

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
УКРАЇНСЬКИЙ ЦЕНТР НАУКОВОЇ МЕДИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ
ТА ПАТЕНТНО-ЛІЦЕНЗІЙНОЇ РОБОТИ**

**ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ
БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ НА КЕТОТИФЕН**

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Київ – 2014

Міністерство охорони здоров'я України
Український центр наукової медичної інформації
та патентно-ліцензійної роботи

“УЗГОДЖЕНО”

Директор Департаменту реформ
та розвитку медичної допомоги

МОЗ України

М. Хобзей



2014 р.

**ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ
БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ НА КЕТОТИФЕН**

(методичні рекомендації)

(30.14/60.14)

Київ – 2014

Установа-розробник: Національний фармацевтичний університет
МОЗ України

Укладачі:

Клименко Ліна Юріївна	кандидат фармацевтичних наук, доцент тел. моб.: (050) 401-37-62 тел. роб.: (0572) 67-91-93	
Мирошніченко Юлія Олександрівна	тел. моб.: (066) 330-77-17	
<table border="1"><tr><td>Болотов Валерій Васильович</td></tr></table>	Болотов Валерій Васильович	доктор хімічних наук, професор
Болотов Валерій Васильович		

Рецензент: доктор фармацевтичних наук, професор Петюнін Г. П.

Голова проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України:

член-кор. НАН України, проф.

В. П. Черних

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень	4
Вступ	5
I. Методики ізолювання кетотифену із біологічного матеріалу	7
II. Методики ідентифікації та кількісного визначення кетотифену	11
II.1. Методика ідентифікації кетотифену методом ТШХ	11
II.2. Методика ТШХ-очистки витягів із біологічного матеріалу	14
II.3. УФ-спектрофотометрична методика кількісного визначення кетотифену	15
II.4. Екстракційно-фотометрична методика кількісного визначення кетотифену	17
II.5. Методика ідентифікації та кількісного визначення кетотифену методом ВЕРХ	19
II.6. Схема спрямованого аналізу біологічного матеріалу на кетотифен	22
Висновки	23
Перелік рекомендованої літератури	24

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

МОЗ – Міністерство охорони здоров'я

НАМН – Національна академія медичних наук

НАН – Національна академія наук

ТШХ – тонкошарова хроматографія

УФ – ультрафіолетовий

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ВСТУП

У більшості розвинених країн світу в останні десятиріччя спостерігається різке збільшення кількості алергічних захворювань. На сьогодні фармакотерапія алергічних станів є основним способом боротьби з цією поширеною недугою, що призводить до появи на ринку лікарських препаратів все нових і нових засобів вітчизняного і закордонного виробництва. У зв'язку з побічною дією за певних умов деякі з них можуть бути причиною фатальних ускладнень, інтоксикацій різного ступеня тяжкості, гострих і хронічних отруень.

Із збільшенням ринку лікарських засобів розширюється коло об'єктів судово-токсикологічних досліджень, що вимагає розробки методик їх ізолювання, ідентифікації, кількісного визначення в біологічних об'єктах, а також включення в загальний скринінг токсикологічно значущих речовин.

Кетотифен як засіб з антианафілактичною активністю широко застосовується в медичній практиці як антиалергічний засіб. У зв'язку з побічними явищами (потенціювання дії снодійних, седативних, інших антиалергічних засобів, алкоголю) кетотифен використовується в немедичних цілях, а при передозуванні може призвести до летальних наслідків.

В літературних джерелах наводяться дані щодо випадків отруень кетотифеном. Систематизована інформація щодо гострих передозувань кетотифену свідчить, що симптоми передозування подібні до таких у випадках передозування інших антигістамінних засобів, проте вони менш виражені. Є повідомлення про розвиток епілепсії та легкої розумової відсталості у дітей внаслідок передозувань кетотифену.

Критичний огляд літературних джерел показав, що інформація про методики виконання хіміко-токсикологічного аналізу кетотифену вкрай недостатня – способи його ізолювання та дослідження в біосубстратах не розроблено.

В методичних рекомендаціях запропоновано методики ізолювання кетотифену із об'єктів біологічного походження, що розроблено власне авто-

рами шляхом модифікації загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання органічних речовин основного характеру, а також нову методику ізолювання – хлороформом з попередньо зневодненого біологічного матеріалу.

