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

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**

**ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**імені ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО**

**Крамаренко Сергій Юрійович**

УДК 615.276.07:547.789:547.821:615.9

**ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ**

**МЕЛОКСИКАМУ ТА ПІРОКСИКАМУ**

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

##### Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата фармацевтичних наук

##### Львів - 2008

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі токсикологічної та аналітичної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького Міністерства охорони здоров'я України.

**Науковий керівник:** кандидат фармацевтичних наук, доцент

 **Галькевич Ірина Йосипівна**

##  Львівський національний медичний університет

імені Данила Галицького,

завідувач кафедри токсикологічної та аналітичної хімії.

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

**Новіков Володимир Павлович**

Національний університет "Львівська політехніка",
завідувач кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології;

доктор фармацевтичних наук, професор

**Бондар Володимир Степанович**

Національний фармацевтичний університет,

завідувач кафедри токсикологічної хімії

Захист відбудеться " " 2008 року о 10оо год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.600.02 у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького за адресою: 79010, м. Львів, вул. Пекарська, 69.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (79000, м. Львів, вул. Січових Стрільців, 6).

 Автореферат розісланий " " 2008 р.

Вчений секретар

 спеціалізованої вченої ради Гасюк Г.Д.

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

Актуальність теми***.* На фармацевтичному ринку України постійно зростає асортимент імпортних та вітчизняних препаратів групи нестероїдних протизапальних засобів (НПЗЗ). У багатьох випадках НПЗЗ є причиною ускладнень фармакотерапії і представляють великий інтерес в хіміко-токсикологічному відношенні. Особливо це важливо для осіб похилого віку та пацієнтів, що страждають на захворювання печінки та нирок, у зв’язку із зменшенням та сповільненням метаболізму даних лікарських засобів.**

**У хіміко-токсикологічному відношенні практично не вивчені одні із широко вживаних НПЗЗ мелоксикам та піроксикам. В літературі відсутні відомості щодо методів ізолювання цих сполук з біологічного матеріалу, методів їх ідентифікації та кількісного визначення. Відсутні дані про оптимальні умови екстракції мелоксикаму та піроксикаму з водних розчинів, їх розподіл в органах та біологічних рідинах організму, термінів зберігання речовин в біологічному матеріалі.**

Зв`язок роботи з науковими програмами, планами, темами. **Дисертаційна робота виконана згідно з планом проблемної комісії «Фармація» МОЗ України і є фрагментом комплексної наукової дослідної роботи Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (№ державної реєстрації 0101U009227, шифр теми 1Н 10.06.0001.01).**

Мета та завдання дослідження*.* **Метою даної роботи була розробка схеми хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на присутність мелоксикаму та піроксикаму, що включає пошук ефективних та експресних методів ізолювання цих сполук із біологічного матеріалу, методик їх ідентифікації та кількісного визначення, придатних для цілей хіміко-токсикологічного аналізу.**

**Для досягнення цієї мети були поставлені наступні завдання:**

* **запропонувати чутливі та достатньо селективні реакції для ідентифікації мелоксикаму та піроксикаму, виділених з біологічного матеріалу;**
* **розробити чутливі методики виявлення мелоксикаму та піроксикаму методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту (ХТШС) з використанням схем аналізу, що застосовують при скринінг-виявленні отрут, а також методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ);**
* розробити умови ідентифікації мелоксикаму та піроксикаму, виділених із біологічного матеріалу методами УФ-, ІЧ- та ПМР-спектроскопії, що дозволяють відрізнити їх від структурних аналогів та препаратів, які можуть використовуватися при лікуванні разом із даними лікарськими засобами;
* **розробити чутливі методики ідентифікації мелоксикаму і піроксикаму, виділених із біологічного матеріалу, методом капілярного електрофорезу;**
* **розробити методики кількісного визначення мелоксикаму та піроксикаму з використанням спектроскопічних, фотометричних, хроматографічних та електрофоретичних методів аналізу;**
* **вивчити вплив природи органічних розчинників, рН середовища та присутності електролітів на екстракцію мелоксикаму та піроксикаму з водних розчинів;**
* запропонувати умови очистки мелоксикаму та піроксикаму від домішок речовин білкової природи, жирів та інших сполук, що містяться у витяжках з біологічного матеріалу, методами екстракції та хроматографії в тонкому шарі сорбенту;
* **порівняти ефективність загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання органічних речовин основного та кислого характеру (О.О. Васильєвої, В.П. Крамаренка, Стаса-Отто) і розробити ефективні та експресні методики ізолювання мелоксикаму та піроксикаму з біологічного матеріалу, а також запропонувати методики виділення цих препаратів з біологічних рідин організму (крові і сечі);**
* **вивчити розподіл мелоксикаму та піроксикаму в органах тварин, отруєних даними препаратами;**
* **дослідити терміни зберігання мелоксикаму та піроксикаму в біологічному матеріалі при його гнитті.**

***Об’єкт дослідження.* Нестероїдні протизапальні засоби групи оксикаму – мелоксикам та піроксикам.**

***Предмет дослідження.* Хіміко-токсикологічний аналіз мелоксикаму та піроксикаму.**

***Методи дослідження.* Для ідентифікації мелоксикаму та піроксикаму у водних розчинах, витяжках із біологічного матеріалу використовували мікрокристалоскопічні реакції, методи УФ- та ІЧ-спектроскопії, ПМР-спектроскопії, хроматографії в тонких шарах сорбенту (ХТШС), високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), мас-хроматографії, метод капілярного електрофорезу. Для кількісного визначення досліджуваних препаратів використовували УФ-спектрофотометричний, екстракційно-фотометричний методи, метод капілярного електрофорезу та ВЕРХ. Для ізолювання препаратів з біологічного матеріалу використовували загальноприйняті методи О.О. Васильєвої, В.П. Крамаренка, Стаса-Отто, а також методику ізолювання препаратів сумішшю ацетонітрил-30% ацетатна кислота (10:30).**

Наукова новизна одержаних результатів. **Вперше виконано систематичні дослідження мелоксикаму та піроксикаму в хіміко-токсикологічному відношенні.**

Вперше запропоновано мікрокристалоскопічні реакції для виявлення мелоксикаму та піроксикаму, виділених із біологічного матеріалу. Розроблені умови ідентифікації мелоксикаму та піроксикаму у витяжках методами ХТШС та ВЕРХ, мас-хроматографії, методом капілярного електрофорезу, УФ-, ІЧ- та ПМР-спектроскопії.

Вперше встановлено хроматографічну поведінку мелоксикаму, піроксикаму та продуктів їх метаболізму в умовах загальної схеми скринінгу органічних отрут методом ХТШС та запропоновано доповнення до цієї схеми з метою виявлення мелоксикаму та піроксикаму. Встановлено умови ідентифікації мелоксикаму та піроксикаму і продуктів їх метаболізму методом капілярного електрофорезу та методом ВЕРХ.

