

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

МИРОШНИЧЕНКО ЮЛІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 615.218.2:615.9:543.062.061:543.544:543.42

**РОЗРОБКА МЕТОДІВ
ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНОГО
АНАЛІЗУ КЕТОТИФЕНУ**

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

АВТОРЕФЕРАТ

**дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук**

ХАРКІВ – 2014

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано на кафедрі аналітичної хімії Національного фармацевтичного університету Міністерства охорони здоров'я України.

Науковий керівник: кандидат фармацевтичних наук, доцент
КЛИМЕНКО Ліна Юріївна
Національний фармацевтичний університет,
доцент кафедри аналітичної хімії

Офіційні опоненти: доктор фармацевтичних наук, професор
ПЕТЮНІН Геннадій Павлович
Харківська медична академія післядипломної освіти, завідуючий кафедрою клінічної біохімії, судово-медичної токсикології та фармації

доктор фармацевтичних наук, професор
ВАСЮК Світлана Олександрівна
Запорізький державний медичний університет,
завідуюча кафедрою аналітичної хімії

Захист відбудеться «15» травня 2014 р. о 12⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті за адресою:
61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4).

Автореферат розіслано «14» квітня 2014 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
д. фарм. н., проф.

В. А. Георгіянц

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. В сучасній фармакотерапії алергічних захворювань традиційно значне місце посідають препарати, що блокують дію медіаторів запалення, – антигістамінні препарати, проте в останні десятиріччя все більшої популярності набувають препарати, що попереджують вивільнення цих медіаторів, так звані стабілізатори мембран тучних клітин. До цієї групи антиалергічних засобів належить кетотифен – препарат, в першу чергу, є імунопрофілактичним і рекомендується до тривалого застосування, що, безумовно, сприяє накопиченню побічних ефектів і, як наслідок, призводить до розвитку низки токсичних явищ.

Потрібно зазначити, що кетотифен також блокує H_1 -рецептори до гістаміну і тому, як засіб з антимедіаторною активністю, може потенціювати дію інших антиалергічних засобів, а також препаратів, дію яких пов'язано з блокуванням рецепторів, серед яких є і речовини з нейротропною активністю. Все це призводить до збільшення потенціалу виникнення отруень кетотифеном.

В літературних оглядах наявна систематизована інформація щодо випадків гострих та летальних передозувань кетотифену – діапазон токсичних та летальних доз коливається в широкому інтервалі, а клінічна картина токсичних явищ не завжди знаходиться в прямій залежності від прийнятої кількості препарату, тому особливого значення і актуальності набувають саме результати хімічного аналізу кетотифену в біологічних об'єктах, що джує актуальність та необхідність розробки методик його хіміко-токсикологічного дослідження.

Слід зазначити, що методики хіміко-токсикологічного і судово-токсикологічного дослідження тканин органів трупа і біологічних рідин на наявність кетотифену практично не розроблено. Аналіз доступних фахових літературних джерел показує, що є лише окремі публікації недостатньо інформативного характеру. Систематичного дослідження кетотифену з метою розробки методик для судово-токсикологічного дослідження біологічного матеріалу не проводилося.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано згідно з планом науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету та проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України за темою: «Хімічний синтез і аналіз біологічно-активних речовин, створення лікарських засобів синтетичного походження» (номер державної реєстрації 0103U000475).

Мета і задачі дослідження. Метою дисертаційної роботи є створення схеми хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на кетотифен, яка містить методики його ізолювання із біологічного матеріалу, очистки отриманих витягів, а також ідентифікації та кількісного визначення, що придатні для цілей хіміко-токсикологічного аналізу.

Для досягнення мети було поставлено такі задачі:

- запропонувати чутливі кольорові реакції для ідентифікації кетотифену, виділеного з біологічного матеріалу;
- розробити чутливі методики ідентифікації кетотифену за допомогою методу хроматографії в тонких шарах сорбенту, в тому числі з використанням схем аналізу, що застосовують в загальноприйнятому ТШХ-скринінгу органічних речовин кислотного та основного характеру, а також методом високоефективної рідинної хроматографії;
- розробити твердоконтактний іонселективний електрод на кетотифен, що дозволить застосувати метод іонометрії для якісного та кількісного аналізу даного препарату в водних розчинах та витягах із об'єктів біологічного походження;
- розробити методики кількісного визначення кетотифену, придатні для цілей хіміко-токсикологічного аналізу, з використанням оптичних, хроматографічних та електрохімічних методів аналізу;
- вивчити вплив природи органічних розчинників та рН середовища на екстракцію кетотифену з водних розчинів;
- порівняти ефективність загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання органічних речовин основного характеру – О. О. Васильєвої, В. П. Крамаренка, Стаса–Отто, О. В. Удалова (модифікація методу Стаса–Отто) щодо кетотифену та розробити ефективну та експресну окрему методику ізолювання кетотифену із біологічного матеріалу, а також запропонувати методики виділення кетотифену із біологічних рідин організму (крові і сечі);
- дослідити можливість застосування процедури кислотного гідролізу з метою ізолювання із сечі кетотифену, що знаходиться у вигляді N-глюкуроніду;
- запропонувати умови очистки кетотифену від співекстрактивних речовин у витягах із біологічного матеріалу за допомогою методів екстракції та ТШХ;
- встановити термін зберігання кетотифену в трупному матеріалі при його гнильному розкладенні.

Об'єкт дослідження. Методи хіміко-токсикологічного аналізу кетотифену.

Предмет дослідження. Методики ізолювання кетотифену із об'єктів біологічного походження, методики його виявлення та кількісного визначення у модельних розчинах та витягах із біологічного матеріалу, методики очистки отриманих витягів із біологічного матеріалу, схема хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на кетотифен.

Методи дослідження. Для ідентифікації кетотифену у водних розчинах та витягах із біологічного матеріалу використовували методи ТШХ, ВЕРХ та УФ-спектроскопії, кольорові реакції; для кількісного визначення кетотифену – УФ-спектрофотометричний, екстракційно-фотометричний, ВЕРХ та іонометричний методи. Для ізолювання кетотифену із біологічного матеріалу ви-

користували загальноприйняті методи О. О. Васильєвої, В. П. Крамаренка, Стаса–Отто, модифікацію останнього за О. В. Удаловим, а також методику ізолювання шляхом комбінованої статичної та динамічної екстракції попередньо висушеного біологічного матеріалу органічними розчинниками.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше виконано комплексне хіміко-токсикологічне дослідження кетотифену.

Вперше встановлено хроматографічну поведінку кетотифену в умовах загальної схеми ТШХ-скринінгу органічних речовин та запропоновано доповнення до цієї схеми з метою виявлення кетотифену. Встановлено основні хроматографічні параметри кетотифену при дослідженні методом ВЕРХ в системі «ВЕРХ-аналізатора», що застосовують в хіміко-токсикологічному та криміналістичному аналізі в країнах СНД.

Вперше розроблено пластифіковану мембрану твердоконтактного кетотифенселективного електрода на основі полівінілхлориду, що містить як електродоактивну речовину іонний асоціат катіону кетотифену з аніоном фосфомолібденової кислоти. Запропонований електрод застосовано для виявлення та кількісного визначення кетотифену у витягах із біологічного матеріалу. За результатами досліджень подано заявку на одержання патенту України на винахід.

Розроблено нові УФ-спектрофотометричну, екстракційно-фотометричну та ВЕРХ-методику кількісного визначення кетотифену, придатні для цілей хіміко-токсикологічного та криміналістичного аналізу.

Встановлено, що оптимальні умови екстракції кетотифену з водних розчинів забезпечують діетиловий етер та хлороформ в лужному середовищі. Вперше порівняно ефективність загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання органічних речовин основного характеру щодо кетотифену. Розроблено ефективну та експресну окрему методику ізолювання кетотифену шляхом комбінованої статичної та динамічної екстракції попередньо висушеного біологічного матеріалу хлороформом та запропоновано методику виділення кетотифену з біологічних рідин організму (крові, сечі).