Рекомендовано до застосування вперше розроблені авторами методики виявлення та кількісного визначення кетотифену у витягах з біологічного матеріалу за допомогою кольорових реакцій, тонкошарової та високоефективної рідинної хроматографії, оптичних методів аналізу.

Дослідження 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).

Методичні рекомендації призначено для судово-медичних експертів-токсикологів бюро судово-медичної експертизи та видаються в Україні вперше.

I. МЕТОДИКИ ІЗОЛЮВАННЯ КЕТОТИФЕНУ ІЗ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Для розробки ефективних методик ізолювання кетотифену із біологічного матеріалу використовували модельні суміші препарату з кров'ю, сечею та печінкою, що не зазнали гnilісних змін. Для цього до 10,00 г подрібненої печінки або до 10,00 см³ крові або сечі додавали 1,00 см³ стандартного розчину кетотифену фумарату у воді очищеній (1000 мкг препарату), ретельно перемішували і залишали на добу. Готували також контрольні суміші біологічного матеріалу з розчинником (вода очищена), дослідження яких проводили паралельно з основними.

Кількість кетотифену, що використовували для проведення модельних дослідів, було розраховано виходячи з даних наукової літератури щодо кількості препарату в органах і тканинах людини при смертельних отруєннях.

Ізолювання кетотифену з біологічного матеріалу рекомендовано проводити за допомогою модифікованих загальноприйнятих методів О. О. Васильєвої, Стаса–Отто, В. П. Крамаренка. Модифікація методів полягає у зменшенні наважок біологічного матеріалу до 10 г, а також у відповідному зменшенні об'ємів органічних розчинників та заміні стадій проціджування на центрифугування – отримують по 25,0 см³ витягів (V_1).

Методика ізолювання кетотифену хлороформом із тканин печінки. До 10,00 г біологічного матеріалу додають 30 г натрію сульфату безводного, змішують та періодично перемішують в ступці до утворення сипкої маси (біля 2 – 3 годин). У вузьку нижню частину скляної колонки діаметром 17 – 20 мм поміщають марлевий тампон, заливають гексан (частина від попередньо відміряного гексану об'ємом 100 см³) та засипають отриману сипку масу, періодично додаючи гексан таким чином, щоб над біологічним матеріалом постійно утримувалося «дзеркало» товщиною 1 – 2 см; після повного перенесення сипкої маси колонку залишають на годину. Далі над колонкою закріплюють ділильну лійку з залишком гексану, який пропускають через колонку із швидкістю 60 – 80 крапель за хвилину,

утримуючи «дзеркало» над біологічним матеріалом. Гексановий витяг збирають та надалі не досліджують.

Біологічний матеріал висипають із колонки та залишають до видалення гексану. У вузьку нижню частину скляної колонки діаметром 17 – 20 мм поміщають марлевий тампон, заливають хлороформ (частина від попередньо відміряного хлороформу об'ємом 100 см³) та засипають отриману сипку масу, періодично додаючи хлороформ таким чином, щоб над біологічним матеріалом постійно утримувалося «дзеркало» товщиною 1 – 2 см; після повного перенесення сипкої маси колонку залишають на годину. Далі над колонкою закріплюють ділильну лійку з залишком хлороформу, який пропускають через колонку із швидкістю 60 – 80 крапель за хвилину, утримуючи «дзеркало» над біологічним матеріалом. Хлороформний витяг збирають до мірної колби місткістю 100,0 см³ то доводять об'єм хлороформом до позначки (V_1).

Методика ізолювання кетотифену із крові. До 10,00 см³ крові додають 5 см³ 10% водного розчину кислоти трихлорацетатної та 20 см³ води очищеної, перемішують та залишають на годину при постійному перемішуванні. Суміш центрифугують (протягом 5 хв при 3000 – 5000 об./хв), зливають надосадову рідину, перевіряють рН (має дорівнювати 2 за універсальним індикаторним папером) та тричі екстрагують діетиловим етером порціями по 5 см³. Етерні витяги відділяють та в подальшому не досліджують.

Водний шар підлужують 50% розчином натрію гідроксиду до рН = 11 за універсальним індикаторним папером і тричі екстрагують хлороформом порціями по 10 см³ (при утворенні стійких емульсій застосовують центрифугування (протягом 5 хв при 3000 – 5000 об./хв)). «Лужні» хлороформні витяги об'єднують та фільтрують через паперовий фільтр («червона стрічка») з 1 г натрію сульфату безводного до мірної колби місткістю 25,0 см³, доводять об'єм хлороформом до позначки (V_1).