**Розроблено нові методики кількісного визначення мелоксикаму та піроксикаму, придатні для цілей хіміко-токсикологічного, криміналістичного та фармацевтичного аналізу (УФ-спектрофотометрії, екстракційно фотометричні, капілярного електрофорезу та ВЕРХ).**

**Встановлено оптимальні умови екстракції мелоксикаму та піроксикаму з водних розчинів органічними розчинниками, та вивчено вплив електролітів на екстракцію цих препаратів.**

**Вперше проведено порівняльне вивчення ефективності загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання органічних отрут основного та кислого характеру стосовно мелоксикаму та піроксикаму. Розроблено ефективні та експресні індивідуальні методики ізолювання мелоксикаму та піроксикаму з біологічного матеріалу за допомогою суміші ацетонітрил-30% ацетатна кислота та запропоновано методики виділення їх з біологічних рідин організму (крові і сечі).**

**Встановлено розподіл мелоксикаму та піроксикаму в органах отруєних тварин, та рекомендовано оптимальні об`єкти для проведення хіміко-токсикологічного аналізу. Встановлено терміни зберігання досліджуваних препаратів в біологічному матеріалі при гнитті.**

Практичне значення одержаних результатів. **На підставі комплексу проведених досліджень розроблено схему хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на присутність мелоксикаму та піроксикаму. Розроблено методики виявлення та кількісного визначення мелоксикаму та піроксикаму, виділених з біологічного матеріалу, які можна рекомендувати для впровадження в практичну роботу відділень судово-медичної експертизи для вирішення питань про отруєння даними препаратами, в клінічних лабораторіях з метою визначення їх в біологічних рідинах, а також у криміналістичному аналізі.**

**Фрагменти роботи впроваджено в науковий та навчально-методичний процеси Національного фармацевтичного університету, Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, Запорізького державного медичного університету та в практичну роботу Львівського обласного бюро судово-медичної експертизи (акти від 19.11.2007, 20.10.2007, 15.11.2007, 5.11.2007 відповідно).**

Особистий внесок здобувача.**Разом з науковим керівником визначено мету та задачі досліджень, розроблено методичні підходи, згідно з якими підібрано методи виконання експериментальної частини дисертаційної роботи.**

**Особисто проведено патентно-інформаційний пошук, експериментальні дослідження, статистичну обробку, аналіз та систематизацію одержаних результатів, сформовано висновки роботи, які виносяться на захист.**

**Співавтором наукових праць є науковий керівник, з яким проводились спільні фізико-хімічні дослідження, а також аналіз та узагальнення результатів власних експериментальних досліджень.**

Апробація результатів дослідження. **Основні результати дисертаційної роботи викладені та обговорені на ІІ Міжнародній науково-практичній конференції «Створення, виробництво, стандартизація, фармакологічні дослідження лікарських засобів та біологічно активних добавок» (Харків, 2006), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної науки та практики» (Запоріжжя, 2006), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Досягнення в галузі аналітичної, судово-медичної, клінічної токсикології та наркології» (Запоріжжя, 2007).**

Публікації.**За темою дисертації опубліковано 6 наукових робіт, з них 3 статті у провідних наукових фахових виданнях та 3 тез доповідей.**

**Структура дисертації.**Дисертаційна робота складається з вступу, огляду літератури, 4-х розділів експериментальних досліджень, загальних висновків, списку літератури та додатків. Загальний обсяг дисертації складає 175 сторінок. Робота ілюстрована 32 таблицями, 24 рисунками. Перелік використаної літератури містить 161 джерелo.

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

У ***вступі*** обґрунтовано актуальність теми дисертаційної роботи, сформульовано мету та задачі досліджень, показано наукову новизну та практичну цінність отриманих результатів.

У ***першому розділі*** проведено огляд літературних даних, що стосуються класифікації нестероїдних протизапальних засобів, наведено фізико-хімічні властивості мелоксикаму та піроксикаму, їх фармакологічні властивості та токсичний вплив на організм. Проведено аналіз існуючих методів ідентифікації та кількісного визначення мелоксикаму і піроксикаму, методів виділення похідних оксикаму з біологічного матеріалу та біологічних рідин.

**У *другому розділі*** наведено експериментальні дані, що стосуються розробки методів ідентифікації мелоксикаму та піроксикаму.

Ідентифікацію мелоксикаму та піроксикаму проводили хімічними (мікрокристалоскопічні реакції) та фізико-хімічними методами (ХТШС, ВЕРХ, УФ-, ІЧ-, ПМР- та мас-спектроскопія, капілярний зонний електрофорез).

При пошуку якісних реакцій на досліджувані речовини встановлено, що мелоксикам та піроксикам утворюють характерні кристалічні осади з наступними реактивами: розчином хлорцинкйоду; розчином паладію (ІІ) хлориду; розчинами кобальту ацетату і калію гідроксидом в метанолі; розчином феруму (ІІІ) хлориду в метанолі; а також ідентифікували мелоксикам та піроксикам за формою кристалів кислотних форм досліджуваних сполук, одержаних при осадженні.

Нами проводилось вивчення умов виявлення мелоксикаму та піроксикаму методом ХТШС в залежності від природи розчинників та сорбенту (пластинки “Sorbfil”, “Silufol” i “Merck”). При цьому порівнювали швидкість, репродуктивність та чутливість методик, визначали кореляцію між системами розчиників. Визначали придатність хроматографічних систем, які в міжнародній практиці судово-хімічних та клінічних лабораторій найчастіше застосовуються для виявлення речовин, що проявляють кислотний та основний характер. Вибір проводили серед систем, що використовуються в стандартних аналітичних тестах на лікарські речовини, а також серед систем, що використовуються в науково-дослідних лабораторіях Великобританії та США, та систем відомих із літературних оглядів методів загального скринінгу лікарських засобів. Серед таких систем нами вибрані кращі рухомі фази: етилацетат, хлороформ-метанол (9:1), етилацетат-метанол-25% аміак (17:2:1) і хлороформ-ацетон (10:10). В цих системах вивчали роздільну здатність мелоксикаму і піроксикаму у суміші з трамадолом, німесилом, натрію диклофенаком (вольтареном), димедролом, які можуть екстрагувались одночасно з досліджуваними речовинами з біологічних об’єктів аналізу.

Вивчено відношення мелоксикаму і піроксикаму до проявників, що застосовуються в загальному скрінінгу отрут кислотного і основного характеру методом ХТШС: 5% розчин калію перманганату; 10% розчин феруму (ІІІ) хлориду з наступною обробкою пластинок 1% розчином антипірину; 10% розчин купруму (ІІ) сульфату з наступною обробкою пластинок 10% розчином аміаку або 0,3 М розчином калію йодиду; 10% розчином кобальту хлориду, після обробки яким обприскували пластинки 5% спиртовим розчином α-нітрозо-β-нафтолу; реактивом Драгендорфа та проводили опромінення пластинок УФ-променями.