Запропоновано методику ізолювання кетотифену із сечі після попереднього кислотного гідролізу, що може бути використана для ізолювання із біологічної рідини кетотифену, отриманого внаслідок гідролізу його основного метаболіту – кетотифен N-глюкуроніду.

Вперше встановлено термін зберігання – 6 місяців – кетотифену в твердому біологічному матеріалі при його гнильному розкладенні.

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

Практичне значення одержаних результатів. На підставі комплексу проведених досліджень розроблено схему хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на кетотифен, що знайшла своє відображення в підготовлених методичних рекомендаціях «Хіміко-токсикологічний аналіз біологічного матеріалу на кетотифен», які рекомендовано застосовувати в практичній роботі

відділень судово-медичної токсикології для вирішення питань щодо отруєння кетотифеном, в клінічних лабораторіях з метою визначення кетотифену в біологічних рідинах, а також у криміналістичному аналізі. Запропонований електрод може бути використаний для виявлення та кількісного визначення кетотифену у лікарських засобах та витягах із біологічного матеріалу.

Розроблені методики хіміко-токсикологічного дослідження кетотифену впроваджено в науково-педагогічний процес кафедри клінічної біохімії, судово-медичної токсикології та фармації Харківської медичної академії післядипломної освіти, кафедри токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету, кафедри неорганічної та токсикологічної хімії Запорізького державного медичного університету, кафедри токсикологічної та аналітичної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, кафедри хімії фармацевтичного факультету Івано-Франківського національного медичного університету, кафедри фармацевтичної хімії та фармакогнозії ДЗ «Луганський державний медичний університет», кафедри хімії Донецького національного медичного університету ім. М. Горького, в практику роботи відділень судово-медичної токсикології Черкаського, Житомирського, Херсонського та Харківського обласного бюро судово-медичної експертизи.

Особистий внесок здобувача. Разом з науковим керівником визначено мету та завдання досліджень, розроблено методичні підходи, згідно з якими підібрано методи виконання експериментальної частини дисертації. Особисто проведено патентно-інформаційний пошук, експериментальні дослідження, статистичну обробку, аналіз та систематизацію отриманих результатів, сформульовано висновки роботи. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертантом наведено результати власних експериментальних досліджень, взято участь в аналізі та узагальненні отриманих даних, у написанні статей.

Дослідження методом вискоефективної рідинної хроматографії проведено на базі НВФ «Аналітика» (м. Харків, директор – В. Ф. Першин).

Апробація результатів дисертації. Основні результати та положення дисертаційної роботи викладено і обговорено на VII Національному з'їзді фармацевтів України «Фармація України. Погляд у майбутнє» (м. Харків, 2010), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Діагностичні та організаційні питання щодо створення системи забезпечення якості клінічних лабораторних досліджень» (м. Київ, 2010), науково-практичній конференції завідувачів відділеннями судово-медичної токсикології «Організаційні та практичні питання судово-медичної токсикології» (м. Дніпропетровськ, 2011), III з'їзді токсикологів України «Сучасні проблеми токсикології. Безпека їжі та середовища життєдіяльності людини» (м. Київ, 2011), річній сесії Наукової Ради з проблеми «Аналітична хімія» НАН України (с. Гурзуф, 2012), науково-практичній конференції «Актуальні питання експериментальної, клінічної медицини та фармації» (м. Луганськ, 2012), XX Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Actual questions of

development of new drugs» (м. Харків, 2013), III Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Теоретичні та практичні підходи до вирішення сучасних питань фармацевтичної та медичної науки» (м. Луганськ, 2013), I науково-практичній конференції з міжнародною участю «Розбудова системи контролю якості клінічних лабораторних досліджень в Україні» (м. Київ, 2013).

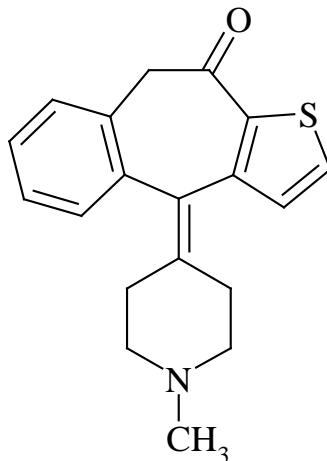
Публікації. Матеріали дисертаційної роботи опубліковано у 10 наукових роботах, серед яких 5 статей у наукових фахових виданнях (1 – за кордоном) та 5 тез доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, трьох розділів експериментальних досліджень, висновків, 13 додатків (56 стор.) та списку використаних джерел. Дисертацію викладено на 233 сторінках друкованого тексту (обсяг основного тексту 150 сторінок), ілюстровано 80 таблицями, 14 рисунками, 4 схемами. Перелік використаної літератури містить 182 джерела, серед яких 80 – іноземні.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Загальна характеристика кетотифену: фізико-хімічні, фармакологічні та токсикологічні властивості; методи його якісного та кількісного аналізу (огляд літератури)

Кетотифен належить до антигістамінних лікарських засобів групи стабілізаторів мембран тучних клітин; за хімічною структурою являє собою 4-(1-метилпіперидин-4-іліден)-4,9-дигідро-10Н-бензо[4,5]циклогепта[1,2-b]тіофен-10-он; в лікарських формах присутній у вигляді гідрофумарату.



В огляді літератури висвітлено основні фізико-хімічні, фармакологічні та токсикологічні властивості кетотифену; особливу увагу приділено зафіксованим випадкам отруєнь препаратом, даним щодо концентрації його в органах та тканинах людини в умовах гострих та летальних отруєнь. Детально розглянуто існуючі на сьогодні методики виявлення та кількісного визначення кетотифену у біологічних об'єктах та показано їх недостатність для забезпечення надійного визначення препарату.

Розробка методик виявлення кетотифену

Ідентифікацію кетотифену проводили хімічними (кольорові реакції) та фізико-хімічними методами (ТШХ, ВЕРХ, УФ-спектроскопія).

При пошуку реакцій ідентифікації для кетотифену було вивчено його взаємодію з деякими реагентами, що широко застосовуються в аналізі алкалоїдів та інших органічних речовин, що містять в своїй структурі третинний атом азоту. Реакції проводили на хроматографічних пластинах – такий спосіб виконання якісних реакцій дозволяє підвищити їх чутливість.

Результати проведених реакцій наведено в табл. 1.

Згідно з даними літературних джерел плями кетотифену на хроматографічних пластинах при обробці реактивом Маркі забарвлюються в бузково-фіолетовий колір, проте в експерименті не спостерігалось появи будь-якого забарвлення. Червоне забарвлення плям з'являлося тільки після нагрівання пластин за температури 80 – 90°C протягом 30 хв на столику для нагрівання пластин. При цьому результати погано відтворювалися. У зв'язку з цим було модифіковано склад реактиву Маркі та запропоновано методику обробки плям кетотифену цим реактивом – як результат отримано червоні плями, що мають жовтогаряче світіння в УФ-світлі та поява яких добре відтворюється.

Найбільш специфічними і чутливими для виявлення кетотифену є реакція утворення 2,4-динітрофенілгідразону кетотифену (реакція на $=C=O$ групу), реакція утворення азобарвника кетотифену (реакція на $-CH_2-C=O$ групу з діазотованою сульфаніловою кислотою в лужному середовищі), а також реакція з модифікованим реактивом Маркі при нагріванні.

Всі запропоновані реактиви використовували для проявлення плям кетотифену на пластинах при дослідженні його методом ТШХ.

Методом тонкошарової хроматографії з використанням п'яти типів тонких шарів вивчено хроматографічну поведінку кетотифену в присутності інших антигістамінних засобів (димедрол, доксиламін, лоратадин, дезлоратадин, прометазин).

Дослідження проводили в 14 системах розчинників, серед яких 10 систем рекомендовано як стандартні Міжнародним комітетом з систематичного токсикологічного аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів та 4 системи, що застосовують в загальному ТШХ-скринінгу органічних речовин кислотного та основного характеру.