Методика ізолювання кетотифену із сечі. До 10,00 см³ сечі додають

0,1 моль/дм³ розчин кислоти хлористоводневої до рН = 2 за універсальним індикаторним папером і тричі екстрагують діетиловим етером порціями по 5 см³. Етерні витяги відділяють та в подальшому не досліджують.

Водний шар підлужують 50% розчином натрію гідроксиду до рН = 11 за універсальним індикаторним папером і тричі екстрагують хлороформом порціями по 10 см³ (при утворенні стійких емульсій застосовують центрифугування (протягом 5 хв при 3000 – 5000 об./хв)). «Лужні» хлороформні витяги об'єднують та фільтрують через паперовий фільтр («червона стрічка») з 1 г натрію сульфату безводного до мірної колби місткістю 25,0 см³, доводять об'єм хлороформом до позначки (V_1).

Дані щодо ефективності застосування запропонованих методик ізолювання кетотифену наведено в табл. 1.

Таблиця 1

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

Методика ізолювання	Виділено кетотифену, % (методика кількісного визначення)
за О. О. Васильєвою («лужний» хлороформний витяг)	55,29 ± 3,25 (УФ-спектрофотометрична) 55,20 ± 1,99 (екстракційно-фотометрична) 54,64 ± 1,41 (ВЕРХ після ТШХ-очистки)
за В. П. Крамаренком	59,61 ± 2,45 (УФ-спектрофотометрична) 62,13 ± 3,04 (екстракційно-фотометрична) 61,90 ± 3,35 (ВЕРХ після ТШХ-очистки)
за Стасом–Отто («лужний» хлороформний витяг)	48,24 ± 3,80 (УФ-спектрофотометрична) 49,63 ± 4,14 (екстракційно-фотометрична) 47,04 ± 2,86 (ВЕРХ після ТШХ-очистки)
методика ізолювання хлороформом із печінки	73,54 ± 5,31 (УФ-спектрофотометрична) 73,33 ± 8,27 (екстракційно-фотометрична) 70,07 ± 5,86 (ВЕРХ після ТШХ-очистки)
методика ізолювання хлороформом із крові	65,33 ± 2,64 (УФ-спектрофотометрична) 63,47 ± 3,04 (екстракційно-фотометрична) 64,54 ± 3,73 (ВЕРХ після ТШХ-очистки)
методика ізолювання хлороформом із сечі	82,68 ± 2,84 (УФ-спектрофотометрична) 82,67 ± 4,14 (екстракційно-фотометрична) 84,43 ± 3,94 (ВЕРХ після ТШХ-очистки)

Дані табл. 1 свідчать, що при проведенні *неспрямованого аналізу* біологічного матеріалу кетотифен можна ізолювати за допомогою загальноприйнятих методів О. О. Васильєвої, В. П. Крамаренка та Стаса–Отто, що дозволяють виділити достатньо велику кількість препарату та отримати витяги в достатній мірі звільнені від співекстрактивних речовин. При ізолюванні за цими методами кетотифен потрапляє до «лужного» хлороформного витягу.

При виконанні *спрямованого дослідження* біологічного матеріалу на кетотифен рекомендовано застосовувати методику ізолювання хлороформом із тканин печінки з попередньою очисткою біологічного матеріалу гексаном (див. вище).

II. МЕТОДИКИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КЕТОТИФЕНУ

II.1. МЕТОДИКА ІДЕНТИФІКАЦІЇ КЕТОТИФЕНУ МЕТОДОМ ТШХ

Ідентифікацію кетотифену в отриманих витягах із об'єктів біологічного походження проводять методом ТШХ на хроматографічних пластинах із закріпленим шаром силікагелю. В експерименті використовували пластини з такими характеристиками: силікагель СТХ-1ВЕ, тип підложки – ПЕТФ, зв'язуюча речовина – силіказоль, фракція – $8\div 12$ мкм, товщина шару – 100 мкм.

Хроматографування проводять в камерах об'ємом 500 см^3 , в які вносять 10 см^3 систем розчинників. Камери насичують протягом 30 хв. Довжина шляху пробігу систем розчинників становить 8 см.

