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

**ТЕРНИНКО ІННА ІВАНІВНА**

## УДК 615.07:615.9:54.062

**ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНЕ**

**ДОСЛІДЖЕННЯ ЛЕПОНЕКСУ**

15.00.02 — фармацевтична хімія та фармакогнозія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

# Харків — 2003

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі аналітичної хімії

Національного фармацевтичного університету,

Міністерство охорони здоров’я України.

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

 **БОЛОТОВ Валерій Васильович**

 *Національний фармацевтичний університет, завідуючий кафедрою аналітичної хімії*

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

 **БЕЗУГЛИЙ Петро Овксентійович**

*Національний фармацевтичний університет,*

 *завідуючий кафедрою фармацевтичної 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 “19” грудня 2003 року о 1200\_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” листопада 2003 р.

Вчений секретар

 спеціалізованої вченої ради

 д. біол. н., професор малоштан Л.М.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Розробка методів хіміко-токсикологічного аналізу сильнодіючих лікарських засобів є актуальною задачею токсикологічної та фармацевтичної хімії, оскільки перелік імпортних і вітчизняних лікарських препаратів, що пропонуються на фармацевтичному ринку України, постійно зростає.

Великий інтерес в аналітичному і хіміко-токсикологічному відношенні представляють препарати антипсихотичної дії. Відомі випадки передозувань, дитячих отруєнь та використання препаратів цієї групи з метою суїциду.

В хіміко-токсикологічному відношенні недостатньо вивчений сильнодіючий препарат з вираженою антипсихотичною дією лепонекс. У літературі відсутні дані про надійні методи ізолювання лепонексу з біологічного матеріалу, виявлення і кількісного визначення, що придатні для цілей хіміко-токсикологічного та фармацевтичного аналізу. Відсутні відомості про оптимальні умови екстракції лепонексу з водних розчинів, розподіл препарату в органах і біологічних рідинах організму, зберігання препарату в біологічному матеріалі.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертацію виконано згідно з планом науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету з проблеми МОЗ України по темі “ Хімічний синтез, виділення та аналіз нових фармакологічно-активних речовин, встановлення зв'язку “структура-дія”, створення нових лікарських препаратів”, номер держреєстрації 0198U007011.

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

Для досягнення наміченої мети були поставлені такі задачі:

* розробити чутливі методики виявлення лепонексу за допомогою методу хроматографії в тонких шарах сорбенту та УФ-спектроскопії, що дозволяють відрізнити його від структурних аналогів, а також препаратів, які можуть застосовуватися разом із ним;
* вивчити можливість застосування методу хроматографії в тонких шарах сорбенту для ідентифікації та очищення лепонексу від спів­екстрактивних речовин у витяжках з біологічного матеріалу;
* розробити методики кількісного визначення лепонексу, що придатні для цілей хіміко-токсикологічного і фармацевтичного аналізу (екстракційно-фотометричний, спектрофотометричний та метод кількісного визначення за допомогою високоефективной рідинной хроматографії);
* вивчити вплив природи органічних розчинників, рН середовища на екстракцію лепонексу 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 сірчаною; Стаса-Отто - виділення спиртом етиловим, підкисленим кислотою щавлевою) стосовно до лепонексу;
* розробити ефективну і експресну часну методику ізолювання лепонексу з біологічного матеріалу;
* запропонувати методики виділення лепонексу з біологічних рідин організму (крові, сечі);
* вивчити розподіл лепонексу в органах отруєних тварин;
* дослідити зберігання лепонексу в трупному матеріалі при його гнильному розкладенні;
* на підставі виконаних досліджень запропонувати схему хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на лепонекс.

*Об’єкт дослідження.* Препарат антипсихотичної дії - лепонекс.

*Предмет дослідження.* Розробка методик (виявлення, кількісного визначення, виділення з біологічного матеріалу) хіміко-токсикологічного аналізу.

*Методи дослідження.* Для ідентифікації лепонексу в розчинах, у витяжках з біологічного матеріалу і лікарських формах використовували методи тонкошарової та високоефективної рідинної хроматографії, УФ- та ІЧ-спектроскопії, кольорові, осадові та мікрокристалоскопічні реакції; для кількісного визначення – спектрофотометричний, екстракційно-фотометричний та метод високоефективної рідинної хроматографії. Для ізолювання лепонексу з біологічного матеріалу використовували загальноприйняті в хіміко-токсикологічному аналізі методи О.О. Васильєвої, В.П. Крамаренка, Стаса-Отто, а також часний метод ізолювання хлороформом, який запропоновано нами.

**Наукова новизна одержаних результатів***.* Вперше виконано комплекс досліджень по вивченню лепонексу в хіміко-токсикологічному відношенні.

Запропоновані методики хроматографії в тонкому шарі сорбенту (ТШХ) та високоефективної рідинної хроматографії ( ВЕРХ), методики УФ- та ІЧ-спектроскопії для виявлення лепонексу, який виділено з біологічного матеріалу. Наведені методи і реакції дозволяють ідентифікувати лепонекс у присутності інших препаратів, що можуть застосовуватись разом з ним.