Вивчено відношення кетотифену до проявників, що застосовуються в загальному ТШХ-скринінгу органічних речовин кислотного та основного характеру.

Результати проявлення плям кетотифену наведено в табл. 2.

Таким чином, при виконанні неспрямованого аналізу кетотифену виявляється лише послідовною обробкою пластин реактивом Драгендорфа та кислотою сульфатною та 50% розчином кислоти сульфатної в етанолі.

**Результати реакцій ідентифікації кетотифену
з деякими загальноприйнятими реагентами**

Реагент	Забарвлення / чутливість, мкг
Реактив Вагнера	коричневе / 0,1
Реактив Бушарда	коричневе / 0,1
Реактив Драгендорфа	червоно-коричневе / 0,1
Реактив Драгендорфа, модифікований за Муньє	червоно-коричневе / 0,1
Реактив Маркі	—
Реактив Лібермана	—
Реактив Ердмана	—
Реактив Шейблера	—
Реактив ФПН	—
Реактив Фреде	червоно-фіолетове / 0,5
Реактив Манделіна	червоно-фіолетове / 0,5
Кислота нітратна концентрована	—
Кислота сульфатна концентрована	жовто-зелене, без світіння в УФ-світлі ($\lambda = 365$ нм) / 5,0 (плями обробляли прокочуванням скляної палички, змоченої реактивом)
Реактив Маркі модифікований	червоне, з жовтогарячим світінням в УФ-світлі ($\lambda = 365$ нм) / 0,5 (плями на пластинах обробляли прокочуванням скляної палички, змоченої реактивом, пластини поміщали на столик для нагрівання хроматографічних пластин ($80 - 90^{\circ}\text{C}$) на 30 хв; через 5 хв плями набували жовто-зеленого забарвлення, що поступово змінювалося на червоне; забарвлення плям становилося яскравішим після промивання пластин в проточній воді)
Розчин 2,4-динітрофенілгідразину	жовтогаряче / 0,1 (обприскування пластин розчином; забарвлення плям з'являлося у міру висихання пластин (20 – 30 хв))
Діазотована сульфанілова кислота в лужному середовищі	жовте / 0,5 (обприскування пластин розчином)
Розчин кобальту тіоціанату	блакитне / 0,5 (обприскування пластин розчином)

Примітка:

«—» – відсутність забарвлення

**Результати проявлення плям кетотифену
на хроматографічних пластинах
загальнозастосовуваними проявниками**

Проявник	Забарвлення / чутливість, мкг в пробі
1. УФ-світло ($\lambda = 254$ нм)	фіолетове (на пластинах з УФ-індикатором) / 0,2
2. пари йоду	коричневе / 0,5
3. 1% розчин калію перманганату в 0,25 моль/дм ³ розчині кислоти сульфатної	—
4. 5% розчин феруму (III) хлориду	—
5. послідовно реактив Драгендорфа та кислота сульфатна	червоно-коричневе / 0,1
6. 50% розчин кислоти сульфатної в етанолі	жовто-зелене / 5,0
7. послідовно 1,6% розчин меркурію (II) сульфату та 0,2% розчин дифенілкарбазону в етанолі	—
8. 0,5% розчин нінгідрину в суміші кислоти хлористоводневої розведеної та ацетону (1:10)	—

Примітка:

«—» – відсутність забарвлення

Ідентифікацію кетотифену проведено методом ВЕРХ з використанням ВЕРХ-аналізатора «Міліхром А-02» (ЗАТ «ЕкоНова», Новосибірськ, РФ). Елюювання градієнтне, виконується змішуванням двох елюентів: елюент А – [0,2 моль/дм³ LiClO₄ – 0,005 моль/дм³ HClO₄]; елюент Б – ацетонітрил «для ВЕРХ»; швидкість потоку – 100 мкл/хв; об'єм проби – 2 мкл. Детектування УФ-спектрофотометричне, проводиться одночасно за 8 довжин хвиль – 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 та 300 нм.

Встановлено основні хроматографічні параметри кетотифену в зазначених умовах – час та об'єм утримування, спектральні відношення (табл. 4 та рис. 1).

**Основні хроматографічні параметри кетотифену
при визначенні методом ВЕРХ**

t_R , хв	V_R , мкл	$R (S_\lambda / S_{210})$							
		$\frac{210\text{нм}}{210\text{нм}}$	$\frac{220\text{нм}}{210\text{нм}}$	$\frac{230\text{нм}}{210\text{нм}}$	$\frac{240\text{нм}}{210\text{нм}}$	$\frac{250\text{нм}}{210\text{нм}}$	$\frac{260\text{нм}}{210\text{нм}}$	$\frac{280\text{нм}}{210\text{нм}}$	$\frac{300\text{нм}}{210\text{нм}}$
17,747	1774,7	1,00000	0,66715	0,59470	0,33463	0,18163	0,18300	0,42174	0,64478

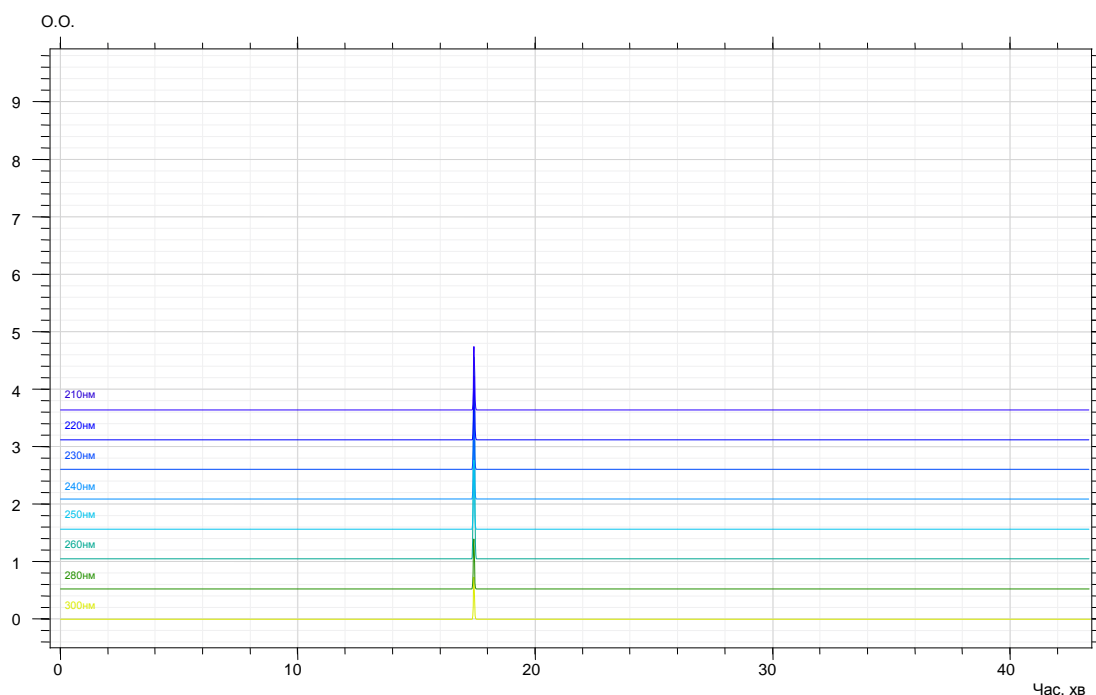


Рис. 1. ВЕРХ-хроматограма розчину кетотифену

Мінімальна концентрація кетотифену в розчині, що можна визначити за допомогою наведеної методики, становить 1 мкг/см^3 , що відповідає вмісту речовини в пробі 2 нг.

Для дослідження можливостей застосування методу УФ-спектроскопії з метою ідентифікації кетотифену на першому етапі досліджень отримували УФ-спектри кетотифену, кетотифену фумарату та кислоти фумарової в $0,1 \text{ моль/дм}^3$ розчині кислоти хлористоводневої (рис. 2).