Для ідентифікації кетотифену $2,00\text{ см}^3$ відповідного хлороформного витягу випаровують на водяній бані за температури 60°C до повного видалення органічного розчинника; сухий залишок розчиняють в $1,00\text{ см}^3$ 96% етанолу. 100 мкл отриманого етанольного розчину наносять на лінію старту хроматографічної пластини; у випадку негативного результату збільшують об'єм до 500 мкл.

При проведенні *непрямого дослідження* біологічного матеріалу аналіз виконують відповідно до загальноприйнятої схеми ТШХ-скринінгу в одній із наступних загальних систем розчинників 1 або 2 для речовин основного характеру:

1. хлороформ – діоксан – ацетон – 25% розчин амоніаку (47,5:45:5:2,5);
2. толуен – ацетон – етанол – 25% розчин амоніаку (45:45:7,5:2,5).

R_f кетотифену в цих системах розчинників становить 0,34 та 0,66 відповідно.

Як проявники використовують:

- 1) УФ-світло – фіолетова пляма (лише на пластинах з УФ-індикатором);
- 2) послідовно реактив Драгендорфа та кислоту сульфатну (для проявлення алкалоїдів, похідних 1,4-бензодіазепіну та кислоти *n*-амінобензойної) – пляма кетотифену забарвлюється в червоно-коричневий

колір на відміну від плям співекстрактивних речовин, колір яких є жовто-коричневим та швидко зникає;

- 3) розчин калію перманганату (для виявлення кокаїну, речовин-відновників);
- 4) 50% розчин кислоти сульфатної в етанолі (для виявлення похідних фенотіазину) – пляма кетотифену забарвлюється в жовто-зелений колір;
- 5) розчин нінгідрину з наступним нагріванням пластин (для виявлення фенілалкіламінів та речовин, що мають в структурі первинну або вторинну аміногрупу).

Проявниками 3 та 5 кетотифен не виявляється.

Далі проводять ТШХ-дослідження в окремих системах розчинників для відповідних груп речовин.

Для кетотифену рекомендується на цьому етапі проводити дослідження на хроматографічних пластинах із закріпленим шаром силікагелю, 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 пластину елюють в хлороформі з метою очистки від співекстрактивних речовин.

Пластину проявляють реактивом Драгендорфа та спостерігають пляму червоно-коричневого кольору ($R_f = 0,66$).

Зазначений проявник дозволяє виявити 0,1 мкг кетотифену в пробі.

Підтверджуюче дослідження виконують на хроматографічних пластинах із закріпленим шаром силікагелю, попередньо оброблених 0,1 моль/дм³ розчином калію гідроксиду в метанолі, а потім висушених за температури 110°C протягом 30 хв, в трьох системах розчинників – хлороформ – метанол (90:10), ацетон, метанол – 25% розчин амоніаку (100:1,5). Попередньо пластину елюють в хлороформі з метою очистки від співекстрактивних речовин.

Пластини проявляють:

- *реактивом Маркі модифікованим*: до 3 см³ кислоти ацетатної концентрованої додають 4 краплі формаліну (37 – 40%) і 1 см³ кислоти

сульфатної концентрованої (реактив використовують свіжоприготованим);

- розчином 2,4-динітрофенілгідразину: до 0,1 г 2,4-динітрофенілгідразину додають 4 см³ кислоти хлористоводневої концентрованої і 20 см³ води очищеної;
- діазотованою сульфаніловою кислотою в лужному середовищі: до 0,5 г кислоти сульфанілової додають 75 см³ води очищеної і 25 см³ 5 моль/дм³ розчину кислоти хлористоводневої (розчин А); до 40 см³ охолодженого до 3°C розчину А повільно додають 10 см³ 0,7% розчину натрію нітриту (розчин Б); для обприскування пластин використовують розчин, отриманий змішуванням 2 см³ розчину Б з 1 см³ 5 моль/дм³ розчину натрію гідроксиду (розчин С) (всі розчини зберігають в холодильнику; розчини Б і С готують безпосередньо перед обприскуванням пластин);

та спостерігають плями червоного, жовтогарячого і жовтого кольору відповідно ($R_f = 0,66; 0,34; 0,54$ відповідно).