Розроблено нові УФ-спектрофотометрична, екстракційно-фотометрична та ВЕРХ методика визначення лепонексу, що придатні для цілей хіміко-токсикологічного, фармацевтичного та криміналістичного аналізу.

Вивчені умови (природа органічного розчинника, рН середовища) екстракції лепонексу з водних розчинів, на основі чого розроблена методика його ізолювання з біологічного матеріалу.

Вперше проведено порівняльне вивчення загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання органічних речовин основного характеру стосовно до лепонексу. Розроблено ефективну і експресну часну методику ізолювання лепонексу з біологічного матеріалу за допомогою хлороформу.

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

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

Вперше досліджено зберігаємість лепонексу в біологічному матеріалі при його гнильному розкладенні.

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

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблені методики виявлення і кількісного визначення лепонексу, який виділено з біологічного матеріалу, можуть використовуватися в практиці хіміко-токсикологічних досліджень для вирішення питань отруєнь лепонексом, в клінічних лабораторіях з метою визначення лепонексу в біологічних рідинах, а також у фармацевтичному та криміналістичному аналізі.

Розроблені методики хіміко-токсикологічного дослідження лепонексу впроваджені в практику лабораторії судово-хімічних експертиз Луганського обласного бюро судово-медичної експертизи, лабораторії фізико-хімічних методів аналізу ДП “Дослідний завод ДНЦЛЗ”, Держінспекцію з контролю якості лікарських засобів у Луганській області.а також у навчальні процеси кафедри клінічної біохімії й судово-медичної токсикології Харківської медичної академії післядипломної освіти та кафедри неорганічної хімії з курсом токсикологічної хімії Запорізського державного медичного університету

**Особистий внесок здобувача:**

* проведено аналіз даних літератури з методів виявлення і кількісного визначення, фармакології і токсикології антипсихотичного препарату лепонексу;
* розроблено методики ідентифікації і кількісного визначення лепонексу у витяжках з біологічного матеріалу і в лікарських формах (методи ТШХ і ВЕРХ лепонексу та інших препаратів, що можуть застосовуватись разом з ним, УФ- та ІЧ-спектроскопії, спектрофотометрії та екстракційної фотометрії).
* вивчено умови екстракції лепонексу з водних розчинів органічними розчинниками в залежності від їх природи та рН середовища;
* проведено порівняльну оцінку ефективності ізолювання лепонексу з біологічного матеріалу загальноприйнятими в хіміко-токсикологічному аналізі методами;
* розроблена ефективна і експресна часна методика ізолювання лепонексу з біологічного матеріалу за допомогою хлороформу;
* запропоновані методики виділення лепонексу з біологічних рідин організму (крові, сечі);
* досліджено розподіл лепонексу в органах отруєних тварин, а також зберігаємість препарату у біологічному матеріалі.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати дисертаційної роботи доповідалися на Всеукраїнській науково-практичній конференціі “Фармація XXI століття” (Харків,2002), ІІІ Міжнародній науково-практичній конференціі “Наука і соціальні проблеми суспільства: медицина, фармація , біотехнологія” (Харків, 2003).

Роботу заслухано та обговорено на міжкафедральному науковому семінарі Національного фармацевтичного університету.

**Публікації.** За результатами дисертації опубліковано 5 наукових статей, 3 тез доповідей.

**Об’єм і структура дисертації.** Робота викладена на 124 сторінках, містить 26 таблиць, 14 рисунків, 1 схему. Складається з введення, чотирьох розділів, загальних висновків та списку літератури ( 221 істочник, з котрих 119 на іноземних мовах).

На захист виносяться наступні результати експериментальних випробувань і їх теоретичне обґрунтування:

* методики виявлення лепонексу за допомогою ТШХ та ВЕРХ, УФ-, ІЧ-спектроскопії;
* методики кількісного визначення лепонексу екстракційно-фотометричним, УФ-спектрофотометричним методами, та методом високоефективноі рідинної хроматографії;
* умови екстракції лепонексу органічними розчинниками;
* методики ізолювання лепонексу з органів трупу і біологічних рідин (кров, сеча);
* результати розподілу лепонексу в органах отруєних ним тварин та його зберігаємість в біологічному матеріалі при його гнитті.

# ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

 Лепонекс -8-хлор-11-(4-метил-1-

 пиперазиніл)-5Н-дибензо[b,е][1,4]

 диазепін [1]. Широко застосовується

 в медичній практиці як антипсихотич-

 ний засіб для лікування резистентних

 форм шизофренії.

**1. Ідентифікація лепонексу**

Для ідентифікації лепонексу в фармацевтичному аналізі використовують методи УФ-, ІЧ-спектроскопії, ТШХ, ГРХ, ВЕРХ, якісні реакції та деякі інші.

Безпосереднє використання цих методів та реакцій не завжди можливе у хіміко-токсикологічному аналізі. Деякі з них недостатньо чутливі та специфічні. Інші потребують попереднього ретельного очищення витяжок з біологічного матеріалу від співекстрактивних речовин, які заважають ідентифікації. Тому в хіміко-токсикологічному аналізі проводять комплекс досліджень, який включає різні методи аналізу, що значно підвищує надійність одержаних даних.