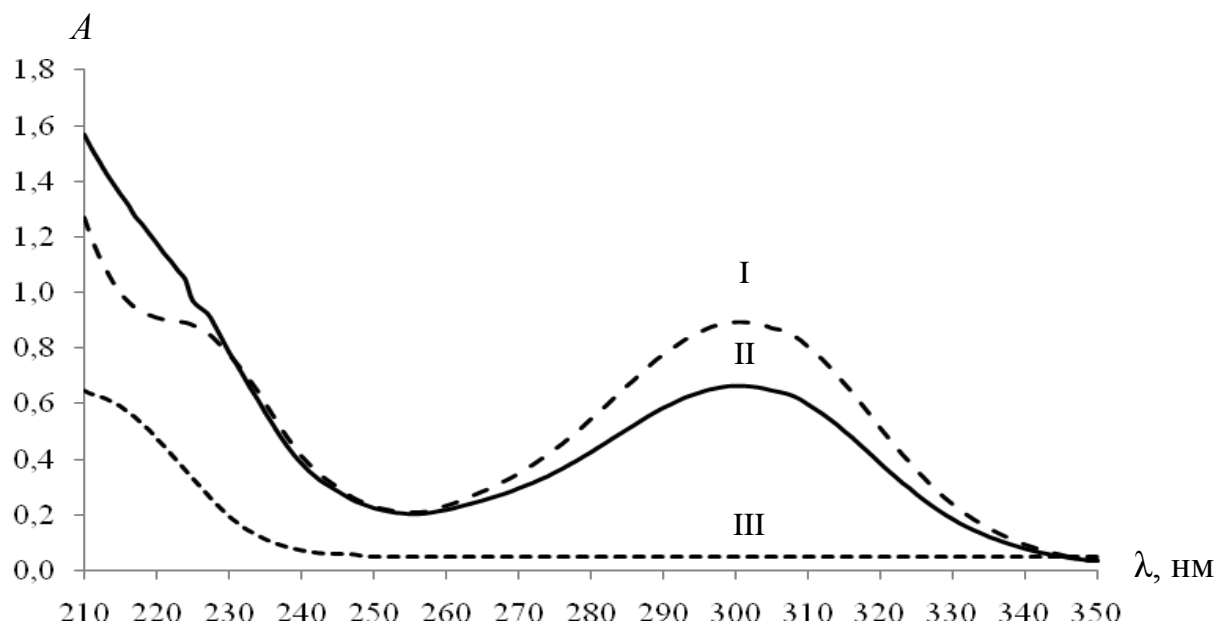


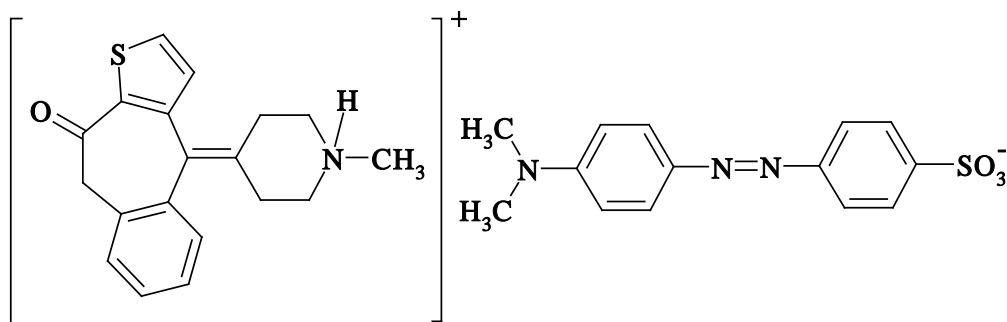
Рис. 2. УФ-спектри кетотифену (I), кетотифену фумарату (II) та кислоти фумарової (III) у $0,1 \text{ моль/дм}^3$ розчині кислоти хлористоводневої ($l = 10 \text{ мм}$; концентрація 20, 20 та $5,5 \text{ мкг/см}^3$ відповідно)

Встановлено, що максимум абсорбції для кетотифену та кетотифену fumarату знаходиться за однакової довжини хвилі – 301 нм (рис. 2); для розчину fumarової кислоти поглинання за цієї довжини хвилі практично відсутнє ($A = 0,012$), тому зазначену довжину хвилі можна використовувати для УФ-спектрофотометричного визначення кетотифену. Розраховано значення питомих та молярних показників поглинання кетотифену та кетотифену fumarату за довжини хвилі 301 нм.

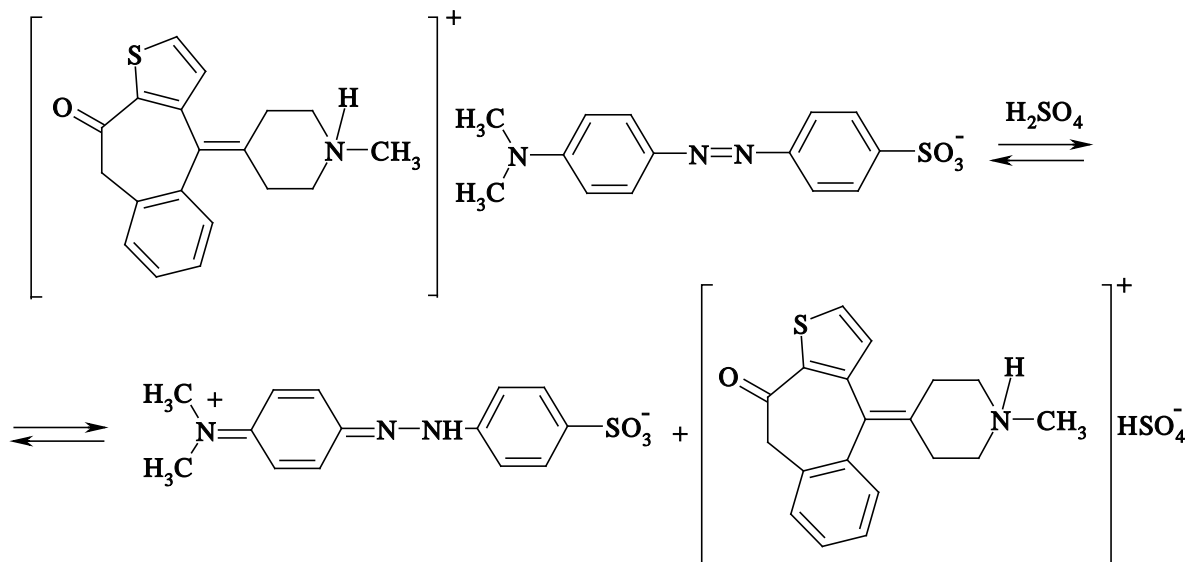
Розробка методик кількісного визначення кетотифену

Для кількісного визначення кетотифену розроблено УФ-спектрофотометричну методику (розчинник – 0,1 моль/дм³ розчин кислоти хлористоводневої), встановлено її основні валідаційні параметри та показано можливість застосування в інтервалі концентрацій від 2 мкг/см³ до 32 мкг/см³ з відносною невизначеністю середнього результату $\pm 1,86\%$.

Розроблено екстракційно-фотометричну методику кількісного визначення кетотифену на основі реакції утворення іонного асоціату з метиловим оранжевим, що екстрагується хлороформом при рН = 4,6; для іонного асоціату можна передбачити таку структуру:



Хлороформні розчини іонного асоціату мають малу інтенсивність забарвлення, тому для підвищення інтенсивності забарвлення і, відповідно, чутливості методики отриманий іонний асоціат руйнували додаванням до його хлороформних розчинів 1% розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі:



При цьому одержували інтенсивне рожеве забарвлення, пов'язане з вивільненням метилового оранжевого. Кількість метилового оранжевого при цьому є еквівалентною кількості кетотифену в іонному асоціаті. Метилловий оранжевий не екстрагується хлороформом з водних розчинів, а тому не заважає кількісному визначенню кетотифену.