Запропоновано хроматографічні тести для підтвердження наявності мелоксикаму та піроксикаму у наступних системах розчинників: метанол- ацетатна кислота (20:1); хлороформ-етилацетат (10:10); ацетон-ацетатна кислота (10:5); етилацетат-хлороформ-ацетатна кислота (10:10:5) з використанням пластинок “Silufol”, “Sorbfil” та “Merсk”.

Рекомендовано для виявлення мелоксикаму та піроксикаму і продуктів їх метаболізму в практичній роботі застосовувати опромінення пластинок УФ-променями та обробку їх 10% розчином купруму (ІІ) сульфату з наступною обробкою 0,3 М розчином калію йодиду.

Межа виявлення мелоксикаму методом ТШХС при використанні УФ-променів становить 2 мкг, а піроксикаму 4 мкг у внесеній пробі, а при обробці пластинок розчинами купруму (ІІ) сульфату та 0,3 М калію йодиду становить 1 мкг мелоксикаму та 1,5 мкг піроксикаму на всіх типах сорбентів.

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| (І) | (ІІ) |

Рис. 1. УФ-спектри мелоксикаму (І) та піроксикаму (ІІ)
в різних розчинниках

Для ідентифікації мелоксикаму та піроксикаму досліджено їх УФ-спектри поглинання в різних розчинниках (етанолі, хлороформі, діоксані, бензені та 0,1 М розчині натрію гідроксиду). Встановлено, що УФ-спектр мелоксикаму (рис. 1) в етанолі характеризується двома смугами з максимумами поглинання при 270-275 нм і 365 нм, в хлороформі спостерігається одна смуга поглинання з максимумом при 340-345 нм, в бензені – смуга з максимумом при 345 нм, в діоксані спостерігається спад оптичної густини, а в 0,1 М. розчині натрію гідроксиду – дві смуги поглинання з максимумами при 269-272 нм і 362-364 нм. УФ-спектр піроксикаму (рис. 1) в етанолі характеризується трьома смугами поглинання з максимумами при 258-261 нм, 289-292 нм і 359-365 нм, в хлороформі – двома смугами поглинання з максимумами при 249-251 нм, 330-331 нм і плече при 253-254 нм, в бензені – двома смугами поглинання при 280-281 нм і 328-330 нм, в діоксані – трьома смугами поглинання при довжинах хвиль 244-246 нм, 269-271 нм і 328-331 нм, в 0,1 М гідроксиді натрію максимуми смуг поглинання знаходяться при 255-256 нм, 285-287 нм і при 351-353 нм.

Для підтвердження структури мелоксикаму та піроксикаму були зняті ПМР-спектри. Для досліджень використовували прилад “Varian VXR-400”, як розчинник використовували дейтерований диметилсульфоксид, стандарт – тетраметилсилан. При цих дослідженнях встановлено, що для ПМР-спектру мелоксикаму, як в чистому вигляді, так і виділеного із біологічного матеріалу, спостерігається два трьохпротонні синглети при 2,33 м.ч. та 2,87 м.ч., які відповідають метильним групам при тіазольному та 1,2-тіазиновому циклах відповідно. Протон тіазольного циклу характерний синглетом при 7,33 м.ч. Ароматичні протони проявляються мультиплетом, який утворився внаслідок накладання двох триплетів та дублету, при 7,78-7,90 м.ч. дублету 8,03 м.ч. (J = 7,6 Гц). Сигнали енольного та амідного протонів не спостерігаються внаслідок дейтерообміну з розчинником, про що свідчить дещо розширений сигнал води.

ПМР-спектр піроксикаму є подібним. Піридиновий та арильний фрагменти характерні субспектром з триплету при 7,28 м.ч. (піридиновий), мультиплетом при 7,80-7,90 м.ч. та 7,95-7,99 м.ч. і двома дублетами при 8,05 м.ч. (J = 3,2 Гц, арильний фрагмент) та 8,41 м.ч. (J = 3,2 Гц, піридиновий фрагмент). За кривою інтегральної інтенсивності ароматична ділянка відповідає 8 протонам. Як і у випадку мелоксикаму енольний та амідний протони не спостерігаються за рахунок дейтерообміну.

Для підтвердження ідентичності досліджуваних сполук знято їх ІЧ-спектри в таблетках з калію бромідом. При цьому для ІЧ-спектру мелоксикаму найхарактернішими є смуги з максимумами при 2368 см-1, 2354 см-1, 1456 см-1, 1536 см-1, 1551 см-1 і 1631 см-1, а для піроксикаму – при 2364 см-1, 2340 см-1, 1644 см-1, 1532 см-1, 1436 см-1 і 1356 см-1 (рис. 2). Дані смуги спостерігаються також у мелоксикаму та піроксикаму, виділених з органів отруєних тварин.

|  |  |
| --- | --- |
| Meloxicam | Piroxicam |

Рис. 2. ІЧ-спектри мелоксикаму та піроксикаму
в таблетках із калію бромідом

Розроблено умови ідентифікації мелоксикаму та піроксикаму методом капілярного зонного електрофорезу. Для розробки умов вивчено вплив рН та природи електроліту на характер електрофореграм та роздільну здатність капілярів. Дослідження проводили на приладі для капілярного електрофорезу Model 3D CE (Agilent) з кварцевим капіляром довжиною 40 см та діаметром внутрішнього каналу 50 мкм. Як електроліт нами використовувались буферні розчини, які складалися з 0,1 М розчину фосфатної кислоти та триетиламіну, взятих у різних співвідношеннях. Детектування проводилось при довжині хвилі 210 нм з використанням УФ-детектора. Об’єм введеної проби становив 8 нл, а напруга – 25 кВ. Виявлення досліджуваних препаратів проводили за абсолютним і відносним часом електроміграції і методом добавок. Встановлено, що в інтервалі рН 5,0-5,5 спостерігається найкраша роздільна здатність (час електроміграції мелоксикаму – 4,15 хв., а піроксикаму – 2,9 хв.) (рис. 3.).



Рис. 3. Електрофореграма мелоксикаму та піроксикаму при рН 5,5.

