфир и гексан удобно использовать для очистки водных вытяжек, содержащих атенолол.

Изучены условия изолирования атенолола из биологического материала с помощью общепринятых в химико-токсикологическом аналите методов А.А.Васильевой, В.Ф.Крамаренко, Стаса-Отто. Установлено, что методы Васильевой и Крамаренко позволяют изолировать 47,96% и 52,23 соответственно, препарата из биологического материала, а метод Стаса-Отто – около 37%.

Разработана эффективная индивидуальная методика изолирования атенолола с помощью смеси хлороформ – изоамиловий спирт (9:1), которая позволяет выделить до 64% препарата из биологического материала.

Предложены методы изолирования атенолола из биологических жидкостей организма (крови и мочи), которые позволяют выделить 52% препарата из крови, и 61% из мочи.

Изучено распределение атенолола в органах отравленных животных. Установлено, что через 6 ч после внутрижелудочного введения атенолола крысам, наибольшее количество препарата содержится в желудке с содержимым, кишечнике, печени и почках, (в порядке уменьшения).

Исследована сохраняемость атенолола в биологическом материале при его гнилостном разложении. Показано, что с помощью метода изолирования ацетонитрилом после 40 суток хранения (при температуре 5°С) из биологического материала (ткань печени) можно выделить 2,9% атенолола.

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

**Ключевые слова:** атенолол, цветные и осадочные реакции, тонкослойная хроматография, спектрофотометрия, высокоэффективнфя жидкостная хроматография, газо-жидкостная хроматография, экстракция, биологический материал, химико-токсикологический анализ, кровь, моча.

**Dulceva E.V. “**The chemical and toxicological investigation of Atenolol”. – Manuscript.

The thesis on reception of a sceintific degree of the candidate of pharmaceutical sciences on a speciality 15.00.02 – pharmaceutical chemistry and pharmacognosy; National Pharmaceutical University, Kharkiv, 2005.

The thesis is devoted to chemical and toxicological analysis of β -blockers– Atenolol.

The methods of colour and precipitation reactions, TLC, HPLC, GLC and UV-spectroscopy, have been offered in this thesis for the identification of Atenolol. The UV-spectrophotometric, extraction-photometric HPLC and GLC -metod of quantitative determination of Atenolol have been worked out.

The conditions on pH medium have been studied. The comparative study of generally accepted extractive methods in chemical and toxicological analysis of substances (Stas-Otto, Vasilyeva, Kramarenko) for Atenolol has been conducted.

The effective and expressive particular extractive method for Atenolol by Chloroform –Isopentanol (9:1) has been offered.

The methods for Atenolol isolation from biological liquids of human organism (blood and urine) have been offered.

On the basis of the carried out investigations the scheme of Atenolol chemical and toxicological analysis in extracts from biological material has been offered.

**Key words**: atenolol, precipitation and colour reactions, thin-layer chromatography, high-pressure liquid chromatography, spectrophotometry, gas liquid chromatography extraction-photometry, isolation, biological material, blood, urine.

Підписано до друку 5.10.2004. Формат 60×84 1/16

Папір офсетний. Друк різографія

Умовний друк. арк. 1,16. Тираж 100 пр. Зам. № 78.

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>