Шляхом дослідження основних валідаційних параметрів показано, що методику можна використовувати при визначенні кетотифену в інтервалі концентрацій від 10 мкг до 100 мкг в пробі. Відносна невизначеність середнього результату не перевищує $\pm 1,47\%$.

Для кетотифену розроблено методику кількісного визначення за допомогою методу ВЕРХ з використанням як розчинника $0,01$ моль/дм³ розчину кислоти хлористоводневої. Визначення проводили на хроматографі «Міліхром А-02» за умов, що застосовували для ідентифікації препарату. Показано, що площа піків розчинів кетотифену лінійно залежить від його концентрації в діапазоні концентрацій від 1 мкг/см³ до 400 мкг/см³ з відносною невизначеністю середнього результату $\pm 3,91\%$.

В усіх випадках для розрахунку концентрації речовини в модельних розчинах використовували відповідні рівняння лінійних залежностей.

Розроблено твердоконтактний іонселективний електрод з пластифікованою полівінілхлоридною мембраною для визначення концентрації іонів кетотифену в водних розчинах.

У табл. 5 наведено склад мембранної композиції.

Таблиця 5

Склад мембранної композиції запропонованого електрода

Компонент мембрани	Вміст	
	мг	%
полівінілхлорид порошкоподібний С-70	250 ± 10	33 ± 3
дибутилфталат	400 ± 8	59 ± 4
іонний асоціат кетотифену з фосфорномолібденовою кислотою	$10 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,5$
срібло колоїдне (коларгол)	$8 \pm 0,2$	$1,75 \pm 0,25$

Мембрана твердоконтактного іонселективного електрода для визначення концентрації іонів кетотифену містить у своєму складі структуруючий компонент – полівінілхлорид, пластифікатор-розчинник – дибутилфталат, електроактивну речовину і стабілізатор потенціалу електрода в зоні утворення твердого контакту. Як електроактивну речовину використано іонний асоціат кетотифену з фосфорномолібденовою кислотою, а як стабілізатор потенціалу в зоні утворення твердого контакту – срібло колоїдне у вигляді лікарського препарату коларголу.

Конструкцію іонселективного електрода на кетотифен подано на рис. 3.

Електродна функція розробленого електрода є лінійною в інтервалі концентрацій $1,0 \cdot 10^{-4}$ – $1,0 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ з крутизною $58,1 \pm 0,2$ мВ, що є величиною, близькою до теоретичної (для однозарядного катіону – $59,2$ мВ за тем-

ператури 25°C). Мінімальна концентрація кетотифену, що можна визначити запропонованим електродом, становить $3,2 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³. Потенціал запропонованого іонселективного електрода на кетотифен стійкий в інтервалі рН = 4,0 – 9,0. Це значно розширює можливості використання електрода.

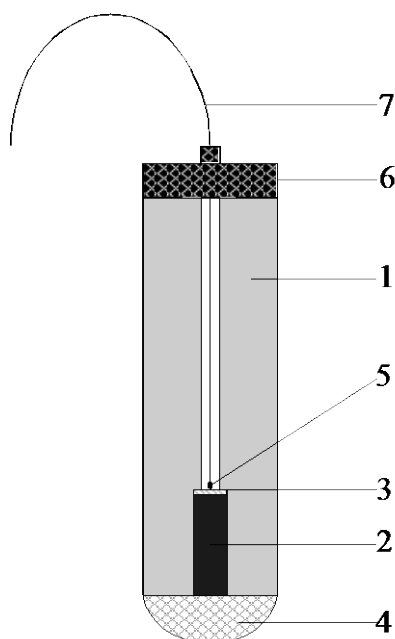


Рис. 3. Конструкція твердоконтактного ІСЕ на кетотифен:

- 1 – поліхлорвінілова трубка; 2 – графітовий стрижень;
3 – шар міді; 4 – мембрана електрода; 5 – місце припаювання провідника;
6 – пробка, що загвинчується; 7 – провідник

Розраховані коефіцієнти потенціометричної селективності кетотифенселективного електрода свідчать про те, що доксиламін, димедрол, іони Na^+ , K^+ , Zn^{2+} та Ca^{2+} мають вплив на потенціал кетотифенселективного електрода, але дозволяють проводити потенціометричне визначення кетотифену в їх присутності за умови введення відповідних катіонів до розчинів кетотифену.

Запропонований електрод застосовано для кількісного іонометричного визначення кетотифену у модельних розчинах, в тому числі, за методикою визначення у мікрооб'ємах розчинів (в 1 см³ та в краплі розчину). Відносна невизначеність середнього результату не перевищує $\pm 5\%$.

Дослідження умов екстракції кетотифену з водних розчинів органічними розчинниками

Для розробки оптимальних умов ізолювання кетотифену із біологічного матеріалу вивчено екстракцію речовини із водних розчинів широко застосовуваними в хіміко-токсикологічному аналізі органічними розчинниками в залежності від рН середовища (рис. 4).

Потрібне рН середовища створювали за допомогою універсальних буферних розчинів з рН від 2,0 до 12,0.

Показано, що хлороформ та діетиловий етер можна використовувати для екстракції кетотифену із «лужного» витягу з біологічного матеріалу.

Встановлено, що гексан практично не екстрагує кетотифен із водних розчинів незалежно від рН середовища, тому його можна використовувати для очистки як «кислого», так і «лужного» витягу із біологічного матеріалу.

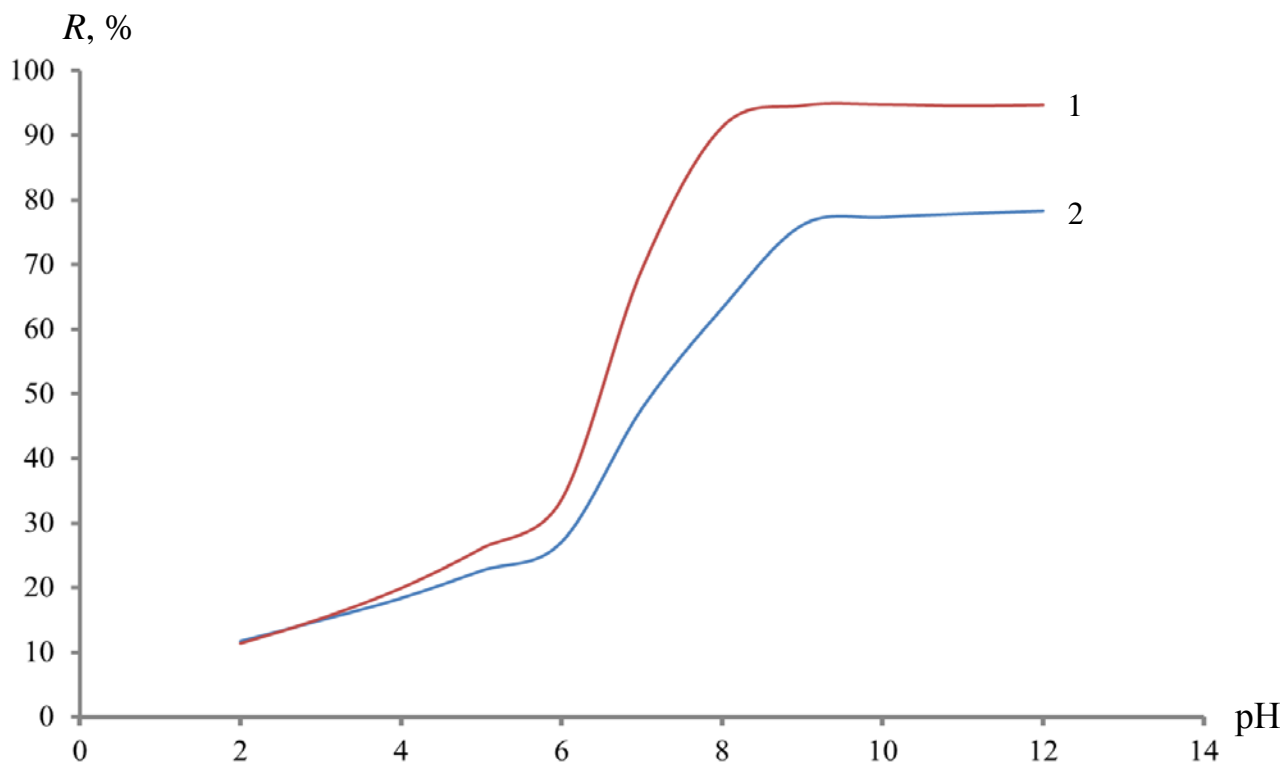


Рис. 4. Залежність ступеня екстракції кетотифену з водних розчинів від рН середовища і природи органічного розчинника: 1 – хлороформ; 2 – діетиловий етер

Розробка методик ізолювання кетотифену із біологічного матеріалу

При дослідженні виділення кетотифену із біологічного матеріалу та біологічних рідин використовували модельні суміші препарату з печінкою, що не зазнала гнилisних змін, кров'ю та сечею. Кількість кетотифену (1000 мкг), що використовували для проведення модельних дослідів, було розраховано виходячи з даних наукової літератури щодо кількості препарату в органах і тканинах людини при смертельних отруєннях.