Запропоновано умови виявлення мелоксикаму і піроксикаму методом ВЕРХ (рис. 4). Дослідження проводили на рідинному хроматографі "Аgi1еnt 1100", для розділення застосовували колонку Ес1ірsе С18, довжиною 150 мм, діаметром 4,6 мм, заповнену сорбентом з розміром частинок 5 мкм. При аналізі піроксикаму користувалися мобільною фазою ацетонітрил-фосфатний буферний розчин з рН 3 (40:60), а при аналізі мелоксикаму мобільна фаза складалась з двох розчинів: 0,1% розчину калію дигідрогенортофосфату з рН 6,0 та метанолу, взятих у співвідношенні 60:40. Швидкість рухомої фази становила 1 мл/хв, температура термостату колонки 40°С. Детекцію сигналу проводили з допомогою УФ-детектора при довжині хвилі 230 нм для піроксикаму і при 260 нм для мелоксикаму, об'єм проб становив 20 мкл. Ідентифікацію проводили за абсолютним часом утримування. Межа виявлення мелоксикаму становила 0,5 мкг/мл, а піроксикаму – 1 мкг/мл у введеній пробі.

|  |  |
| --- | --- |
| r2 | r3 |
| (І) | (ІІ) |

Рис. 4. Хроматограми мелоксикаму (І) та піроксикаму (ІІ)

Результати розробки методів кількісного визначення мелоксикаму та піроксикаму наведено ***третьому розділі***.Для кількісного визначення мелоксикаму і піроксикаму розроблено екстракційно-фотометричну методику, що грунтується на утворенні досліджуваними речовинами іонних асоціатів з метиленовим синім, що екстрагуються хлороформом при рН 8. Оптичну густину забарвлених хлороформових розчинів вимірювали за допомогою фотоколориметра КФК–2МП, в кюветі з товщиною шару 20 мм, використовуючи світлофільтр №8 (λ еф.= 597 ± 10 нм). Методику можна використовувати при визначенні мелоксикаму від 5 до 60 мкг в пробі, а при визначенні піроксикаму - від 5 до 80 мкг в пробі. Відносна похибка визначення мелоксикаму за калібрувальним графіком становить 1,43%, а піроксикаму – 1,98%. При використанні рівняння регресії відносна похибка кількісного визначення мелоксикаму в розчинах дорівнює 2,1%, а піроксикаму – 1,35%.

Для кількісного визначення мелоксикаму та піроксикаму методом УФ-спектрофотометрії розраховано питомі та молярні коефіцієнти світлопоглинання в 96% етанолі, хлороформі та бензені (табл. 1). Вибір даних розчинників зумовлений тим, що мелоксикам та піроксикам практично нерозчинні у воді та розчинах мінеральних кислот і при вибраних довжинах хвиль домішки, що містяться у витяжках з біологічного матеріалу, практично не впливають на результат кількісного визначення

*Таблиця 1*

**Значення питомих і молярних коефіцієнтів світлопоглинання мелоксикаму і піроксикаму**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Препарат | Розчинник | λmax, нм | Питомий показник поглинання() | Молярний показник поглинання(ε) | Межі концент-рацій, мкг/мл |
| Мелоксикам | ЕтанолХлороформБензен | 364344345 | 418,5 ± 1,7554,2 ± 1,9536,6 ± 3,3 | 14689,3 ± 58,119452,4 ± 66,918834,7 ± 110,6 | 1–251–202–30 |
| Піроксикам | ЕтанолХлороформБензен | 360330330 | 356,5 ± 2,4535,5 ± 2,1446,3 ± 3,4 | 11814,7 ± 68,517747,2 ± 61,314788,9 ± 111,3 | 2–301–201–20 |

Для кількісного визначення мелоксикаму та піроксикаму у витяжках з біологічного матеріалу рекомендовано проводити їх УФ-спектрофотометричне визначення в хлороформових розчинах, при цьому відносна похибка для мелоксикаму становить 2,21 %, а піроксикаму – 1,47 %.

Розроблено методики кількісного визначення мелоксикаму та піроксикаму методом капілярного зонного електрофорезу при умовах, які застосовувались при їх ідентифікації. Кількісне визначення проводили методом внутрішнього стандарту (за площею піків). Внутрішнім стандартом для мелоксикаму був метанольний розчин піроксикаму (10 мкг/мл), а внутрішнім стандартом для піроксикаму – метанольний розчин мелоксикаму (10 мкг/мл). Для введення використовувалась гідродинамічна система вводу проби з часом вводу 3 сек, що становило 8 нл досліджуваного розчину, напруга струму 25 кВ та робочий буферний розчин з рН 5,5. Кількісний вміст препаратів визначали за градуювальними графіками. Встановлено, що лінійна залежність для мелоксикаму та піроксикаму знаходилася в межах концентрацій від 0,5 до 20 мкг/мл для обох речовин. Відносна похибка кількісного визначення мелоксикаму методом капілярного зонного електрофорезу становить 2,16%, а піроксикаму – 2,62%.

Кількісне визначення мелоксикаму і піроксикаму методом ВЕРХ проводили у тих самих умовах, що і їх ідентифікацію. Визначення вмісту кожного із препаратів проводили методом абсолютної калібровки. Мелоксикам визначався в межах концентрацій від 0,5 мкг/мл до 20 мкг/мл, а піроксикам від 1 до 20 мкг/мл. Відносна похибка кількісного визначення мелоксикаму методом ВЕРХ складає 1,4%, а піроксикаму – 0,58%.

***Четвертий розділ*** містить результати досліджень умов екстракції мелоксикаму та піроксикаму з водних розчинів.

Для розробки оптимальних умов ізолювання мелоксикаму та піроксикаму з біологічного матеріалу, вивчено екстракцію препаратів з водних розчинів деякими органічними розчинниками залежно від рН середовища. Також вивчався вплив електролітів (5% і 25% розчини натрію хлориду та 5%, 25% і 50% розчини амонію сульфату) на ступінь екстракції. Необхідне значення рН створювали за допомогою універсальної буферної суміші Бріттона-Робінсона з рН від 2,0 до 12,0.

Максимальні кількості мелоксикаму екстрагуються при значеннях рН 2-4 хлороформом (97,6-99,4%) та бензеном (94,4-96,2%), при рН 2 діетиловим етером та толуеном екстрагується до 94,4% та 95,3% відповідно, до 75,3% мелоксикаму екстрагується 1,2-дихлоретаном при рН 2, гексаном при цьому значенні рН відповідно екстрагується до 44,9% препарату. В лужному середовищі препарат практично не ектрагується усіма розчинниками.

Піроксикам найкраще екстрагується з кислих водних розчинів хлороформом при рН 2-4 (99,2-99,6%), при рН 2-3 бензеном (98,8-99,1%) та діетиловим етером (83,8-88,6%). Менші кількості піроксикаму екстрагуються при рН 2-3 1,2-дихлоретаном (62,4-68,7%) і н-гексаном (68,7-69,2%). Найменше значення ступеня однократної екстракції толуеном (до 39,8%).

Додавання електролітів зумовлює збільшення ступеня екстракції мелоксикаму та піроксикаму при рН 3, рН 6 та рН 8 усіма розчинниками.

Оптимальним електролітом є розчин амонію сульфату з концентраціями 25% і 50%, який при рН 6 дозволяє екстрагувати 98,8-99,4% мелоксикаму та 99,4-99,7% піроксикаму, при рН 3 в присутності цих електролітів екстрагується 99,4-99,7% мелоксикаму і піроксикаму.

