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

національний фармацевтичний університет

**ахмедов ЕЛшАН юніс-огли**

## УДК 615.212:54.061.062:66.061.35:543.544:577.352.523

**ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНЕ**

**ДОСЛІДЖЕННЯ ТРАМАЛУ**

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, завідувач кафедри аналітичної хімії*

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

 **БЕЗУГЛИЙ Петро Овксентійович**

 *Національний фармацевтичний університет, завідувач кафедри фармацевтичної хімії*

 доктор фармацевтичних наук, професор

 **МАЗУР Іван Антонович**

 *Запорізький медичний університет,*

 *завідувач кафедри фармацевтичної хімії*

**Провідна установа:** *Київська медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика, кафедра фармацевтич­ної хімії та фармакогнозії*

Захист відбудеться “24” листопада 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 “24” жовтня 2003 р.

#### Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради

д.біол.н., професор малоштан Л.М.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Збільшення асортименту знеболюючих препаратів різноманітної хімічної структури та будови потребує розширювати наукові дослідження в галузі розробки нових, а також удосконалювати існуючі методи їх хіміко-аналітичного контролю.

Великий інтерес в аналітичному і хіміко-токсикологічному відношенні представляють анальгетичні препарати. Відомі випадки використання препаратів цієї групи із суїцидальною ціллю, передозувань та отруєнь.

В хіміко-токсикологічному відношенні значний інтерес представляє синтетичний анальгетик-опіоід центральної дії середньої сили трамал, немедичне використання якого приводить до різних отруєнь. Судово-медична діагностика отруєнь трамалом є складною задачею. Це пояснюються тим, що обставини отруєнь часто невідомі, а їх клінічна картина не специфічна, так як він не викликає в організмі характерних клінічних патологічних порушень, або морфологічних змін. Результати хіміко-токсикологічного аналізу біологічних об’єктів є основним засобом доказів отруєнь препаратом. Трамал недостатньо вивчений в хіміко-токсикологічному відношенні. У літературі відсутні дані про надійні методи ізолювання трамалу з біологічного матеріалу, ідентифікації, виявлення і кількісного визначення, що придатні для цілей хіміко-токсикологічного аналізу. Відсутні відомості про оптимальні умови екстракції трамалу з водних розчинів, недостатньо повно представлені дані про розподіл препарату в органах і біологічних рідинах організму, відсутні дані про зберігання препарату в біологічному матеріалі, тому тема дисертації, що обрана нами є актуальною.

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

**Мета і задачі досліджень.** Метою даної роботи є розробка ефективних та експресних методік виділення трамалу з біологічного матеріалу, методік його виявлення і кількісного визначення, що придатні для хіміко-токсикологічного та фармацевтичного аналізу.

Для досягнення наміченої мети були поставлені такі задачі:

* запропонувати кольорові, осадові та мікрокристалоскопічні реакції для ідентифікації трамалу, виділеного з біологічного матеріалу;
* розробити чутливі методики виявлення трамалу за допомогою методу хроматографії в тонких шарах сорбенту (ТШХ) та УФ-спектроскопії, що дозволяють відрізнити його від структурних аналогів, а також препаратів, які можуть застосовуватися разом з ним;
* вивчити можливість застосування методу хроматографії в ТШХ для ідентифікації та очищення трамалу від співекстрактивних речовин у витяжках з біологічного матеріалу;
* розробити методики кількісного визначення трамалу, що придатні для цілей хіміко-токсикологічного і фармацевтичного аналізу (УФ-спектрофотометрична, екстракційно-фотометрична та іонометрична);
* розробити склад мембрани та конструкцію твердоконтактного іонселективного електрода на трамал, який би мав кращі аналітичні характеристики ніж відомі і застосувати його для кількісного визначення трамалу у водних розчинах, лікарських формах і витяжках з біологічного матеріалу;
* вивчити вплив природи органічних розчинників та рН середовища на екстракцію трамалу з водних розчинів;
* порівняти ефективність загальноприйнятих у хіміко-токсикологіч­ному аналізі методів ізолювання органічних речовин основного характеру (О.О. Васильєвої - витягання водою, підкисленою кислотою щавлевою; В.П.Крамаренка - витягання водою , підкисленою кислотою сірчаною; Стаса-Отто - витягання спиртом етиловим, підкисленим кислотою щавлевою) стосовно до трамалу;
* розробити ефективну і експресну індивідуальну методику ізолювання трамалу з біологічного матеріалу;
* запропонувати методики виділення трамалу з біологічних рідин організму (крові, сечі);
* вивчити розподіл трамалу в органах тварин отруєних препаратом;
* дослідити зберігання трамалу в трупному матеріалі при його гнильному розкладенні;
* на підставі виконаних досліджень запропонувати схему хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на трамал.

*Об’єкт дослідження.*Препарат знеболюючої дії – трамал.

*Предмет дослідження.* Хіміко-токсикологічний аналіз трамалу.