В зв’язку з цим нами вивчена можливість використання для виявлення лепонексу при хіміко-токсикологічних дослідженнях методів хроматографії в тонких шарах сорбенту (ТШХ), вискоефективной рідинной хроматографії ( ВЕРХ), УФ- та ІЧ-спектроскопії.

Нами вивчені умови виявлення лепонексу за допомогою методу хроматографії в тонких шарах сорбенту. Вибір оптимальних систем розчинників різної полярності та тонких шарів проводили з урахуванням їх здатності розділяти лепонекс, співекстрактивні речовини з біологічного матеріалу, а також лікарські препарати, які можуть бути призначені разом з лепонексом (амітриптилин, аміназин та трифтазин).

В якості тонких шарів дляі ТШХ використовували скляні пластини для високоефективної ТШХ “Merck” (Silica gel 60F254 , Німеччина) та пластини “Sorbfil”, Росія (силікагель ПТСХ-II-А, тип основи ПЕТФ-Э).

При хроматографуванні вивчено чотирнадцять систем розчинників. Найбільш ефективні значення Rf плям лепонексу спостерігаються в системах: хлороформ – діоксан – ацетон - 25% розчин аміаку (47,5:45:5:2,5); толуол-ацетон–етанол-25% розчин аміаку (45:45:7,5:2,5); хлороформ – метанол (90:10); метанол - 25% розчин аміаку (100:1,5 ); ацетон – вода (1:1 ); етанол – 25% розчин аміаку ( 100:1,5); бутанол – ацетон – вода (4:5:1); етилацетат – ксилол –метанол-25% розчин аміаку ( 90:5:5:1,5 ).

Хроматографування проводили в камері об`ємом 1000 см3, в котру вносили по 50 мл систем розчинників. Камеру насичували протягом 30 хвилин. Перед використанням пластини обприскували 0,1 М розчином калію гідроксиду в метанолі, висушували й активували в сушильній шафі при 110 °С протягом 30 хв. Проби лепонексу, які вміщували від 0,2 мкг до 5 мкг речовини, та інших препаратів ( 0,05% розчини в метанолі) наносили за допомогою скляного капіляру на лінію старту на відстані 2 см від краю пластини. Шлях перебігу розчинників - 8 см.Після досягнення системами розчинників лінії фронту пластини виймали з камери, висушували під тягою при кімнатній температурі і виявляли відповідними реактивами. В якості проявників були використані УФ-світло ( фіолетове забарвлення), реактив Драгендорфа за Муньє ( червоно-коричневе забарвлення плям ), пари йоду ( коричневе забарвлення), послідовне обприскування 0,3М розчином міді сульфату та 0,3М розчином калію йодиду (коричневе забарвлення), реактив Ердмана (брудно зелене забарвлення), реактив Лібермана (буре забарвлення , яке швидко зникає), реактив Форреста (оранжеве забарвлення, яке з'являється поступово), 3% розчин пероксиду водню при нагріванні (110ºC, протягом 10 хвилин) ( блідо рожеве забарвлення), розчин нінгідріну при нагріванні та 50% розчин кислоти сірчаної в етанолі не дають забарвлення плям лепонексу. Найбільш чутливими проявниками є реактив Драгендорфа за Муньє, пари йоду та 0,3М розчин міді сульфату та 0,3М розчин калію йодиду (на пластинах «Sorbfil» і Merck вдається виявити 0,2 мкг і більше лепонексу).

Нами також вивчена можливість використання тонкошарової хроматографії для виявлення лепонексу в присутності інших лікарських препаратів, що можуть бути використані спільно з ним. Вибір оптимальних систем розчинників різноманітної полярності проводили з урахуванням їхньої здатності поділяти лепонекс, інші препарати, що можуть застосовуватися спільно з ним, та соекстрактивні речовини з біологічного матеріалу. Найбільшою поділяючою здатністю для препаратів, які можуть застосовуватися разом з лепонексом, володіють системи розчинників ацетон – вода ( 1:1 ); етилацетат – ксилол –метанол-25% розчин аміаку ( 90:5:5:1,5); гексан –толуол –діетиламін (75:15:10); циклогексан – толуол - діетиламін (75:15:10 ). Найбільш вибірковими проявниками плям досліджуваних препаратів є реактиви Ердмана та Форреста які дають з ними різні забарвлення. Cлід також відмітити, що плями лепонексу на відміну від плям інших препаратів, проявляються 3% розчином пероксиду водню після нагрівання (110ºC, протягом 10 хвилин).

Вивчена можливість застосування розроблених умов хроматографування для виявлення лепонексу та його очистки від співекстрактивних речовин в витяжках з біологічного матеріалу. Найбільш придатною для цієї мети виявилася система метанол - 25% розчин аміаку (100:1,5 ).

Вивчено УФ-спектри лепонексу в 0,1 М розчині кислоти хлороводневої (рис.1).

Максимуми абсорбції лепонексу спостерігали при 240 та 285-295 нм (плато), що відповідає даним літератури.

 Вивчена можливість застосування УФ-спектроскопії для ідентифікації лепонексу в витяжках з біологічного матеріалу. Встановлено, що співекстрактивні речовини заважають ідентифікації лепонексу цим методом. В зв’язку з цим необхідна додаткова екстракційна та хроматографічна очистка витяжок.