***П’ятий розділ*** присвячено розробці методів виділення мелоксикаму і піроксикаму із біологічного матеріалу, методам виявлення та кількісного визначення досліджуваних сполук у витяжках, вивченню розподілу мелоксикаму та піроксикаму в органах отруєних тварин та встановленню термінів зберігання в біологічному матеріалі при його гнитті.

Нами вивчена можливість ізолювання мелоксикаму та піроксикаму з біологічного матеріалу методами, загальноприйнятими у хіміко-токсикологічному аналізі: В.П. Крамаренка, О.О. Васильєвої, Стаса-Отто. Проведені експериментальні дослідження показали, що методом Стаса-Отто виділяються незначні кількості, як мелоксикаму (11-13%), так і піроксикаму (10-11%). Дещо вищі кількості мелоксикаму та піроксикаму виділяються за методом В.П. Крамаренка (28-31% і 27-31% відповідно), методом О.О. Васильєвої можна виділити 29-34% мелоксикаму і 28-34% піроксикаму.

Враховуючи недостатньо високу ефективність цих методів, нами запропоновано методику ізолювання, що грунтується на використанні в якості ізолюючої рідини суміші ацетонітрилу з 30% розчином ацетатної кислоти, взятих у співвідношенні за об’ємом 10:30. При цьому встановлено, що для повнішого виділення мелоксикаму та піроксикаму достатнє трьохкратне настоювання біологічного матеріалу з ізолюючою рідиною по 1 годині, а для очистки витяжки рекомендовано додавати кристалічний амонію сульфат до досягнення 25% концентрації електроліту. Екстракцію досліджуваних сполук проводили з кислих витяжок, застосовуючи хлороформ. Дана методика дозволяє виділити до 57% мелоксикаму і до 64% піроксикаму з печінки.

Нами розроблено методики виділення мелоксикаму та піроксикаму з біологічних рідини організму (крові і сечі). Методика виділення мелоксикаму і піроксикаму з крові ґрунтується на ізолюванні сумішшю ацетонітрил-30% ацетатна кислота (10:30) при рН 2-3. Для осадження домішок використовують насичений розчин амонію сульфату. Екстракцію препаратів проводять хлороформом при рН 3. Даним методом із крові виділяється до 71% мелоксикаму і до 76% піроксикаму.

Методика виділення досліджуваних препаратів із сечі полягає у підкисленні проб 20% розчином сульфатної кислоти до рН 2-3 та проведенні трикратної екстракції хлороформом. У випадку утворення емульсій їх руйнують центрифугуванням (5 хв при 5000 об./хв). За допомогою цієї методики виділяється до 92% мелоксикаму та до 94% піроксикаму.

*Виявлення мелоксикаму та піроксикаму у витяжках з біологічного матеріалу.*Для виявлення мелоксикаму та піроксикаму у витяжках із біологічного матеріалу та біологічних рідин використовували мікрокристалоскопічні реакції та методи ХТШС, УФ-спектрофотометрії, ВЕРХ, капілярного електрофорезу. Методи ІЧ-, ПМР- та хромато-мас-спектроскопії використовувалися для виявлення досліджуваних сполук у витяжках після додаткової очистки методом ХТШС.

При ідентифікації методом ХТШС у системах розчинників хлороформ-етилацетат (10:10), метанол-ацетатна кислота (20:1), метанол-етилацетат (10:10) мелоксикам та піроксикам розділяються з основними продуктами їх метаболізму.

При опроміненні пластинок УФ-світлом плями мелоксикаму давали зеленувату флюоресценцію, а основний метаболіт – жовту флюоресценцію. Піроксикам і його основний метаболіт при опроміненні пластинок УФ-променями на пластинках проявлялися голубою флюоресценцією.

При проявці розчином купруму сульфату з наступною обробкою пластинок розчином калію йодиду плями досліджуваних сполук та їх метаболіти були забарвлені в коричневий колір.

УФ-спектри хлороформових витяжок, одержаних при виділенні з модельних проб біологічного матеріалу з мелоксикамом та піроксикамом за положенням смуг поглинання були ідентичні УФ-спектрам хлороформових розчинів чистих препаратів.

Проводили ідентифікацію мелоксикаму та піроксикаму методами ІЧ-, ПМР- та хромато-мас-спектроскопії. При цьому рекомендовано застосовувати додаткову очистку хлороформових витяжок із застосуванням ХТШС на силікагелі “Silpearl”.

Пластинки готували з розрахунку 0,05 г силікагелю на 1 см2 пластинки і закріплювали медичним гіпсом в кількості 5% від маси силікагелю; пластинки очищували 1 раз в системі етилацетат-метанол (10:10), після чого проводили хроматографування витяжок в цій же системі. З відповідних зон елюювали мелоксикам і піроксикам метанолом і одержані розчини застосовували для ідентифікації методами ІЧ-, ПМР- та хромато-мас-спектроскопії.

При використанні методу хромато-масспектроскопії дослідження проводились на хромато-масспектрометрі Agilent 1100 LC/MSD SL на колонці Rapid Resolution HT Cartige 4.6×30 nm, 1.8 micron, Zorbx SB-C18 з мас-селективним детектором G1956B (рис. 5). При цьому молекулярні маси сполук, виділених із органів отруєних тварин є близькими до молекулярних мас мелоксикаму та піроксикаму.



(І)



(ІІ)

Рис. 5. Мас-спектри мелоксикаму (І) та піроксикаму (ІІ),
виділених із органів отруєних тварин.

|  |  |
| --- | --- |
| r4 | r5 |
| І | ІІ |

Рис. 6. Електрофореграма мелоксикаму (І) та піроксикаму (ІІ), виділених з органів отруєних тварин

У витяжках з біологічного матеріалу виявляли мелоксикам та піроксикам методом капілярного електрофорезу. Ідентифікацію досліджуваних препаратів у пробах з органів отруєних тварин проводили методом внутрішнього стандарту та методом добавок. При цьому на електрофореграмах виписувалися і основні метаболіти, як для мелоксикаму, так і для піроксикаму (рис. 6).

Аналогічні результати одержано при дослідженні витяжок методом ВЕРХ. Після виділення із органів отруєних тварин поряд з піками основних компонентів на хроматограмах виписувалися основні продукти метаболізму. Час виходу мелоксикаму – 6,58 хв, продукту метаболізму 6,11 хв, час виходу піроксикаму – 10,0 хв, продукту метаболізму – 5,2 хв.

*Кількісне визначення мелоксикаму та піроксикаму у витяжках з біологічного матеріалу.*Для кількісного визначення досліджуваних препаратів у витяжках застосовували методи екстракційної фотометрії та капілярного електрофорезу.