**Методи дослідження.** Для ідентифікації трамалу у водних розчинах, лікарських формах та в витяжках з біологічного матеріалу використовували метод тонкошарової хроматографії, УФ-, ІК – спектроскопії, іонометрії з використанням розробленого твердоконтактного трамалселективного електроду, кольорові та осадові реакції, електрофорез на папері; для кількісного визначення – УФ-спектрофотометричний, екстраційно-фотометричний методи. Для ізолювання трамалу з біологічного матеріалу використовували загально прийняті методи О.О. Васильєвої, В.П. Крамаренко, Стаса-Отто, а також часткова методика ізолювання хлороформом запропонована нами для трамалу.

**Наукова новизна одержаних результатів***.* Вперше виконані систематичні дослідження трамалу в хіміко-токсикологічному відношенні.

Запропоновані кольорові та осадові реакції, методики з використанням ТШХ та УФ-спектроскопії для виявлення трамалу, який виділено з біологічного матеріалу. Вказані методики і реакції дозволяють ідентифікувати трамал у присутності інших препаратів, що можуть застосовуватись разом з ним.

Розроблені нові УФ-спектрофотометрична, екстракційно-фотометрична методики кількісного визначення трамалу, що придатні для цілей хіміко-токсикологічного, фармацевтичного та криміналістичного аналізу.

Разом з співавторами розроблено конструкцію і склад мембрани нового твердоконтактного іонселективного електрода на трамал, що перевершує за своїми аналітичними характеристиками відомі раніше. Електрод застосовано для кількісного визначення трамалу в водних розчинах, мікрооб’ємах розчинів і лікарських формах. Вперше іонселективний електрод застосовано для кількісного визначення препарату в витяжках з біологічного матеріалу.

Вивчені умови (природа органічного розчинника, рН середовища) екстракції трамалу 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 трамалу. Розроблено ефективний і експресний індивідуальний метод ізолювання трамалу з біологічного матеріалу за допомогою хлороформу.

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

Вперше вивчено розподіл трамалу в органах отруєних тварин, що дозволяє вибрати оптимальні об'єкти для проведення хіміко-токсикологічного аналізу, та досліджено зберігання трамалу в біологічному матеріалі при його гнильному розкладенні.

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

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблені методики ідентифікації і кількісного визначення трамалу виділеного з біологічного матеріалу, можуть використовуватися в практиці хміко-токсикологічних досліджень для вирішення питань отруєнь трамалом, в клінічних лабораторіях з метою визначення трамалу в біологічних рідинах, а також у фармацевтичному й криміналістичному аналізі.

Новий твердоконтактний іонселективний електрод на трамал, на склад мембрани якого отримано патент України, може знайти застосування в медицині, у фармацевтичному і хіміко-токсикологіч­ному аналізі.

Розроблені методики хіміко-токсикологічного дослідження трамалу впроваджені в практику лабораторій судово-хімічних експертиз Харківського, Одеського, Львівського обласних бюро судово-медичних експертиз, а також у навчальний процес Національного фармацевтичного університету та кафедри клінічної біохімії й судово-медичної токсикології Харківської медичної академії післядипломної освіти; Запорізького, Львівського медичних університетів.

**Особистий внесок здобувача:**

* проведено аналіз літературних даних з методів виявлення і кількісного визначення, фармакології і токсикології анальгетичного препарату трамалу;
* розроблено методики ідентифікації і кількісного визначення трамалу у витяжках з біологічного матеріалу і в лікарських формах (кольорові, осадові та мікрокристалоскопічні реакції, методики ТШХ трамалу і інших препаратів, що застосовують разом з ним, УФ-спектрофотометрії і екстракційної фотометрії);
* розроблено склад мембрани та конструкцію твердоконтактного ІСЕ на трамал, що має кращі аналітичні характеристики, ніж відомі;
* розроблено методики кількісного визначення трамалу в водних розчинах, модельних лікарських формах і витяжках з біологічного матеріалу за допомогою іонселективного електрода на трамал;
* вивчені умови екстракції трамалу з водних розчинів органічними розчинниками в залежності від їх природи та рН середовища;
* проведено порівняльну оцінку ефективності ізолювання трамалу з біологічного матеріалу загальноприйнятими в хіміко-токсикологічному аналізі методами;
* розроблено ефективну і експресну індивідуальну методику ізолювання трамалу з біологічного матеріалу за допомогою хлороформу;
* запропоновані методики виділення трамалу з біологічних рідин організму (крові, сечі);
* досліджено розподіл трамалу в органах отруєних тварин, а також його зберігання в біологічному матеріалі при гнитті;
* запропоновано схему хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на трамал.

**Апробація результатів дисертації.** Доповіді основних результатів дисертаційної роботи заслуховувалися на науково-практичній конференції, присвяченій V з’їзду фармацевтів України (Харків, УкрФА, 1999), “Вчені України – вітчизняній фармації” (Харків, НФАУ, 2000), “Наукової конференції молодих вчених та студентів” (Харків, НФАУ, 2000), “Української науково-практичної конференції” (Харків, НФаУ, 2002).