Вивчено можливість ізолювання кетотифену із біологічного матеріалу за допомогою загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів: О. О. Васильєвої, Стаса–Отто, В. П. Крамаренка та проаналізовано їх переваги і недоліки. Крім того, виділення кетотифену з біологічного матеріалу проводили за допомогою методики, запропонованої О. В. Удаловим, що є модифікацією методу Стаса–Отто та відрізняється від нього тим, що екстракцію етанолом проводять в нейтральному середовищі, а осадження білків проводять за допомогою ацетону після підкислення спиртового витягу кислотою хлористоводневою.

Запропоновано також методику ізолювання кетотифену з біологічного матеріалу за допомогою хлороформу та модифікацію цієї методики, що поля-

гає в попередній екстракції біологічного матеріалу гексаном з метою видалення з нього ліпофільних сполук.

Зважаючи на результати, отримані при ізолюванні кетотифену з печінки за допомогою хлороформу, запропоновано використовувати цей розчинник для ізолювання препарату із крові та сечі.

Запропоновано методику ізолювання кетотифену із сечі після попереднього кислотного гідролізу, що демонструє високу ефективність (~90%) і може бути використана для ізолювання із біологічної рідини не тільки нативної речовини, а й кетотифену, отриманого внаслідок гідролізу його основного метаболіту – кетотифен N-глюкуроніду.

Кількісні параметри досліджених методів ізолювання кетотифену із біологічного матеріалу наведено в табл. 6.

Таблиця 6

**Результати ізолювання кетотифену
із об'єктів біологічного походження ($n = 3$; $p = 0,95$)**

Методика ізолювання	Виділено кетотифену, % (УФ-спектрофотометрична методика кількісного визначення)
за О. О. Васильєвою	55,29 ± 3,25
за В. П. Крамаренком	59,61 ± 2,45
за Стасом–Отто	48,24 ± 3,80
за О. В. Удаловим	59,54 ± 3,94
методика ізолювання хлороформом із печінки	71,94 ± 7,22
методика ізолювання хлороформом із печінки (після екстракційної очистки)	69,04 ± 6,74
методика ізолювання хлороформом із печінки з очисткою гексаном	73,54 ± 5,31
методика 1 ізолювання хлороформом із крові	70,81 ± 2,75
методика 2 ізолювання хлороформом із крові	65,33 ± 2,64
методика ізолювання хлороформом із сечі	82,68 ± 2,84
методика ізолювання хлороформом із сечі після кислотного гідролізу	90,48 ± 2,85

Запропоновано методику ТШХ-очистки витягів із об'єктів біологічного походження шляхом елюювання пластин (попередньо оброблених

0,1 моль/дм³ розчином калію гідроксиду в метанолі, а потім висушених за температури 110°C протягом 30 хв) в системі розчинників хлороформ – метанол (90:10). Попередньо пластини елюють в хлороформі – один раз або, за необхідності, двічі. За цих умов кетотифен залишається на лінії старту, а співекстрактивні речовини мігрують до лінії фінішу. З пластин кетотифен елюють 0,1 моль/дм³ або 0,01 моль/дм³ розчином кислоти хлористоводневої. Методика дозволяє виділити з пластини не менш як 95% препарату.

За результатами проведених досліджень запропоновано схему спрямованого аналізу біологічного матеріалу на кетотифен (рис. 5).

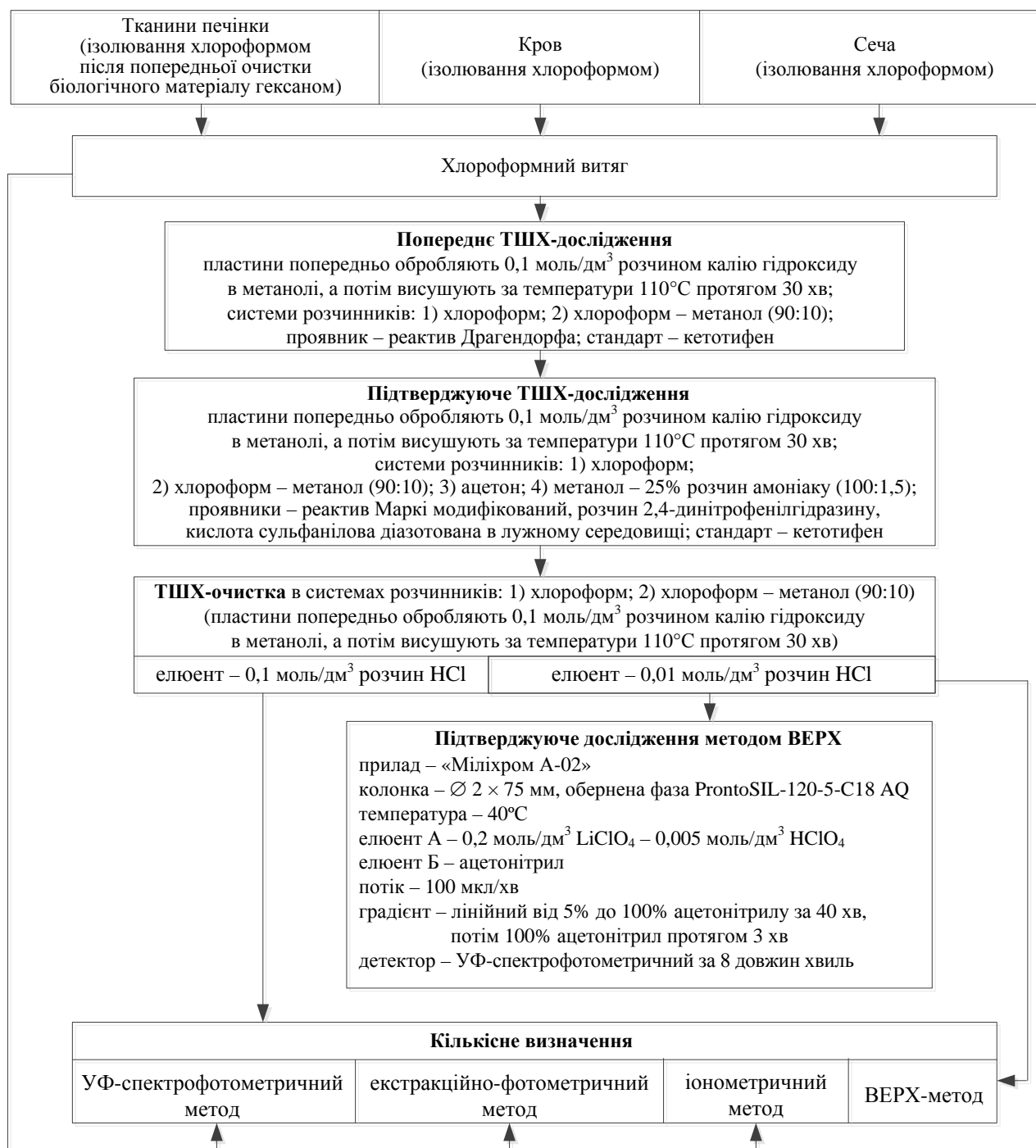


Рис. 5. Схема спрямованого аналізу біологічного матеріалу на кетотифен

Внесено доповнення до загальної схеми ТШХ-скринінгу органічних речовин кислотного та основного характеру (пошук невідомої речовини), що дозволяють не втратити кетотифен при проведенні неспрямованого дослідження.