При екстракційно-фотоколориметричному методі визначали вміст мелоксикаму та піроксикаму за калібрувальними графіками або за рівняннями регресії, у методі капілярного електрофорезу користувались калібрувальними графіками. Встановлено, що при дослідженні витяжок з модельних проб печінки, сечі та крові одержані співставимі результати кількісного визначення мелоксикаму і піроксикаму двома методами аналізу (табл. 2).

*Таблиця 2*

**Результати виділення мелоксикаму і піроксикаму
із модельних зразків біологічного матеріалу**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Об’єкт аналізу | Речовина | Визначено речовини (в %) методом |
| екстракційної фотоколориметрії | капілярного електрофорезу |
| 20 г печінки | мелоксикампіроксикам | 54,2-57,458,4-64,7 | 52,7-56,756,8-63,6 |
| 20 мл крові | мелоксикампіроксикам | 67,4-72,673,1-78,2 | 65,8-71,271,8-76,3 |
| 10 мл сечі | мелоксикампіроксикам | 89,3-92,889,8-96,2 | 87,3-92,288,6-93,8 |

*Вивчення розподілу мелоксикаму та піроксикаму в біологічному матеріалі.*Нами вивчено розподіл мелоксикаму та піроксикаму в органах отруєних тварин (щурів) через 24 год після внутрішньошлункового введення.

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| а | б |

Рис. 7 Розподіл мелоксикаму (а) та піроксикаму (б) в органах отруєних тварин:

 – екстракційно-фотоколориметричний метод визначення;

 –визначення методом капілярного зонного електрофорезу

Проведені дослідження показали, що найбільші кількості мелоксикаму накопичуються в серці, нирках, сечі, крові та легенях. Піроксикам в максимальних кількостях знаходиться в легенях, крові, сечі, печінці та нирках (рис. 7).

Саме ці органи необхідно направляти на хіміко-токсикологічне дослідження при летальних отруєннях мелоксикамом і піроксикамом

*Зберігання мелоксикаму та піроксикаму в біологічному матеріалі при його гнитті.*Вивчено терміни зберігання мелоксикаму та піроксикаму в трупному матеріалі при його гнитті. Встановлено, що через 90 днів зберігання біологічного матеріалу (тканина печінки) з допомогою суміші ацетонітрил-30% ацетатна кислота (10:30) можна виділити до 8,6 % мелоксикаму та 16,9 % піроксикаму. Через 100 днів в біологічному матеріалі досліджувані сполуки не виявляються.

# ВИСНОВКИ

1. Для ідентифікації мелоксикаму та піроксикаму у розчинах та витяжках з біологічного матеріалу запропоновано мікрокристалоскопічні реакції, методи ХТШС, ПМР-, УФ-, ІЧ- та хромато-мас-спектроскопії, ВЕРХ, капілярного зонного електрофорезу.

2. Розроблено чутливі та репродуктивні методики кількісного визначення мелоксикаму та піроксикаму у водних розчинах та у витяжках з біологічного матеріалу:

а) екстракційно-фотоколориметричну на основі реакції препаратів з метиленовим синім при рН 8. Межі визначення становлять від 5 до 60 мкг мелоксикаму і від 5 до 80 мкг піроксикаму в 15 мл кінцевого об’єму, відносна похибка методу становить 1,43% для мелоксикаму і 1,98% для піроксикаму;

б) УФ-спектрофотометричну у хлороформному розчині. При цьому відносна похибка визначення для мелоксикаму 2,21%, а піроксикаму – 1,47%;

в) капілярного зонного електрофорезу, що дозволяє визначати від 0,5 до 20 мкг/мл мелоксикаму та піроксикаму. Відносна похибка визначення мелоксикаму цим методом 2,16%, а піроксикаму – 2,62%;

г) ВЕРХ; межі визначення мелоксикаму від 0,5 до 20 мкг/мл, відносна похибка 1,4%; межі визначення піроксикаму від 1 до 20 мкг/мл, відносна похибка 0,58%.

3. Вивчено умови екстракції мелоксикаму та піроксикаму з водних розчинів в залежності від природи органічного розчинника і рН середовища. Встановлено, що досліджувані препарати добре екстрагуються з кислого середовища при рН 2-4, а оптимальним розчинником для їх екстракції є хлороформ (ступінь одноразової екстракції 99,4% мелоксикаму і 99,6% піроксикаму).

4. Досліджено вплив розчинів електролітів (5% та 25% натрію хлориду і 5%, 25%, 50% амонію сульфату) на ступінь екстракції мелоксикаму та піроксикаму при значеннях рН, що відповідають максимуму (рН 3) та мінімуму екстракції (рН 6 та рН 8). Встановлено, що оптимальним електролітом є амонію сульфат (25% і 50%), який рекомендовано вносити у витяжки для осадження домішок.

5. Вперше проведена порівняльна оцінка методів виділення мелоксикаму і піроксикаму із біологічного матеріалу загальноприйнятими в хіміко-токсикологічному аналізі методами, і встановлено, що даними методами виділяються незначні кількості досліджуваних препаратів.

6. Розроблено ефективні методики виділення мелоксикаму і піроксикаму з біологічного матеріалу та крові, що ґрунтуються на ізолюванні цих препаратів сумішшю 30% розчину ацетатної кислоти з ацетонітрилом, взятих у співвідношенні за об’ємом 30:10, а для очистки витяжок запропоновано використовувати висолювання домішок кристалічним амонію сульфатом. Розробленою методикою можна виділити до 57% мелоксикаму і до 64% піроксикаму з біологічного матеріалу (печінка). З крові цим методом виділяється до 72% мелоксикаму і до 78% піроксикаму.

7. Розроблено методику ізолювання досліджуваних препаратів із сечі, яка дозволяє ізолювати до 92% мелоксикаму і до 96% піроксикаму.

8. Вивчено розподіл мелоксикаму і піроксикаму в органах отруєних тварин при пероральному введенні препаратів. Встановлено, що найбільші кількості мелоксикаму та піроксикаму знаходяться в шлунку із вмістом, нирках, печінці, легенях, крові та сечі. Ці органи рекомендовано відправляти на судово-хімічне дослідження біологічного матеріалу у випадку летальних отруєнь цими препаратами.

9. Вивчено зберігання мелоксикаму та піроксикаму в біологічному матеріалі при його гнитті. Встановлено, що за допомогою методу ізолювання сумішшю ацетонітрил-30% ацетатна кислота через 90 діб з тканини печінки, що піддалася гнильним змінам можна виділити до 8,6 % мелоксикаму та 16,9 % піроксикаму.

10. На основі проведених досліджень запропоновано схему хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на мелоксикам та піроксикам.