Робота доповідалась та обговорювалась на міжкафедральній конференції фармацевтичного факультету Національного фармацевтичного університету.

**Публікації.** Матеріали дисертації опубліковані у 4 статтях, 1 патенті України, 4 тезах доповідей.

**Об’єм і структура дисертації.** Робота викладена на 150 сторінках, містить 38 таблиць, 15 рисунків, 1 схему; складається з введення, п’яти розділів, загальних висновків та списку літератури (174 джерел, з котрих 71 на іноземних мовах).

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

* методики виявлення трамалу за допомогою кольорових реакцій, ТШХ, електрофорезу на папері, УФ-спектроскопії;
* екстракційно-фотометрична та УФ-спектрофотометрична методики кількісного визначення трамалу;
* склад мембрани і конструкція трамалселективного електроду;
* іонометричний аналіз трамалу;
* умови екстракції трамалу органічними розчинниками;
* методики ізолювання трамалу з органів трупу і біологічних рідин (кров, сеча);
* результати розподілу трамалу в органах отруєних ним тварин і його зберігаємість в біологічному матеріалі при гнітті.

# ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

|  |  |
| --- | --- |
|  | Трамал- RR,SS-тpaнc-2-(диметил-aмінo)мeтил-l-(м-метокси-феніл) циклогексанола гідрохлорид . Широко застосовується в медичній практиці як ефективний анальгетичний засіб.  |

**1. Ідентифікація трамалу**

Для ідентифікації трамалу в фармацевтичному аналізі використовують методи УФ-, ІЧ-спектроскопії, ТШХ, високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), якісні реакції та деякі інші методи.

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, однак суттєво ускладнює роботу.

В зв’язку з цим нами вивчена можливість використання для ідентифікації трамалу при хіміко-токсикологічних дослідженнях кольорових, осадових та мікрокристалоскопічних реакцій, методів ТШХ, УФ- та ІЧ-спектроскопії.

Нами вивчено кольорові реакції трамалу з реактивами: реактив Маркі (до 1 мл концентрованої сірчаної кислоти додають 1 краплю формаліну), реактив Лібермана (5 г натрію нітриту в 50 мл концентрованої сірчаної кислоти), реактив Фреде (розчин молібдату амонію в концентрованій сірчаній кислоті), реактив Ердмана (суміш 20 мл концентрованої сірчаної кислоти і 10 мл розведеної азотної кислоти), реактив Манделіна (розчин 0,01 г ванадата амонію в 2 мл концентрованої сірчаної кислоти), концентровану сірчану та азотну кислоти.

Найчутливішими виявилися реактиви: Маркі, Маркі + вода, Лібермана, Манделіна та концентрована сірчана кислота які дозволяють виявити до 0,1 мкг трамалу в пробі.

При вивченні мікрокристалоскопічних реакцій кристали характерної форми рожевого кольору з розчином трамалу в краплинній пробі утворювалась з 1% розчином сілі Рейнеке (їжакоподібні включення з рожевим відтінком при концентрації 75 мкг, при концентрації 50 мкг з’являються пелюстки).

Інші осадові реактиви – Драгендорфа (розчин вісмуту йодиду в калію йодиді), Марме, (розчин кадмію йодиду в калію йодиді) Зонненшейна (розчин кислоти фосфорномолібденової), Бертрана (розчин кислоти кремнійвольфрамової), Шейблера (розчин кислоти фосфорновольфрамової), 1% розчин калію перманганату давали з трамалом аморфні осади різного забарвлення.

Найбільш чутливими серед осадових реактивів виявилися реактиви реактиви Зонненшейна, Драгендорфа, Бертрана, Шейблера. Вони дозволяють виявити 0,5 мкг трамалу в пробі (граничне розведення 1:100000).

Нами вивчені умови виявлення трамалу за допомогою методу ТШХ. Вибір оптимальних систем розчинників різної полярності та тонких шарів проводили з урахуванням їх здатності розділяти трамал, співекстрактивні речовини з біологічного матеріалу, а також лікарські препарати, які можуть бути призначені разом з трамалом.

В якості тонких шарів в методі ТШХ використовували готові скляні пластини для високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) виробництва Естонії (сорбент КСКГ, фракція 5–20 мкм, товщина шару 130±25 мкм, розмір 10×10 см), пластини «Silufol UW-254», пластини «Armsorb» (силікагель КСКГ, фракція 5–20 мкм, товщина шару 100±25 мкм, розмір 5×10 см), пластини «Sorbfil» (силікагель СТХ-1А, тип подложки ПЕТФ-Е), скляні пластини фірми Merck (Германія, силікагель GF-254, розмір пластин 10×10 см).