ІЧ-спектр лепонексу (в таблетках з KBr) характеризується наявністю смуг поглинання, см–1: 1600, 1560,758,1136,1101,1117.

Окрім ТШХ у хіміко-токсикологічному аналізі для виявлення та розділення речовин дуже широко використовується метод ВЕРХ. У роботі вивчена можливість використання ВЕРХ для виявлення лепонексу, як індивідуальної речовини, так і при сумісній присутності з іншими антипсихотичними препаратами. Хроматографічний аналіз лепонексу здійснювали на мікроколонковому рідинному хроматографі “ Міліхром А-02”. Для досліджування використовували металічну обернено-фазну колонку розміром 2 x 75 мм, яка була наповнена сорбентом з прищепленою неполярною хімічно сполученою фазою – Nucleosil-100-5, C-18. Аналіз проводився у зворотньо-фазному варіанті.

 Як детектор застосовували двопроміневий мультихвильовий УФ-спектрофотометр (діапазон хвиль 190-360 нм, точність довжини хвилі 0,5 нм). Для хроматографічного дослідження застосовували буферний розчин з рН 2,18, концентрація якого становила 0,2 М відносно перхлорату літію та 0,01М відносно дигідрофосфату літію; органічний розчинник – ацетонітріл. Градієнтне подавання розчинника проводили від 20 до 100% ацетонітрілу зі швидкістю 100 кл/хв.

#### Для ідентифікації лепонексу використовували абсолютні (tабс ) часи та абсолютні об'єми (Vабс) утримування (9,18 хв та 918 мкл відповідно), а також спектральні відношення, одержані при їх детектуванні за сімома довжинами хвиль УФ-спектра – 210, 220, 230, 240, 250, 260 і 300 нм. Нами були також проведені дослідження з ідентифікації лепонексу в сумісній присутності з іншими нейролептиками, які можуть бути застосовані разом з ним (амітриптилін та аміназин) за умов зазначених вище. Спочатку було ідентифіковано кожну з речовин окремо. Хроматограма розділення суміші лепонексу зображена на рисунку 2.

Для оцінки хроматографічного розділення розраховували ступінь розділення піків (Rs); селективність (α); коефіцієнт ємності (k').

Нами встановлено, що приготований розчин необхідно аналізувати в день виготовлення, тому що препарат нестійкий, та швидко розкладається під дією світла.

**2. Кількісне визначення лепонексу**

Для кількісного визначення лепонексу нами розроблені доступні і надійні екстракційно-фотометрична, УФ-спектрофотометрична методики, а також методика кількісного визначення лепонекску за допомогою ВЕРХ.

Екстракційно-фотометрична методика визначення лепонексу заснована на утворенні іонного асоціату препарату з метиловим оранжевим (молярне співвідношення 1:1), який при рН 4,6 екстрагується хлороформом. Вказаний іонний асоціат має малий питомий коефіцієнт світлопоглинання, тому для підвищення чутливості методу ми розкладали його за допомогою спиртового розчину кислоти сірчаної. При цьому виділялася еквівалентна препарату кількість вільного метилового оранжевого, що має значно більший питомий коефіцієнт світлопоглинання.

При розробці даного методу ми вивчили вплив рН водної фази на утворення та екстракцію іонних асоціатів лепонексу з метиловим оранжевим, вплив на цей процес кількості барвника, а також проводили вибір оптимального світлофільтра та робочої довжини кювети.

Оптичну густину забарвлених розчинів вимірювали на фотоколориметрі КФК-2 (світлофільтр з λеф = 540±10 нм, кювета з товщиною шару 10 мм). Оптична густина забарвлених розчинів підпорядковується основному закону світлопоглинання в межах концентрацій від 10 до 90 мкг лепонексу в пробі, що аналізується.

Розрахунок вмісту лепонексу в розчинах, що досліджували, проводили за допомогою градуювального графіку, або рівняння прямої, яке було розраховане за допомогою методу найменших квадратів: А = 0,009653∙С + 0,0937 , де А-оптична густина розчину , С-вміст лепонексу у пробі, в мкг.

 Відносна помилка визначень становить ±2,29 %. Метод застосований для кількісного визначення лепонексу в розчинах, а також в витяжках з біологічного матеріалу.

Для УФ-спектрофотометричного кількісного визначення лепонексу ми побудували спочатку градуювальний графік. Оптичну густину отриманих розчинів вимірювали на спектрофотометрі СФ-46, у кюветі з товщиною шару рідини 10 мм, при довжині хвилі 240±2 нм. Як розчин порівняння використовували 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої. Оптична густина розчинів лепонексу підпорядковується основному закону світлопоглинання в інтервалах концентрацій від 12 мкг до 120 мкг лепонексу в 10 мл розчину. Для розрахунку вмісту лепонексу в розчинах користувались градуювальним графіком, або рівнянням прямої, яке було розраховане за допомогою методу найменших квадратів [1]: D = 0,008357С+0,00133 ,де D- оптична густина розчину , С- вміст лепонексу в 10 мл розчину, в мкг. Цей метод ми використовували для кількісного визначення лепонексу, виділеного з біологічного матеріалу (витяжка вимагає ретельного очищення від соекстрактивних речовин). Відносна помилка визначення середнього результату становить ±2,25%.