**Список опублікованих праць за темою дисертації**

1. Крамаренко С.Ю. Ідентифікація та кількісне визначення мелоксикаму в лікарських формах / Крамаренко С.Ю. // Фармацевтичний журнал. – 2007. – № 1. – С. 67-71.
2. Крамаренко С.Ю. Умови екстракції мелоксикаму та піроксикаму з водних розчинів органічними розчинниками / Крамаренко С.Ю., Галькевич І.Й // Фармацевтичний журнал. – 2007. – № 6. – С. 69-74.

Особистий внесок: дослідження впливу рН, природи органічних розчинників та електролітів (натрію хлориду та амонію сульфату) на ступінь екстракції мелоксикаму та піроксикаму; обговорення одержаних результатів спільно з науковим керівником к.фарм.н., доц. Галькевич І.Й., написання та оформлення статті.

1. Крамаренко С.Ю. Порівняльна оцінка методів виділення піроксикаму з біологічних об’єктів / Крамаренко С.Ю., Галькевич І.Й // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики: Зб. наук. ст. – Вип. XX – Запоріжжя, 2007. – С.103-108.

Особистий внесок: встановлення придатності класичних методів виділення піроксикаму з біологічного матеріалу, розробка оптимальних умов виділення піроксикаму з печінки, сечі та крові; обговорення одержаних результатів спільно з науковим керівником к.фарм.н., доц. Галькевич І.Й., написання та оформлення статті.

1. Крамаренко С.Ю. Визначення мелоксикаму в лікарських формах методом УФ-спектроскопії / Крамаренко С.Ю., Галькевич І.Й // Тези доповіді Всеукраїнської науково-практичної конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної науки та практики». – Запоріжжя, 2006. – С.248-249.

Особистий внесок: дослідження впливу розчинників на УФ-спектр поглинання мелоксикаму, розроблено умови кількісного визначення мелоксикаму в таблетках; обговорення одержаних результатів спільно з науковим керівником к.фарм.н., доц. Галькевич І.Й., написання та оформлення публікації.

1. Крамаренко С.Ю. Ідентифікація піроксикаму методом УФ-спектроскопії / Крамаренко С.Ю., Галькевич І.Й // Тези доповіді ІІ Міжнародної науково-практичної конференції «Створення, виробництво, стандартизація, фармакологічні дослідження лікарських засобів та біологічно активних добавок». – Харків, 2006. – С.91-92.

Особистий внесок: дослідження впливу природи розчинників на УФ-спектри поглинання піроксикаму; обговорення одержаних результатів спільно з науковим керівником к.фарм.н., доц. Галькевич І.Й., написання та оформлення статті.

1. Крамаренко С.Ю. Виявлення піроксикаму за допомогою мікрокристалоскопічних реакцій / Крамаренко С.Ю., Галькевич І.Й // Тези доповіді Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Досягнення в галузі аналітичної, судово-медичної, клінічної токсикології та наркології». –Запоріжжя, 2007. – С.294-295.

Особистий внесок: встановлення оптимальних умов виявлення піроксикаму мікрокристалоскопічними реакціями; обговорення одержаних результатів спільно з науковим керівником к.фарм.н., доц. Галькевич І.Й., написання та оформлення публікації.

АНОТАЦІЯ

**Крамаренко С.Ю. Хіміко-токсикологічне дослідження мелоксикаму та піроксикаму**. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за фахом 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія. –Міністерство охорони здоров’я України Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, 2008.

Дисертаційна робота присвячена хіміко-токсикологічному дослідженню препаратів групи нестероїдних протизапальних засобів – мелоксикаму та піроксикаму.

В роботі представлені результати виявлення мелоксикаму та піроксикаму за допомогою мікрокристалоскопічних реакцій, методами УФ-, ІЧ-, ПМР-, хромато-мас-спектроскопії, капілярного електрофорезу, ВЕРХ та ХТШС.

Для кількісного визначення запропоновано чутливі та експресні методики: екстракційної фотомерії, УФ-спектрофотометрії, ВЕРХ та капілярного зонного електрофорезу.

Вивчено умови екстракції мелоксикаму та піроксикаму з водних розчинів хлороформом, бензеном, толуеном, діетиловим етером, 1,2-дихлоретаном і н-гексаном у залежності від рН середовища і наявності електролітів. Вивчено виділення мелоксикаму та піроксикаму з біологічного матеріалу загальноприйнятими в хіміко-токсикологічному аналізі методами.

Розроблено ефективний метод ізолювання мелоксикаму та піроксикаму з біологічного матеріалу (органи трупів) за допомогою суміші 30% розчин ацетатної кислоти-ацетонітрил (30:10).

Розроблено методики ізолювання мелоксикаму і піроксикаму з біологічних рідин (кров, сеча).

Вивчено розподіл мелоксикаму та піроксикаму в органах отруєних ними тварин і їх зберігання в біологічному матеріалі при його гнитті. На основі проведених досліджень запропонована схема хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на присутність мелоксикаму та піроксикаму.

**Ключові слова:** мелоксикам, піроксикам, похідні оксикаму, мікрокристалоскопічні реакції, хроматографія в тонких шарах сорбенту, спектроскопія, хромато-мас-спектроскопія, капілярний електрофорез, високоефективна рідинна хроматографія, екстракція, виділення, біологічний матеріал, біологічні рідини, хіміко-токсикологічний аналіз.

АННОТАЦИЯ

**Крамаренко С.Ю. Химико-токсикологическое исследование мелоксикама и пироксикама.** – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02. – фармацевтическая химия и фармакогнозия. – Министерство здравоохранения Украины Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, Львов, 2008.

Диссертационная работа посвящена химико-токсикологическому исследованию препаратов группы нестероидных противовоспалительных средств – мелоксикама и пироксикама.

В работе представлены результаты исследования мелоксикама и пироксикама с помощью микрокристаллоскопических реакций, методами УФ-, ИК-, ПМР-, хромато-мас-спектроскопии, капиллярного электрофореза, ВЭЖХ и хроматографии в тонких слоях сорбента (ХТСС).

Для идентификации мелоксикама и пироксикама предложены микрокристаллоскопические реакции с растворами: хлорцинкйода; палладия (ІІ) хлорида; кобальта ацетата и калия гидроксида в метаноле; железа (III) хлорида в метаноле и реакция образования кристаллов кислотных форм исследуемых соединений.

Разработаны условия обнаружения мелоксикама и пироксикама методом ХТСС. В качестве тонких слоев использованы пластинки “Merck”, “Sorbfil”, “Silufol”. Изучено влияние состава жидкой подвижной фазы на хроматографическое разделение мелоксикама и пироксикама в смеси с другими препаратами, отношение к ряду реактивов-проявителей. Для подтверждающих тестов на наличие данных препаратов предложено 4 системы растворителей, а в качестве наилучших проявителей рекомендовано использовать УФ-излучение и 10% раствор меди (ІІ) сульфата с последующей обработкой пластинок 0,3 М раствором калия йодида.