Хроматографування проводили в камері об`ємом 500 см3, до якої вносили по 50 мл систем розчинників. Камеру насичували протягом 30 хвилин. Пластини заздалегідь активували нагріванням при 110°С протягом 30 хвилин. На лінію старту активованих пластин (пластинок) на відстані 2-х см від нижнього краю наносили зразки трамалу (0,05% розчин в етанолі), які містили від 0,1 мкг до 100 мкг препарату. Шлях пробігу розчинників складав 8 см. Після досягнення системами розчинників лінії фронту пластини виймали з камери, висушували під тягою при кімнатній температурі і проявляли відповідними реактивами. В якості проявників були використані пари йоду (бурі плями), реактив Маркі (буро-коричневе→темно-зелене), реактив Маркі + вода (смарагдово-зелене забарвлення, що поступово перетворюється в світло-зелене), концентрований розчин сірчаної кислоти (синє забарвлення), реактив Драгендорфа, реактив Драгендорфа по Муньє. Найбільш чутливими проявниками є реактив Маркі і реактив Драгендорфа (на пластинах «Sorbfil» і Merck вдається виявити 0,1 мкг і більше трамалу).

Нами також вивчена можливість використання ТШХ для виявлення трамалу в присутності інших лікарських препаратів, що можуть бути використані спільно з ним. Вибір оптимальних систем розчинників різноманітної полярності проводили з урахуванням їхньої здатності поділяти трамал, інші препарати, що можуть застосовуватися спільно з ним, та соекстрактивні речовини з біологічного матеріалу.

Вивчена можливість застосування розроблених умов хроматографування для виявлення трамалу 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);

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

ІЧ-спектр трамалу (в таблетках з KBr) характеризується наявністю смуг поглинання, см–1: 3320, 2940, 2600, 1601, 1575, 1238, 1042.

**2. Кількісне визначення трамалу**

Для кількісного визначення трамалу нами розроблені доступна і надійні екстракційно-фотометрична, УФ-спектрофотометрична а також іонометрична методики.

Екстракційно-фотометрична методика визначення трамалу 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 трамалу з метиловим оранжевим, вплив на цей процес кількості азобарвника, а також провели 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 14 до 150мкг трамалу в 12 мл кінцевого об’єму.

Розрахунок вмісту трамалу в розчинах, що досліджували, проводили за допомогою грдуювального графіку. Відносна помилка визначень становить ±2,90 %. Метод застосований для кількісного визначення трамалу в водних розчинах, а також в витяжках з біологічного матеріалу.

Для спектрофотометричного кількісного визначення трамалу ми спочатку будували градуювальний графік. Оптичну густину отриманих розчинів вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 у кюветі з товщиною шару рідини 10 мм при довжині хвилі 272±2 нм. Як розчин порівняння використовували 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої. Оптична густина розчинів трамалу підпорядковувалась основному законові світлопоглинання в інтервалах концентрацій від 20 до 180 мкг/мл. Цей метод ми використовували для кількісного визначення трамалу в водних розчинах, а також у витяжках виділених з біологічного матеріалу (витяжка вимагає ретельного очищення від соекстрактивних речовин).

**3. Іонометричний аналіз трамалу**

Нами розроблені склад мембрани та конструкція нового твердоконтактного іонселективного електрода (ІСЕ) на трамал, який має кращі електроаналітичні характеристики, ніж відомі.

Мембрана твердоконтактного іонселективного електрода на трамал складається з структурного компонента (полівінілхлорид), пластифікатора-розчинника (диоктилфталат), електродоактивної речовини (комплекс трамалу з кислотою фосфорновольфрамовою) та стабілізатора потенціалу електрода в зоні утворення твердого контакту – високодисперсного активованого вугілля (таблиця 1).

Таблиця 1

**Співвідношення компонентів мембрани (вагові %):**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| № п/п | Компонент мембрани | Вміст, % вага. |
| 1 | Полівінілхлорид порошкоподібний ПЖ-З-70 | 34,0±2 |
| 2 | Диоктилфталат | 60,0±2 |
| 3 | Електродоактивна речовина | 3,4±1 |
| 4 | Вугілля активоване ОУ-А високодисперсне | 2,0±1 |

Конструктивно ІСЕ на трамал являє собою поліхлорвініловий стрижень діаметром 10 мм і довжиною 120 мм. Всередині цього стрижня висвердлено 2 співосних канали: перший діаметром 3 мм і довжиною 90 мм і другий діаметром 5 мм до кінця стрижня. У канал більшого діаметру запресований графітовий стрижень, на внутрішній торець якого гальванічно нанесений шар міді і припаяний вивід електрода.

Конструкція твердоконтактного ІСЕ на трамал представлена на рис.:

|  |  |
| --- | --- |
|  | Конструкція твердоконтактного ІСЕ на трамал:1 – полівінілхлоридна трубка; 2 – графітовий стрижень;3 *–* шар міді; 4 – мембрана електроду;5 – місце припаювання провідника; 6 – пробка, що загвинчується; 7 – провідник. |

Електродна функція є лінійною в інтервалі концентрацій (8,9±0,5)∙10-5 – (1,0±0,3)∙10-1  з крутизною 57±1 мВ; мінімальна концентрація трамалу гідрохлориду, що можна визначити запропонованим електродом, складає 3,2∙10–5 М.