Кількісний аналіз лепонексу в модельних розчинах методом ВЕРХ проводили з урахуванням його максимуму поглинання в УФ- області спектра (при λ 240 нм).

 Для визначення вмісту лепонексу в об'єктах досліджень використовували градуювальний графік, побудований в координатах – S лепонексу –С, мкг/мл (площа піка лепонексу – концентрація лепонексу), для чого застосовували стандартний розчин лепонексу в метанолі ( вміст препарату – 50 мкг/мл). Лінійність побудованого графіка спостерігалась в інтервалі концентрацій 1,5-30мкг/мл. Чутливість методу становила 1,5мкг/мл препарату, що було визначено як кількість речовини у пробі, що відповідає сигналу, який у п'ять разів більший ніж рівень шумів у хроматографі. Відносна помилка складала ±2.27%.

**3. Вивчення умов екстракції лепонексу з водних розчинів**

Для наступної розробки оптимальних умов ізолювання лепонексу з біологічного матеріалу нами вивчено екстракцію препарату з водних розчинів деякими органічними розчинниками в залежності від рН середовища.

Використовували буферні розчини з рН від 2,0 до 11,0 ( рН 2,0 підтримували за допомогою розчину кислоти хлороводневої, рН від 3,0 до 5,0 за допомогою ацетатного буферного розчину, рН від 6,0 до 11,0 за допомогою 1М розчину гидроксиду натрія,). Кислотність буферних розчинів контролювали потенціометрично. Як органічні розчинники (екстрагенти) застосовували найбільш поширені в хіміко-токсикологічному аналізі, свіжоперегнані хлороформ, діетиловий ефір та гексан. Проводили одноразову екстракцію лепонексу. Об’єм органічного розчинника (екстрагента) дорівнював об’єму водної фази. 5 мл органічного шару випарювали на водяній бані в випарювальній чашці при температурі 30-40ºС, а потім до сухого залишку додавали 10 мл хлороформу або 10 мл 0,01М розчину кислоти хлороводневої, ретельно перемішували скляною паличкою. Визначали кількісний вміст лепонексу екстракційно-фотометричним методом. Залежність ступеню (R,%) екстракції лепонексу від рН середовища приведені на рисунку 3.

Одержані дані свідчать про те, що незначна кількість препарату екстрагується хлороформом та ефіром вже при рН 2,0-3,0. Хлороформ починає екстрагувати лепонекс із водних розчинів при рН 2-3 (ступінь екстракції 4,2-15,0%). Максимум екстракції препарату хлороформом має місце при рН 11 (ступінь екстракції біля 99%). Діетиловий ефір починає екстрагувати препарат також при рН 2-3 (ступінь екстракції 16,0-55,0%), а максимум екстракції в інтервалі, що досліджували, спостерігається при рН 11 (ступінь екстракції біля 99%). При використанні в якості органічного розчинника гексану, екстракція препарату починається при рН 5-6 (ступінь екстракції 3,3-16,2%), а максимум екстракції лепонексу гексаном спостерігається при рН 10,0 (ступінь екстракції складає біля 91%). Таким чином, для екстракції лепонексу з лужних водних витяжок краще використовувати хлороформ або діетиловий ефір. Для очищення витяжок з біологічного матеріалу від співекстрактивних речовин у кислому середовищі зручно застосовувати гексан або хлороформ , тому що при рН 2,0-3,0 хлороформ на відміну від діетилового ефіру екстрагує незначну кількість препарату.

**4. Виділення лепонексу з біологічного матеріалу**

В літературі відсутні відомості про методи виділення лепонексу з біологічного матеріалу.

Спочатку ми порівняли ефективність загальноприйнятих в хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання органічних речовин основного характеру з біологічного матеріалу стосовно до лепонексу:

* О.О. Васильєвої (витягання водою, підкисленою кислотою щавлевою);
* В.П. Крамаренка (витягання водою, підкисленою кислотою сірчаною);
* Стаса-Отто (витягання спиртом етиловим, підкисленим кислотою щавлевою).

Виявилося, що ці методи дозволяють ізолювати від 14% (Стаса-Отто) до 24%-28% (О.О. Васильєвої та В.П. Крамаренка) препарату з біологічного матеріалу (тканина печінки).

Ми поставили собі за мету розробити більш ефективну та експресну часну методику ізолювання лепонексу з біологічного матеріалу. Методика заснована на розтиранні подрібненого біологічного матеріалу, що містить препарат, з потрійною кількістю безводного натрію сульфату та наступним елююванням лепонексу з одержаної суміші у скляній колонці хлороформом. Хлороформний елюат піддавали додатковому екстракційному очищенню, оскільки наявність великої кількості співекстрактивних речовин заважала подальшому дослідженню витяжок.

Очищені проби витяжок використовували для ідентифікації лепонексу, виділеного з біологічного матеріалу за допомогою методу ТШХ, а також для кількісного визначення препарату екстракційно-фотометричним та УФ-спектроскопічним методами.