Изучены УФ-спектры мелоксикама и пироксикама в ряде растворителей: 96% этаноле, хлороформе, бензоле, диоксане и 0,1 М растворе натрия гидроксида, которые рекомендовано использовать для идентификации данных соединений, выделенных из биологического материала.

ИК-спектры мелоксикама (в таблетках с KBr) характеризуются наличием полос поглощения при см-1: 2368, 2354, 1456, 1536, 1551 і 1631, а пироксикама при 2340, 1644, 1532, 1436 і 1356. По данным полосам проводили идентификацию исследуемых соединений, выделенных из биологического материала.

Предложены условия обнаружения мелоксикама и пироксикама в вытяжках из биологического материала с помощью ПМР- и масс-спектров.

Разработаны условия идентификации исследуемых веществ методом ВЭЖХ. В качестве мобильной фазы использовали 0,1% раствор калия дигидрофосфата с рН 6,0 и метанол в соотношении 60:40 (при идентификации мелоксикама) и ацетонитрил-фосфатный буферный раствор с рН 3 (40:60) (при идентификации пироксикама).

Предложены условия идентификации данных соединений в смеси методом капиллярного зонного электрофореза. Оптимальные результаты разделения получены при рН 5,0-5,5 с использованием буферного раствора, который состоял из триэтиламина и фосфатной кислоты.

Для количественного определения предложены экспрессные и чувствительные методики: экстракционной фотометрии, УФ-спектрофотометрии, ВЭЖХ и капиллярного зонного электрофореза.

Экстракционно-фотометрический метод количественного определения основан на реакции ионного ассоциата с метиленовым синим и экстракции хлороформом при рН 8. Оптическая плотность окрашенных растворов подчиняется основному закону светопоглощения от 5 до 60 мкг мелоксикама и от 5 до 80 мкг пироксикама в пробе. Относительная ошибка определения составляет 1,43% (для мелоксикама) и 1,98% (для пироксикама) при определении по калибровочному графику и 2,10% (для мелоксикама) и 1,34% (для пироксикама) при определении по уравнению регрессии.

Для определения исследуемых соединений методом УФ-спектрофотометрии рассчитаны удельные и молярные коэффициенты поглощения в хлороформе. Данная методика дает возможность определять мелоксикам (при λ = 344 нм) и пироксикам (при λ=330 нм) в пределах концентраций от 1 до 20 мкг/мл. Относительная ошибка метода составляет 2,91% (при определении мелоксикама) и 1,47% (для пироксикама).

Количественное определение мелоксикама и пироксикама методом ВЭЖХ проводили с использованием абсолютной калибровки. Линейный диапазон для мелоксикама составляет 0,5-20 мкг, для пироксикама 1-20 мкг. Относительная ошибка метода составляет 0,47% для мелоксикама и 0,58% для пироксикама.

Определение исследуемых веществ капиллярным зонным электрофорезом проводилось с использованием метода внутреннего стандарта. Внутренним стандартом для мелоксикама был пироксикам, а для пироксикама – мелоксикам. Этим методом исследуемые вещества можно определять в пределах концентраций от 0,5 до 20 мкг в 1 мл пробы. Относительная ошибка составляет 2,16% (для мелоксикама) и 2,62% (для пироксикама).

Изучены условия экстракции мелоксикама и пироксикама из водных растворов хлороформом, бензолом, толуолом, диэтиловым эфиром, 1,2-дихлорэтаном и н-гексаном в зависимости от рН среды и наличия электролитов. Установлено, что максимальные количества исследуемых веществ экстрагируются при рН 2-3 хлороформом, а электролиты увеличивают степень их экстракции.

Изучено выделение мелоксикама и пироксикама из биологического материала общепринятыми в химико-токсикологическом анализе методами.

Разработан эффективный метод изолирования мелоксикама и пироксикама из биологического материала (органы трупов и крови) с помощью смеси 30% раствора ацетатной кислоты-ацетонитрила (30:10) и осаждении примесей аммония сульфатом.

Разработаны оптимальные условия выделения мелоксикама и пироксикама из мочи. Для чего ее подкисляли 20% раствором серной кислоты до рН 2-3 и проводили экстракцию исследуемых соединений хлороформом.

Изучено распределение мелоксикама и пироксикама в органах отравленных ими животных и их сохранение в биологическом материале при его гниении. На основании проведенных исследований предложена схема химико-токсикологического анализа биологического материала на присутствие мелоксикама и пироксикама.

**Ключевые слова:** мелоксикам, пироксикам, производные оксикама, микрокристаллоскопические реакции, хроматография в тонких слоях сорбента, спектроскопия, хромато-мас-спектроскопия, капиллярный электрофорез, высокоэффективная жидкостная хроматография, экстракция, выделение, биологический материал, биологические жидкости, химико-токсикологический анализ.

SUMMARY

**Kramarenko S.U. Chemical-toxicological investigation of the meloxcam and the piroxicam.** – Manuscript.

The dissertation for obtaining a scientific degree of candidate of pharmaceutical sciences in the speciality 15.00.02 – pharmaceutical chemistry and pharmacognosy. Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ministry of Public Health of Ukraine, Lviv, 2008.

The dissertation is dedicated to chemico-toxicological investigation of non-steroid antiinflammatory preparations – meloxicam and piroxicam.

In this work the results of investigation of meloxicam and piroxicam preparations, with the help of microcrystalline reactions, by the methods of UV-, IR-, PMR-, chromato-mas-spectroscopy, capillarity electrophoresis, HPLC and TLC are represented.

For quantativ determination of the meloxicam and piroxicam are proposed sensitive and express methods extraction-photometric, UV-spectrofotometric, HPLC and capillarity zone electrophoresis.

The dependence of meloxicam and piroxicam extraction of the clorophorm, benzene, toluene, diethyl ether, 1,2-dicloretan and n-hecsan dependence on pH value and presence of electrolytes were studied. Isolations of meloxicam and piroxicam from biological material with generally accepted in chemico-toxicological analysis methods was studied.

The effective method of meloxicam and piroxicam isolation from biological material (post mortal organs) with the help of mixture of 30% solution of acetate acid-acetonitril (30:10) was developed.

The effective method of meloxicam and piroxicam isolation from biologically active liquids (blood, urine) was developed.

The distribution of meloxicam and piroxicam in organs intoxicated animal and their preservation in biological material, during its decay – was studied. On the basis of carried out investigation – the scheme of chemical-toxicological analysis of biological material, to identify the meloxicam and piroxicam presence – was proposed.

**Key words:** meloxicam, piroxicam, oxcam derivate, microcrystalline reactions, chromatography, Thin lower chromatography, spectroscopy, chromato-mas-spectroscopy, capillarity electrophoresis, hight perfomase liquid chromatography, extraction, isolation, biological material, biological liquors, chemical-toxicological analysis.

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