##### Таблиця 2

**Електродні характеристики мембрани електроду, що пропонується, та мембрани відомого електроду (прототип\*)**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| № п/п | Електродні характеристики | Мембрана електроду, що пропонується | Мембрана електроду відомого складу (прото­типу) |
| 1 | Крутизна електродної функції, мВ | 57,0 ±1 | 52,2 |
| 2 | Мінімум, що визначається, М | 3,2 · 10-5 | 4,5 .10-5 |
| 3 | Час відгуку при 10-3М, с | 10 | 20 |
| 4 | Інтервал рН працездатності електроду | 2,0-9,0 | 4,05-7,25 |
| 5 | Робочий ресурс, тиж. | 23-26 | 4-5 |
| 6 | Інтервал лінійності електродної функції, М | 8,9-10-5-1,0-10-1 | 9,6·10-6 -1,0·10-2 |
| 7 | Дрейф, мВ/доб. | 0,3 - 0,6 | 4,0-6.0 |

\*) за прототип обраний електрод А [Норкаlа Н. еt al], як електрод з найкращими електродними харак­теристиками.

Наведені дані (таблиця 2) свідчать про суттєві переваги мембрани електроду, що пропонується, перед мембраною відомого електроду.

Запропоновані методики іонометричного визначення трамалу в водних розчинах (відносна помилка ±1,38%), лікарських формах (ін’єкційні розчини, таблетки) за допомогою розробленого ІСЕ на препарат. Трамалселективний електрод застосовано для кількісного визначення препарату в витяжках з біологічного матеріалу. Вказано на можливість визначення трамалу за допомогою розробленого ІСЕ в мікроб’ємах (1 мл, 1 крапля) розчинів препарату.

На склад мембрани нового твердоконтактного трамалселективного електрода отримано патент України.

**4. Вивчення умов екстракції трамалу з водних розчинів**

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

Для утворення необхідних значень рН водних розчинів використовували універсальну буферну суміш. Кислотність буферних розчинів контролювали потенціометрично. Використовували розчини з рН від 2,0 до 10,0. Як органічні розчинники (екстрагенти) застосовували найбільш поширені в хіміко-токсикологічному аналізі, свіжоперегнані хлороформ, діетиловий ефір, чотирьоххлористий вуглець і гексан. Проводили одноразову екстракцію трамалу. Об’єм органічного розчинника (екстрагента) дорівнював об’єму водної фази. Визначали кількісний зміст трамалу спектрофотометричним методом при довжині хвилі λ=272 ± 2 нм при товщині шару 10 мм. Розчином порівняння служив 0,1 М розчин соляної кислоти.

Одержані дані свідчать про те, що помітна екстракція трамалу хлороформом і ефіром (ступінь однократної екстракції до 10%) починається при рН 4 – 5, а максимум екстракції (80 – 90%) має місце в інтервалі рН 9 – 10. Екстракція гексаном починається при рН 7 (10%) і досягає максимуму при рН 10 (60%). Отримані результати використовували при розробці методик ізолювання та виділення трамалу з біологічного матеріалу. Ступінь екстракції трамалу залежить як від природи органічного розчинника, так і від рН середовища. Гексан і діетиловий ефір добре підходять для очистки водних витяжок з біологічного матеріалу, а хлороформ – для екстракції трамалу з лужних водних витяжок.

**5. Виділення трамалу з біологічного матеріалу**

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

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

* 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 методи О.О. Васильєвої та В.П. Крамаренко дозволяють ізолювати від 20-25% препарату, а метод Стаса-Отто до 46% з біологічного матеріалу (тканина печінки).

Ми поставили задачу розробити більш ефективну та експресну індивідуальну методику ізолювання трамалу з біологічного матеріалу. Методика заснована на розтиранні подрібненого біологічного матеріалу, що містить препарат, з потрійною кількістю безводного натрію сульфату та наступним елююванням трамалу з одержаної суміші у скляній колонці хлороформом. Хлороформний елюат піддавали додатковому екстракційному очищенню, оскільки наявність великої кількості співекстрактивних речовин заважала подальшому дослідженню витяжок. Розроблена методика ізолювання трамалу за допомогою хлороформу дозволяє виділити 59-62 % препарату з біологічного матеріалу.

Очищені проби витяжок використовували для ідентифікації трамалу, виділеного з біологічного матеріалу за допомогою кольорових і осадових реакцій, методу ТШХ, а також для кількісного визначення препарату екстракційно-фотометричним, УФ-спектрофотометричним та іонометричним методами.

Слід зазначити, що співекстрактивні речовини з біологічного матеріалу часто заважають процесу хроматографування (розтягнуті плями трамалу разом із співекстрактивними речовинами, близькі значення Rf препарату та вищезгаданих речовин).

Тому, для покращення умов хроматографування, пластини з нанесеними зразками вміщували в хроматографічну камеру з хлороформом. При цьому плями трамалу 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 трамалу та співекстрактивних речовин.