Розроблений метод ізолювання лепонексу за допомогою хлороформу дозволяє виділити 35-40 % препарату з біологічного матеріалу. Для виявлення лепонексу, виділеного з біологічного матеріалу методами УФ-, ІЧ-спектроскопії, необхідно додаткове очищення витяжок методами екстракції, ТШХ або іншими.

Слід зазначити, що співекстрактивні речовини з біологічного матеріалу часто заважають процесу хроматографування (розтягнуті плями лепонексу разом із співекстрактивними речовинами, близьке значення Rf препарату та вищезгаданих речовин). У зв'язку з цим пластини з нанесеними пробами попередньо двічі елюювали в камері з хлороформом до краю пластини. При цьому плями лепонексу залишалися на старті, а плями співекстрактивних речовин мігрували. Після цього пластини висушували та вміщували в камеру з системою розчинників метанол-25% розчин аміаку (100:1,5). В цих умовах спостерігався задовільний розподіл плям лепонексу та співекстрактивних речовин.

Для виявлення лепонексу методом УФ-спектроскопії попередню проводили екстракційну або хроматографічну очистку. Хроматографічну очистку проводили як зазначено вище. Після цього ретельно елюювали препарат з фрагменту шару сорбенту, який відповідав плямі лепонексу за допомогою метанолу. Екстракт відфільтровували та випарювали. Сухий залишок розчиняли в 0,1М розчині кислоти хлороводневої. При проведенні екстракційної очистки у випарювальну чашку поміщали хлороформну витяжку ( 1/10 частина хлороформної витяжки, що отримана одним із 4 методів ізолювання ), та випаровували її на водяній бані при t=30-40°C до сухого залишку , який розчиняли в 10 мл 0,1М розчину кислоти хлороводневої при ретельному перемішування скляною паличкою. Проводили ідентифікацію лепонексу в цьому розчині за допомогою методу УФ-спектроскопії.

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

Методика виділення лепонексу з крові заснована на осадженні формених елементів крові 0,1М розчином кислоти хлороводневої (з центрифугуванням), очищенні кислої водної витяжки хлороформом, підлуговуванні витяжки до рН 10 та екстракції препарату за допомогою хлороформу. Методика дозволяє виділити 64% лепонексу з крові.

Виділення лепонексу з сечі засноване на підкисленні проби з препаратом 0,1М розчином кислоти хлороводневої до рН 2,0-3,0, очищенні кислої водної витяжки хлороформом з подальшим підлуговуванням водної витяжки до рН 10 та екстракції препарату хлороформом. Методика дозволяє виділити 75-77% лепонексу з сечі.

Результати вивчення розподілу лепонексу в органах отруєних тварин (щурів) через 3 години після внутрішньошлункового введення препарату показали, що лепонекс в найбільших кількостях знаходиться в в шлунку зі вмістом, мозку, кишечнику зі вмістом, легенях, серці, нирках та печінці (в порядку зменшення). Тому саме ці органи варто відправляти на хіміко-токсикологічні дослідження при летальних отруєннях лепонексом.

Вивчено зберігання лепонексу в трупному матеріалі при його гнитті. Вказано, що після 90-добового зберігання в біологічному матеріалі (тканина печінки) за допомогою методу ізолювання хлороформом можна виділити до 14% лепонексу.

# ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

1. Запропоновано методи ТШХ, ВЕРХ, УФ-спектроскопії, що придатні для виявлення лепонексу, який виділено з біологічного матеріалу.
2. Розроблено доступні і чутливі методики кількісного визначення
лепонексу:

а) екстракційно-фотометрична, що заснована на утворенні іонного асоціату лепонексу з метиловим оранжевим; оптична густина забарвлених розчинів підпорядковується основному закону світлопоглинання в межах концентрацій від 10 до 90 мкг лепонексу в пробі. Відносна помилка визначень становить ±2,29 %.

б) УФ-спектрофотометрична, що дає можливість визначати від 12 мкг до 120 мкг лепонексу в 10 мл розчину. Відносна помилка визначення середнього результату складає ±2,25%.

в) методика кількісного визначення лепонексу за допомогою ВЕРХ. Лінійність побудованого градуювального графіка спостерігається в інтервалі концентрацій 1,5-30мкг/мл. Чутливість методики становить 1,5мкг/мл препарату*.* Відносна помилка складає ±2.27 %

Методики застосовані для кількісного визначення лепонексу в хлороформних та водних розчинах та в витяжках з біологічного матеріалу.

1. Вивчено умови екстракції лепонексу з водних розчинів у залежності від рН середовища. Встановлено, що максимум екстракції препарату хлороформом має місце при рН 10. Для екстракційного очищення водних витяжок з біологічного матеріалу від співекстрактивних речовин у кислому середовищі зручно використовувати гексан та хлороформ.
2. Вперше проведена порівняльна оцінка виділення лепонексу з біологічного матеріалу загальноприйнятими в хіміко-токсикологічному аналізі методами, а також розроблена більш ефективна і експресна часна методика ізолювання препарату за допомогою хлороформу. Методика дозволяє виділити 35-40% лепонексу з біологічного матеріалу.
3. Вивчено умови виявлення лепонексу у витяжках з біологічного матеріалу методами ТШХ й УФ-спектроскопії. Для кількісного визначення препарату у витяжках з біологічного матеріалу застосовано екстракційно-фотометричний та УФ-спектрофотометричний методи.
4. Запропоновано методики виділення лепонексу з біологічних рідин організму (крові і сечі), що дозволяють ізолювати до 64 і до 77% препарату відповідно.
5. Встановлено, що найбільша кількість лепонексу, через 3 години після внутрішньошлункового введення тваринам, знаходиться в шлунку, мозку, кишечнику зі вмістом, легенях, нирках, серці та печінці. Ці органи рекомендовано відправляти на судово-хімічні дослідження біологічного матеріалу на лепонекс в разі летальних отруєнь препаратом.
6. Вивчено зберігання лепонексу в біологічному матеріалі при його гнитті. Встановлено, що за допомогою методу ізолювання хлороформом через
90 діб з тканини печінки, що піддалася гнильним змінам, можна виділити до 14% препарату.
7. На основі проведених досліджень запропоновано схему хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на лепонекс.