Встановлено термін зберігання кетотифену в біологічному матеріалі при його гнитті – показано, що через 6 місяців в біологічному матеріалі ще можливо виявити кетотифен.

ВИСНОВКИ

На основі комплексних системних досліджень вперше запропоновано та обґрунтовано схему виконання хіміко-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу на кетотифен, що включає методики його ізолювання, очистки отриманих витягів із біологічного матеріалу, ідентифікації за допомогою комплексу кольорових реакцій, методів УФ-спектроскопії, ТШХ та ВЕРХ, а також кількісного визначення.

1. Розроблено чутливі методики ідентифікації кетотифену за допомогою кольорових реакцій – встановлено, що серед загальних реактивів для ідентифікації кетотифену можна застосовувати реактиви Вагнера, Бушарда, Драгендорфа (класичний та модифікований за Муньє), Манделіна, Фреде, розчин кобальту тіоціанату, та запропоновано більш специфічні і чутливі для виявлення кетотифену реагенти – розчин 2,4-динітрофенілгідразину (реакція на $\text{C}=\text{O}$ групу), діазотована сульфанілова кислота в лужному середовищі (реакція на $\text{-CH}_2\text{-C}=\text{O}$ групу), модифікований реактив Маркі при нагріванні; та методу ТШХ – досліджено хроматографічну поведінку кетотифену в загальноприйнятих в хіміко-токсикологічному аналізі системах розчинників, вивчено його відношення до проявників, що застосовуються в загальному ТШХ-скринінгу органічних речовин кислотного та основного характеру.
2. Розроблено чутливі методики ідентифікації кетотифену за допомогою методів УФ-спектроскопії та ВЕРХ з використанням широко застосовуваного в хіміко-токсикологічному та криміналістичному аналізі в країнах СНД «ВЕРХ-аналізатора» «Міліхром А-02».
3. Вперше створено пластифіковану мембрану твердоконтактного кетотифен-селективного електрода на основі полівінілхлориду, що містить як електроактивну речовину іонний асоціат катіону кетотифену з аніоном фосфорномолібденової кислоти. Запропонований електрод застосовано для виявлення та кількісного визначення кетотифену у витягах із біологічного матеріалу, в тому числі, за методикою визначення в мікрооб'ємах розчинів.
4. Розроблено чутливі методики кількісного визначення кетотифену методами УФ-спектрофотометрії (за власним поглинанням за довжини хвилі 301 нм) – методика дає можливість визначати препарат у межах концентрації від 2 мкг до 32 мкг в 1 см^3 розчину, відносна невизначеність середнього результату становить $\pm 1,86\%$; методом екстракційної фотометрії (з використанням як реагенту метилового оранжевого, що утворює з кето-

тифеном іонний асоціат) – методика дає можливість визначити від 10 мкг до 100 мкг кетотифену в пробі, відносна невизначеність середнього результату становить $\pm 1,47\%$; методом ВЕРХ – методика дає можливість визначити від 2 нг до 800 нг кетотифену в пробі, відносна невизначеність середнього результату становить $\pm 3,91\%$. Показано можливість застосування розроблених методик для кількісного визначення кетотифену у витягах із біологічного матеріалу після їх ТШХ-очистки.

5. Встановлено оптимальні умови екстракції кетотифену із водних розчинів – найбільш високий ступінь екстракції забезпечують хлороформ та діетиловий етер в лужному середовищі.
6. Вперше проведено порівняння ефективності загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання органічних речовин основного характеру щодо кетотифену. Розроблено ефективний та експресний індивідуальний метод ізолювання кетотифену із біологічного матеріалу за допомогою хлороформу та запропоновано методики виділення кетотифену з біологічних рідин організму (крові, сечі). Запропоновано методику очищення кетотифену від співекстрактивних речовин у витягах із біологічного матеріалу із застосуванням методу ТШХ.
7. Запропоновано методику ізолювання кетотифену із сечі після попереднього кислотного гідролізу, що демонструє високу ефективність ($\sim 90\%$) і може бути використана для ізолювання із біологічної рідини не тільки нативної речовини, а й кетотифену, отриманого внаслідок гідролізу його основного метаболіту – кетотифен N-глюкуроніду.
8. Встановлено, що термін зберігання кетотифену в твердому біологічному матеріалі при його гнильному розкладенні становить не менше 6 місяців.
9. Внесено доповнення до схеми ТШХ-скринінгу органічних речовин, що дозволяють не втратити кетотифен при проведенні неспрямованого дослідження.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Болотов, В. В. Кольорові реакції і тонкошарова хроматографія кетотифену / В. В. Болотов, Е. Ю. Ахмедов, Ю. О. Мирошніченко // Вісн. фармації. – 2011. – №1 (65). – С. 43 – 45. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка статті).
2. Фотометричне визначення кетотифену / В. В. Болотов, Ю. О. Мирошніченко, Е. Ю. Ахмедов, Л. Ю. Клименко // Вісн. фармації. – 2011. – №3 (67). – С. 50 – 53. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка статті).
3. Застосування вискоелективної рідинної хроматографії в аналізі кетотифену / В. В. Болотов, Ю. О. Мирошніченко, Л. Ю. Клименко, Е. Ю. Ахмедов // Укр. мед. альм. – 2012. – Т. 15, №5 (додаток). – С. 40 – 42. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка статті).

4. Болотов, В. В. Розробка твердоконтактного електрода, селективного до кетотифену / В. В. Болотов, Ю. О. Мирошніченко, Л. Ю. Клименко // Укр. мед. альм. – 2013. – Т. 16, №1. – С. 47 – 49. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка статті).
5. Методи ізолювання кетотифена із тканин печени / Ю. А. Мирошніченко, Л. Ю. Клименко, В. В. Болотов, Э. Ю. Ахмедов // Фармація Казахстану. – 2013. – №7. – С. 41 – 44. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка статті).
6. Мирошніченко, Ю. О. Дослідження ступеня екстракції кетотифену із водних розчинів органічними розчинниками / Ю. О. Мирошніченко, Л. Ю. Клименко, В. В. Болотов // Укр. мед. альм. – 2013. – Т. 16, №1 (додаток). – С. 164. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка тез).
7. Miroshnichenko, Yu. O. Development of the isolation procedure for ketotifen using sulphuric acid / Yu. O. Miroshnichenko, L. Yu. Klimenko, V. V. Bolotov // Actual Questions of Development of New Drugs: Book of Abstracts of XX International Scientific and Practical Conference of Young Scientists and Students Devoted to the 90th Anniversary of Doctor of Science in Pharmacy, Professor Dmitri Pavlovych Salo, April 25 – 26, 2013, Kharkiv. – Kharkiv: NUPh, 2013. – P. 89. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка тез).
8. Болотов, В. В. Кольорові реакції і тонкошарова хроматографія кетотифену / Болотов В. В., Ахмедов Е. Ю., Мирошніченко Ю. О. // Фармація України. Погляд у майбутнє: матеріали VII Нац. з'їзду фармацевтів України, 15 – 17 верес. 2010 р., Харків. – Х., 2010. – Т. 1. – С. 135 – 136. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка тез).
9. Фотометричне визначення кетотифену / В. В. Болотов, Ю. О. Мирошніченко, Л. Ю. Клименко, Е. Ю. Ахмедов // Сучасні проблеми токсикології. Безпека їжі та середовища життєдіяльності людини: матеріали III Нац. з'їзду токсикологів України, 18 – 19 груд. 2011 р., Київ. – Сучас. пробл. токсикології. – 2011. – №5. – С. 153 – 154. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка тез).
10. Болотов, В. В. Ідентифікація та кількісне визначення кетотифену за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії / В. В. Болотов, Ю. О. Мирошніченко, Л. Ю. Клименко // Тез. доп. річ. сес. Наук. ради з пробл. «Аналітична хімія» НАН України, 3 – 10 черв. 2012 р., Гурзуф, АР Крим. – Гурзуф, 2012. – С. 113. (Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка тез).