Для виявлення трамалу методом УФ-спектроскопії проводили попередню хроматографічну очистку, як зазначено вище. Після цього ретельно елюювали препарат з фрагменту шару сорбенту, який відповідав положенню плями трамалу за допомогою метанолу. Екстракт відфільтровували та випарювали. Сухий залишок розчиняли в 0,1М розчині кислоти хлороводневої. Проводили ідентифікацію трамалу в цьому розчині за допомогою методу УФ-спектроскопії.

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

Методика виділення трамалу з крові заснована на осадженні формених елементів крові 0,1М розчином кислоти хлороводневої (з центрифугуванням), очищенні кислої водної витяжки гексаном або ефіром діетиловим, підлуговуванні витяжки до рН 10 та екстракції препарату за допомогою хлороформу. Методика дозволяє виділити 37% трамалу з крові.

Виділення трамалу з сечі засноване на підкисленні проби з препаратом 0,1М розчином кислоти хлороводневої до рН 2,0-3,0, очищенні кислої водної витяжки гексаном або ефіром діетиловим з подальшим підлуговуванням водної витяжки до рН 10 та екстракції препарату хлороформом. Методика дозволяє виділити 64,6% трамалу з сечі.

Результати вивчення розподілу трамалу в органах отруєних тварин (щурів) через 3 години після внутрішньошлункового введення препарату показали, що трамал в найбільших кількостях знаходиться в шлунку, кишечнику зі вмістом, нирках, селезінці, печінці, мозку, легенях, серці і крові (в порядку зменшення).

Вивчено зберігання трамалу в трупному матеріалі при його гнитті. Встановлено, що метод ізолювання за допомогою хлороформу через
30 діб зберігання біологічного матеріалу (тканина печінки) дозволяє виділити з нього біля 20 % трамалу, а метод В.П.Крамаренко – біля 10 %.

# ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

1. Запропоновано кольорові, осадові і мікрокристалоскопічні реакції, а також методи ТШХ, УФ-спектроскопії, що придатні для виявлення трамалу, який виділено з біологічного матеріалу. Межа виявлення становить 25 мкг препарату в 10 г біологічного матеріалу.
2. Розроблено доступні і чутливі методики кількісного визначення
трамалу:

а) екстракційно-фотометрична, що заснована на утворенні іонного асоціату трамалу з метиловим оранжевим; оптична густина забарвлених розчинів підпорядковується основному закону світлопоглинання в межах концентрацій від 14 до 150 мкг в 12 мл кінцевого об’єму.

б) УФ-спектрофотометрична: оптична густина розчинів підпорядковується основному закону світлопоглинання в межах концентрацій
від 20 до 180 мкг/мл.

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

1. Розроблено склад мембрани і конструкцію твердоконтактного іонселективного електрода на трамал, що перевершує за своїми електроаналітичними характеристиками відомі раніше. Електрод застосований для кількісного визначення препарату в водних розчинах, лікарських формах (ін'єкційні розчини і таблетки). Вперше розроблено методику визначення трамалу за допомогою нового ІСЕ у витяжках із біологічного матеріалу. Вказано на можливість визначення концентрацій препарату в мікрооб’ємах розчинів (1 мл і 1 крапля) за допомогою даного електрода. На склад мембрани ІСЕ на трамал отримано патент України. Запропонований електрод може знайти застосування у фармацевтичному і хіміко-токсикологічному аналізі.
2. Вивчено умови екстракції трамалу з водних розчинів у залежності від рН середовища. Вказано, що максимум екстракції препарату хлороформом має місце при рН 10, а діетиловий ефір та гексан зручно використовувати для екстракційного очищення водних витяжок з біологічного матеріалу від співекстрактивних речовин у кислому середовищі.
3. Вперше проведено порівняльну оцінку виділення трамалу з біологічного матеріалу загальноприйнятими в хіміко-токсикологічному аналізі методами, а також розроблена більш ефективна і експресна, індивідуальна методика ізолювання препарату за допомогою хлороформу. Методика дозволяє виділити 59-62% трамалу з біологічного матеріалу.
4. Вивчено умови виявлення трамалу у витяжках із біологічного матеріалу методами ТШХ й УФ-спектроскопії. Для кількісного визначення препарату у витяжках із біологічного матеріалу застосовані екстракційно-фотометрична, УФ-спектрофотометрична та іонометрична методики.
5. Запропоновано методики виділення трамалу з біологічних рідин організму (крові і сечі), що дозволяють ізолювати до 37% і до 64% препарату відповідно.
6. Встановлено, що найбільша кількість трамалу, через 3 години після внутрішньошлункового введення тваринам, знаходиться в шлунку, кишечнику зі вмістом, нирках, селезінці, печінці, мозку, легенях, серці і крові (в порядку зменшення). Ці органи рекомендовано відправляти на судово-хімічні дослідження біологічного матеріалу на трамал в разі летальних отруєнь препаратом.
7. Вивчено зберігання трамалу в біологічному матеріалі при його гнитті. Встановлено, що за допомогою методики ізолювання хлороформом через 30 діб з тканини печінки, що піддалася гнильним змінам, можна виділити до 20% препарату, а за методом В.П.Крамаренко – 10 %.
8. На основі проведених досліджень запропонована схема хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на трамал.