# Список опублікованих праць за темою дисертації

1 Болотов В.В., Тернинко І.І. Екстракційно-фотометричне та спектрофотометричне визначення лепонексу // Вісник фармації. – 2000. - №4 (24).– С.11-13. Особистий внесок здобувача полягає в розробці методик екстракційно-фотометричного та УФ-спектрофотометричного визначення лепонексу та участі у написанні та оформленні статтті.

2. Болотов В.В., Тернинко І.І. Застосування хроматографії в тонких шарах сорбенту для визначення лепонексу // Вісник фармації. – 2001. - №4 (28). – С.23-25. Особистий внесок здобувача полягає в розробці методики визначення лепонексу методом хроматографії в тонких шарах сорбенту та участі у написанні та оформленні статтті.

3. Болотов В.В., Тернинко І.І. Застосування високоефективної рідинної хроматографії в аналізі лепонексу при його сумісній присутності з іншими нейролептичними препаратами // Фізиологічно активні речовини. – 2002. - №1(33). – С.47-49. Особистий внесок здобувача полягає в розробці методики визначення лепонексу методом високоефективної рідинної хроматографії при його сумісній присутності з іншими нейролептичними препаратами та участі у написанні та оформленні статтті.

4. Болотов В.В., Тернинко І.І. Порівняльна оцінка методів виділення лепонексу з біологічного матеріалу та вивчення його ізолювання з біологічних рідин організму // Фізиологічно активні речовини.–2002.-№2(34).–С.45-48. Особистий внесок здобувача полягає в вивченні методів виділення лепонексу з біологічного матеріалу та вивчення його ізолювання з біологічних рідин організму та участі у написанні та оформленні статтті.

5. Болотов В.В., Тернинко І.І. Вивчення розподілу лепонексу в органах отруєних ним тварин та його зберігання в біологічному матеріалі // Клінічна фармація.-2003.-Т.7, №1.-С.20-22. Особистий внесок здобувача полягає в вивченні розподілу лепонексу в органах отруєних ним тварин та його зберігання в біологічному матеріалі та участі у написанні та оформленні статтті

**Тернинко І.І.** “Хіміко-токсикологічне дослідження лепонексу”. – Рукопис.

Дисертація на здобуття вченого ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія.
Національний фармацевтичний університет, Харків, 2003.

Дисертаційна робота присвячена хіміко-токсикологічному дослідженню антипсихотичного препарату лепонексу.

У роботі представлені результати виявлення лепонексу за допомогою методів ТШХ та ВЕРХ, УФ- та ІЧ-спектроскопії.

Запропоновані доступні та чутливі екстракційно-фотометричний, УФ-спектроскопічний та ВЕРХ методи кількісного визначення препарату в розчинах та витяжках з біологічного матеріалу.

Вивчено умови екстракції лепонексу з водних розчинів у залежності від рН середовища. Вивчено виділення лепонексу з біологічного матеріалу загальноприйнятими у хіміко-токсикологічному аналізі методами і запропоновано ефективний індивідуальний метод ізолювання препарату за допомогою хлороформу.

Розроблені методики ізолювання лепонексу з біологічних рідин організму (крові, сечі).

Вивчено розподіл лепонексу в органах отруєних ним тварин та його зберігання в біологічному матеріалі.

На основі проведених досліджень запропонована схема хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на лепонекс.

**Ключові слова:** лепонекс, тонкошарова хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія, спектрофотометрія, екстракційна фотоелектроколоріметрія, методи ізолювання, екстракція, біологічний матеріал, біологічні рідини, хіміко-токсикологічний аналіз.

**Тернинко И.И.**“Химико-токсикологическое исследование лепонекса”. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевти­ческих наук по специальности 15.00.02. – Фармацевтическая химия и фармакогнозия. – Национальный фармацевтический университет,
Харьков, 2003.

Диссертационная работа посвящена химико-токсикологическому исследованию антипсихотического препарата лепонекса.

Нами изучены условия обнаружения лепонекса методом тонкослойной хроматографии как индивидуального вещества, так и в смеси с другими нейролептиками, которые могут быть приняты вместе с ним.