Мирошниченко Ю. О. Розробка методів хіміко-токсикологічного аналізу кетотифену. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія. – Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2014.

Дисертацію присвячено комплексному хіміко-токсикологічному дослідженню кетотифену.

Розроблено методики ідентифікації кетотифену за допомогою кольорових реакцій, методів УФ-спектроскопії, ТШХ, ВЕРХ.

Розроблено УФ-спектрофотометричну, екстракційно-фотометричну та ВЕРХ-методику кількісного визначення кетотифену, придатні для цілей хіміко-токсикологічного аналізу.

На основі іонного асоціату кетотифену з фосфорномолібденовою кислотою запропоновано твердоконтактний кетотифенселективний електрод, що застосовано для виявлення та кількісного визначення кетотифену у витягах із біологічного матеріалу, в тому числі, за методикою визначення в мікроб'ємах розчинів.

Порівняно ефективність загальних методів ізолювання органічних речовин основного характеру щодо кетотифену та розроблено окрему методику ізолювання кетотифену із біоматеріалу.

Обґрунтовано схему хіміко-токсикологічного аналізу біоматеріалу на кетотифен та доповнення до загальної схеми ТШХ-скринінгу органічних речовин, що дозволяють не втратити кетотифен при проведенні непрямого дослідження.

Ключові слова: кетотифен, оптичні методи аналізу, ВЕРХ, ТШХ, кольорові реакції, іонселективні електроди, іонометрія, екстракція, ізолювання із біоматеріалу, хіміко-токсикологічний аналіз.

Мирошниченко Ю. А. Разработка методов химико-токсикологического анализа кетотифена. – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия. – Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, Харьков, 2014.

Диссертационная работа посвящена комплексному химико-токсикологическому исследованию кетотифена.

Идентификацию кетотифена проводили химическими (цветные реакции) и физико-химическими методами (ТСХ, ВЭЖХ, УФ-спектроскопия).

Показано, что среди общепринятых реактивов для идентификации кетотифена можно использовать реактивы Вагнера, Бушарда, Драгендорфа, Манделина, Фреде, раствор кобальта тиоцианата, и предложены более специфичные для обнаружения кетотифена реагенты – раствор 2,4-динитрофенилгидразина, diazotированная сульфаниловая кислота в щелочной среде и модифицированный реактив Марки при нагревании.

ТСХ-исследование проводили в 14 общепринятых в химико-токсикологическом анализе системах растворителей. Изучено поведение кетотифена в условиях общего ТСХ-скрининга органических веществ основного характера, в частности, его отношение к групповым проявителям.

Идентификация кетотифена проведена методом ВЭЖХ с использованием ВЭЖХ-анализатора «Милихром А-02». Установлены основные хроматографические параметры кетотифена – время и объем удерживания, спектральные отношения, а также минимальная концентрация вещества в растворе, которую можно определить с помощью используемой методики.

Разработан твердоконтактный ионселективный электрод с пластифицированной поливинилхлоридной мембраной для определения концентрации ионов кетотифена в водных растворах. Электродная функция разработанного электрода линейна в интервале концентраций $1,0 \cdot 10^{-4}$ – $1,0 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ с крутизной $58,1 \pm 0,2$ мВ. Минимальная концентрация кетотифена, которую можно определить данным электродом, составляет $3,2 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³. Потенциал ионселективного электрода на кетотифен стабилен в интервале рН 4,0 – 9,0.

Предложенный электрод применен для количественного ионометрического определения кетотифена в модельных растворах и извлечениях из биологического материала.

Разработаны методики (УФ-спектрофотометрическая, экстракционно-фотометрическая и ВЭЖХ) количественного определения кетотифена, пригодные для целей химико-токсикологического анализа.

Установлены оптимальные условия (природа органического растворителя, рН среды) экстракции кетотифена из водных растворов органическими растворителями. Показано, что гексан можно использовать для экстракционной очистки кислых и щелочных водных извлечений из биологического материала от соэкстрактивных веществ, поскольку он не экстрагирует кетотифен из водных растворов независимо от значения рН среды. Наиболее высокую степень экстракции препарата обеспечивают хлороформ и диэтиловый эфир в щелочной среде.

Впервые проведено сравнение эффективности общепринятых в химико-токсикологическом анализе методов изолирования органических веществ основного характера по отношению к кетотифену. Разработан эффективный и экспрессный индивидуальный метод изолирования кетотифена из биологического материала с помощью хлороформа и предложены методики выделения кетотифена из биологических жидкостей организма (крови, мочи).

Разработана методика очистки кетотифена от соэкстрактивных веществ в извлечениях из биологического материала с применением метода ТСХ.

Предложено изолировать кетотифен из мочи после предварительного кислотного гидролиза; методика демонстрирует высокую эффективность (~90%) и может быть использована для изолирования из биологической жидкости не только нативного вещества, но и кетотифена, полученного в результате гидролиза его основного метаболита – кетотифен N-глюкуронида.

Установлен срок сохраняемости (6 месяцев) кетотифена в биологическом материале при его гнилостном разложении.

На основе систематических исследований обоснована схема направленного химико-токсикологического анализа биологического материала на кетотифен, которая включает методики его изолирования из биологического материала, идентификации посредством комплекса цветных реакций и методов УФ-спектроскопии, ТСХ и ВЭЖХ, а также количественного определения. Кроме того, внесены дополнения в общую схему ТСХ-скрининга органических веществ, которые позволяют обнаружить кетотифен при проведении ненаправленного исследования.

Ключевые слова: кетотифен, оптические методы анализа, ВЭЖХ, ТСХ, цветные реакции, ионселективные электроды, ионометрия, экстракция, изолирование из биоматериала, химико-токсикологический анализ.

Miroshnichenko Yu. O. The development of methods of chemical and toxicological analysis of ketotifen. – A manuscript.

Dissertation for the Candidate's scientific degree in Pharmacy on the speciality 15.00.02 – pharmaceutical chemistry and pharmacognosy. – National University of Pharmacy, Ministry of Public Health of Ukraine, Kharkiv, 2014.

Thesis is devoted to ketotifen complex chemical and toxicological research.

The procedures of ketotifen identification by coloured reactions, UV-spectroscopy, TLC and HPLC have been developed.

The procedures of ketotifen quantitative determination by such methods as UV-spectrophotometry, extraction photometry and HPLC, which are suitable for the purposes of chemical and toxicological analysis, have been developed.

The ketotifen-selective solid contact electrode has been offered on the basis of ionic associate of ketotifen with phosphomolybdic acid, the electrode has been used for detection and quantitative determination of ketotifen in extracts from biological material including by the determination procedure in the solutions microvolumes.

Efficiency of basic organic substances isolation general methods in relation to ketotifen has been compared and the individual method of ketotifen isolation from biomaterial has been developed.

The scheme of chemical and toxicological analysis of biomaterial for ketotifen and additions to general scheme of organic substances TLC-screening, which allow not to lose ketotifen during undirected research, have been grounded.

Key words: ketotifen, optical methods of analysis, HPLC, TLC, coloured reactions, ion-selective electrodes, extraction, isolation from biomaterial, chemical and toxicological analysis.

Підписано до друку 13. 04. 2014 р.
Формат 60×84 1/16. Папір офсетний. Друк ризографічний.
Умовн. друк. арк. 0,9. Наклад 100 прим. Зам. № б/н.
Надруковано СПД ФО Степанов В. В., м. Харків, вул. Ак. Павлова, 311