# Список опублікованих праць за темою дисертації

1. Пат. № 48652 А Україна. G01N27/30. Мембрана твердоконтактного іон-селективного електроду для визначення концентрації іонів трамадолу/ Болотов В.В., Зареченский М.А., Ахмедов Е.Ю., Клименко Л.Ю.- 2001117487. Заявл. 02.11.2001.- Опубл. 15.08.2002. Бюл. №8.

Особисто здобувач провів розробку мембрани трамалселективного електроду та вивчив його для визначення концентрацій іонів трамалу.

1. Болотов В.В., Ахмедов Е.Ю. Екстракційно-фотометричне визначення трамалу // Вісник фармації. – 1998.- №2(18).- С. 116-117.

Особисто здобувач провів розробку екстракційно-фотометричного методу кількісного визначення трамалу та приймав участь у написанні статті.

1. Болотов В.В., Ахмедов Є.Ю., Карпушина С.А. Застосування тонкошарової хроматографії, кольорових реакцій та електрофорезу на папері для виявлення трамалу// Вісник фармації.- 2000.- №1 (21). – С. 16-19.

Особисто здобувач провів розробку методів ідентифікації трамалу за методом ТШХ, кольорових реакцій, електрофорезу на папері та приймав участь у написанні статті.

1. Болотов В.В., Ахмедов Е.Ю. Порівняльна оцінка методів виділення трамалу з біологічного матеріалу // Вісник фармації. – 2001.- №1(25).- С. 16-19.

Особисто здобувач вивчив методи виділення трамалу з біологічного матеріалу та приймав участь у написанні статті.

1. Зареченский М.А., Болотов В.В., Ахмедов Э.Ю. Разработка и исследование твердоконтактного ионоселективного электрода на трамадол // Фізіологічно активні речовини. 2001.- №2(32).- С. 41-43.

Особисто здобувач провів розробку конструкції та складу трамалселективного електроду, вивчив електроаналітичні характеристики запропонованого електроду та приймав участь у написанні статті.

1. Ахмедов Э. Ю., Болотов В. В. Изолирование трамала из биологического материала // Досягнення сучасної фармації та перспективи її розвитку у новому тисячолітті: Матеріали V національного з’їзду фармацевтів України. – Х.: Вид-во УкрФА, 1999. – С. 475.
2. Болотов В. В., Ахмедов Э. Ю. Изучение экстракции трамала органическими растворителями из водных растворов и разработка методики его изолирования из биологического материала // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції “Вчені України – вітчизняній фармації”.–Х.:НФАУ, 2000. – С. 177 – 179.
3. Е.Л.Бондаренко, Э.Ю. Ахмедов, В.В. Болотов, Н.И. Филипчик. Определение трамала методом тонкослойной (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в витяжках из биологического материала // Тези доп. наук. конфер. молодих вчених та студентів.–Х.:НФАУ, 2000.– С.298.
4. Болотов В.В., Зареченский М.А., Ахмедов Е.Ю., Кліменко Л.Ю. Трамадолселективний твердоконтактний електрод в аналізі лікарських форм // Всеукраїнська науково-практична конференція. Х.:НФаУ, 2002.–
С. 101-102.

**Ахмедов Е.Ю.** “Хіміко-токсикологічне дослідження трамалу”. – 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 анальгетичного препарату трамалу.

У роботі представлені результати виявлення трамалу за допомогою кольорових та осадових реакцій, методів ТШХ, УФ- та ІЧ-спектроскопії.

Запропоновані доступні та чутливі екстракційно-фотометрична, УФ-спектрофотометрична методики кількісного визначення препарату в водних розчинах та витяжках з біологічного матеріалу.

Розроблено склад мембрани і конструкцію нового твердоконтактного трамалселективного електрода. Електрод застосовано для визначення концентрацій іонів препарату в водних розчинах, лікарських формах та в витяжках з біологічного матеріалу.

Вивчено виділення трамалу з біологічного матеріалу загальноприйнятими у хіміко-токсикологічному аналізі методами і запропоновано ефективну індивідуальну методику ізолювання трамалу за допомогою хлороформу.

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

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

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

**Ключові слова:** трамал, кольорові та осадові реакції, тонкошарова хроматографія, спектрофотометрія, твердоконтактний іонселективний електрод, екстракція, біологічний матеріал, хіміко-токсикологічний аналіз.

**Ахмедов Э.Ю.** “Химико-токсикологическое исследование трамала”. – 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 анальгетического препарата трамала.

В работе представлены результаты обнаружения трамала с помощью цветных, осадочных и микрокристаллоскопических реакций, методик ТСХ, УФ-, ИК-спектроскопии.

Показано, что высокую чувствительность имеют цветные реакции трамала с реактивами Либермана, Марки, Марки + вода, (предел обнаружения 1 мкг препарата в пробе). Эти реактивы дают с трамалом окрашивание отличное от ряда препаратов, выбранных для сравнения.