В качестве тонких слоев в методе ТСХ использовали стеклянные пластины для высокоэфективной ТСХ “Merck” и пластины “Sorbfil”. При хроматографировании изучено четырнадцать систем растворителей. В качестве проявителей использовано 10 реактивов. Предел обнаружения в данных условиях - 0,2 мкг в пробе. Cледует также отметить, что пятна лепонекса в отличие от пятен других препаратов, проявляются 3% раствором перекиси водорода после нагревания (110ºC, на протяжении 10 минут).

Изучен УФ-спектр лепонекса в 0,1 М растворе кислоты хлороводородной. Максимумы абсорбции лепонекса наблюдали при 240 и 285-295 нм (плато), что отвечает данным литературы.

 ИК-спектр лепонекса (в таблетках с KBr) характеризуется наличием полос поглащения, см–1: 1600, 1560,758,1136,1101,1117.

В работе изучена возможность использования высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения лепонекса, как индивидуального вещества, так и при совместном присутствии с другими антипсихотическими препаратами. Для идентификации лепонекса использовали абсолютные (tабс ) время и объем (Vабс) удерживания (9,18 мин та 918 мкл соответственно), а также спектральные отношения. Для оценки хроматографического разделения рассчитывали степень разделения пиков (Rs); селективность (α); коэфициент емкости (k'). Нами установлено, что приготовленный раствор необходимо анализировать в день приготовления, так как препарат нестойкий и быстро разлагается под действием света.

Разработаны доступные и чувствительные методики количественного определения лепонекса: экстракционно-фотометрическая, УФ-спектрофотометрическая и методика количественного определения при помощи ВЭЖХ. Экстракционно-фотометрическая меодика основана на образовании ионного ассоциата лепонекса с метиловым оранжевым. Оптическая плотность окрашенных растворов подчиняется основному закону светопоглащения в пределах концентраций от 10 до 90 мкг лепонекса в пробе. Относительная ошибка определения составляет ±2,29 %.

УФ-спектрофотометрическая методика количественного определения лепонекса дает возможность определять от 12 мкг до 120 мкг лепонекса в 10 мл раствора. Относительная ошибка опрделения среднего результата составляет ±2,25%. Предложенные методики могут быть использованы для количественного определения лепонекса в хлороформных и водных растворах и в вытяжках из биологического материала.

Методика количественного определения лепонекса при помощи ВЕЖХ основана на построении градуировочного графика. Линейность построенного градуировочного графика наблюдается в интервале концентраций 1,5-30мкг/мл. Относительная ошибка метода ±2.27 %.

 Изучены условия экстракции лепонекса из водных растворов в зависимости от рН среды. Установлено, что максимум экстракции препарата хлороформом наблдается при рН 10. Для экстракционной очистки водных вытяжек из биологического материала от соэкстрактивных веществ в кислой среде. предпочтительно использовать гексан или хлороформ.

 Впервые проведена сравнительная оценка изолирования лепонекса из биологического материала общепринтыми в химико-токсикологическом анализе методиками, а также разработана более эффективная и экспрессная частная методика изолирования препарата хлороформом. Методика позволяет выделить 35-40% лепонекса из биологического материала.

 Предложены методики выделени лепонекса из биологических жидкостей организма (кровь и моча), которые позволяют изолировать до 64 и до 77% препарата соответственно.

 Установлено, что наибольшее количетво лепонекса, через 3 часа после внутрижелудочного введения животным, находится в желудке, мозге, кишечнике с содержимым, легких, почках, сердце и печени. Эти органы рекомендовано отправлять на судебно-химические иследования биологического материала на лепонекс в случае летальных отравлений препаратом.

 Изучена сохраняемость лепонекса в биологическом материале, который поддался гнилостным зменениям. Установлено, что изолированием хлороформом даже через 90 суток из ткани печени можно выделить до 14% препарата.

На основе проведенных исследований предложена схема химико-токсикологического анализа биологического материала на лепонекс.

**Ключевые слова:** лепонекс, тонкослойная хроматография, високоэффективная жидкостная хроматография, спектрофотометрия, экстракционная фотоэлектроколориметрия, методы изолирования, экстракция, биологический материал, биологические жидкости, химико-токсикологический анализ.

**Terninko I.I.** “The chemico-toxicological investigation of Leponex”. - Manuscript.

The dissertation on competition of a scientific degree of the candidate of pharmaceutical sciences on a speciality 15.00.02. - Pharmaceutical chemistry and pharmacognosy; - National pharmaceutical university, Kharkov, 2003.

The thesis is devoted to chemico-toxicological analysis of antipsychotic preparation Leponex.

In work the results of detection of Leponex by methods ТLС, HPLC, UV- and IR- spectroscopy are submitted.

The extraction- photometric, UV-spectrophotometric and HPLC methods of Leponex quantitative determination are elaborateded.

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

The comparative study of generally accepted in chemico-toxicological analysis of base substances extractive method (Stas-Otto, Vasilyeva, Kramarenko methods) related to Leponex is conducted. The effective and expressive particular extractive methods of these preparation from biological material, with the help chloroform are carried out.

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

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

The distribution of the Leponex in bodies of the animals, poisoned with it, and it сохраняемость in a biological material is investigated.

**Key words**: Leponex, chromatography, spectrophotometry, photoelectrocolorimetry, extraction- photometry, methods of isolation, biological material, blood, urine, chemico-toxicological analysis.

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