Среди осадочных наиболее чувствительными оказались реакции с реактивами Драгендорфа, Зонненшейна, Бертрана и Шейблера (предел обнаружения 0,5 мкг в пробе, предельное разведение 1:100000).

С каплей 1% раствора соли Рейнеке в капельной пробе раствора трамала выпадают розовые кристаллы, имеющие характерную форму (ежеобразные).

Для обнаружения и разделения трамала и ряда препаратов, которые могут назначаться вместе с ним, использовали хроматографические пластины “ВЕТШХ”, “Sorbfil”, “Армсорб”, “Silufol UV-254”, “Merck” и девять систем растворителей. Предел обнаружения в данных условиях 0,1 мкг в пробе, значение Rf от 0,20 до 0,80.

Предложена простая и надежная методика экстракционно-фотометрического определения трамала в водных растворах и вытяжках из биологического материала, основанный на образовании ионного ассоциата препарата с метиловым оранжевым. Метод позволяет обнаружить от 14 до 150 мкг трамала в 12 мл конечного объема с относительной ошибкой ±2,90%. Также предложен УФ-спектрофотометрическая методика количественного определения трамала в водных растворах и вытяжках из биологического материала. Метод позволяет обнаружить от 20 до 180 мкг/мл препарата с относительной ошибкой 1,05 %.

Разработаны конструкция и состав мембраны нового твердоконтактного ионоселективного электрода (ИСЭ) на трамал, превосходящего по своим аналитическим характеристикам известные зарубежные аналоги.

Ионоселективный электрод на трамал применен для количественного определения препарата в водных растворах, лекарственных формах и извлечениях из биологического материала.

Получен патент Украины на состав мембраны предложенного ИСЭ на трамал.

Исследованы условия экстракции трамала из водных растворов хлороформом, диэтиловым эфиром, гексаном и четыреххлористым углеродом в интервале рН от 2,0 до 10,0. Показано, что максимум экстракции препарата хлороформом имеет место при рН 10 (степень экстракции около 90%), а диэтиловый эфир и гексан удобно использовать для очистки кислых водных вытяжек, содержащих трамал.

Изучены условия изолирования трамала из биологического материала с помощью общепринятых в химико-токсикологическом анализе методов А.А. Васильевой, В.Ф. Крамаренко, Стаса-Отто. Установлено, что методы Васильевой и Крамаренко позволяют изолировать 20-25% препарата из биологического материала, а метод Стаса-Отто – около 45-48%.

Разработана эффективная частная методика изолирования трамала с помощью хлороформа, который позволяет выделить 59-62% препарата из биологического материала.

Предложены методики изолирования трамала из биологических жидкостей организма (крови и мочи), которые позволяют выделить 37% препарата из крови, и 64% из мочи.

Изучено распределение трамала в органах отравленных животных. Установлено, что через 3 ч после внутрижелудочного введения трамала крысам, наибольшее количество препарата содержится в желудке, кишечнике с содержимым, почках, селезенке, печени, мозге, легких, крови, сердце (в порядке уменьшения).

Исследована сохраняемость трамала в биологическом материале при его гнилостном разложении. Показано, что с помощью методики изолирования хлороформом после 30 суток хранения (при температуре 5°С) из биологического материала (ткань печени) можно выделить около 20% трамала, а по методу В.Ф.Крамаренко удается выделить около 10 % препарата.

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

**Ключевые слова:** трамал, цветные и осадочные реакции, тонкослойная хроматография, спектрофотометрия, твердоконтактный ионоселективный электрод, экстракция, биологический материал, химико-токсикологический анализ.

**Achmedov E.Y.** «The chemico-toxicological investigation of Tramal». -Manuscript.

The thesis for Ph.D. in Pharmacy on speciality 15.00.02 - Pharmaceutical chemistry and Pharmacognosy. - National University of Pharmacy, Kharkov, 2003.

The thesis is devoted chemico-toxicological analysis of analgetic preparation Tramale.

The results of color and sedimentary reactions, thin-layer chromatographic, UV-, IR-spectroscopic methods are represented in the thesis.

Sensitive methods of Tramale quantitative determination in pharmaceutical preparations and extracts from biological material - UV-spectroscopic and extractive photometry are offered.

Optimum membrane structure and design of new solid-contact ion-selective electrode on Tramale. The electrode is applied for definition of concentration of ions of a preparation in the medicinal forms and in extracts from a biological material.

The Tramale extraction from biological material with generally accepted in chemico-toxicological analysis methods has been studied. The effective individual method of Tramale isolation by chloroform is carried out.

Isolation techniques of Tramale from bode biological liquids are developed. Tramale distribution in bodies of the poisoned animals and it preservation in a biological material is investigated.

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

**Key words:** Tramale, color and sedimentary reactions, thin-layer chromatography, spectrophotometry, solid-contact ion-selective electrode, extraction, biological material, chemico-toxicological analysis.

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