Зазначені проявники дозволяють виявити 0,5; 0,1 та 0,5 мкг кетотифену в пробі відповідно.

Ідентифікацію проводять в присутності «свідка» – кетотифену (використовують стандартний хлороформний розчин з концентрацією 1 мкг/мкл).

При проведенні *спрямованого дослідження* біологічного матеріалу на кетотифен проводять попередню ідентифікацію кетотифену на хроматографічних пластинах із закріпленим шаром силікагелю, 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 пластину елюють в хлороформі з метою очистки від співекстрактивних речовин.

Пластину проявляють реактивом Драгендорфа та спостерігають пляму червоно-коричневого кольору ($R_f = 0,66$).

Підтверджуюче дослідження виконують на хроматографічних пластинах із закріпленим шаром силікагелю, попередньо оброблених 0,1 моль/дм³ розчи-

ном калію гідроксиду в метанолі, а потім висушених за температури 110°C протягом 30 хв, в трьох системах розчинників – хлороформ – метанол (90:10), ацетон, метанол – 25% розчин амоніаку (100:1,5). Попередньо пластину елюють в хлороформі з метою очистки від співекстрактивних речовин.

Пластини проявляють модифікованим реактивом Маркі, розчином 2,4-динітрофенілгідразину, діазотованою сульфаніловою кислотою в лужному середовищі та спостерігають плями червоного, жовтогарячого і жовтого кольору відповідно ($R_f = 0,66; 0,34; 0,54$ відповідно).

Ідентифікацію проводять в присутності «свідка» – кетотифену (використовують стандартний хлороформний розчин з концентрацією 1 мкг/мкл).

Кількісне визначення кетотифену проводять за УФ-спектрофотометричною, екстракційно-фотометричною та ВЕРХ-методиками в 10,00; 5,00 та 5,00 см³ (V_2) хлороформних витягів відповідно, отриманих за методиками О. О. Васильєвої, В. П. Крамаренка, Стаса–Отто та методиками ізолювання із крові та сечі, та в 25,00; 10,00 та 10,00 см³ (V_2) хлороформного витягу, отриманого за методом ізолювання хлороформом, до та після їх ТШХ-очистки.

II.2. МЕТОДИКА ТШХ-ОЧИСТКИ ВИТЯГІВ ІЗ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Зазначену кількість хлороформного витягу (V_2) випаровують на водяній бані за температури 60°C до сухого залишку, який розчиняють у 0,5 см³ 96% етанолу та кількісно наносять на лінію старту хроматографічної пластини із закріпленим шаром силікагелю, попередньо обробленої 0,1 моль/дм³ розчином калію гідроксиду в метанолі, а потім висушеної за температури 110°C протягом 30 хв, смугою шириною 2 см. Поряд наносять 10 мкл стандартного хлороформного розчину кетотифену (концентрація 1 мкг/мкл).

Пластину елюють в хлороформі з метою очистки від співекстрактивних речовин – один раз або, за необхідності, двічі. За цих умов кетотифен залишається на лінії старту, а співекстрактивні речовини мігрують до лінії фінішу.

Після висушування елююють пластину в системі розчинників хлороформ – метанол (90:10), висушують, проявляють смугу «свідка» реактивом Драгендорфа та спостерігають пляму червоно-коричневого кольору з $R_f = 0,66$.

Хроматографування проводять в камері об'ємом 500 см^3 , в яку вносять 10 см^3 системи розчинників. Камеру насичують протягом 30 хв. Довжина шляху пробігу систем розчинників становить 8 см.

За допомогою скальпелю навпроти плями «свідка» з пластини ретельно знімають сорбент з площі $3 \text{ см} \times 1 \text{ см}$ в скляний флакон. У флакон додають 10 см^3 $0,1 \text{ моль/дм}^3$ розчину кислоти хлористоводневої – V_3 (при наступному проведенні кількісного визначення за УФ-спектрофотометричною методикою) або 10 см^3 $0,01 \text{ моль/дм}^3$ розчину кислоти хлористоводневої – V_3 (при наступному проведенні кількісного визначення за екстракційно-фотометричною або ВЕРХ-методикою) та струшують протягом 5 хв, після чого фільтрують до мірної колби місткістю $10,0 \text{ см}^3$ та доводять об'єм розчину через фільтр («червона стрічка») відповідним розчинником до позначки (елюат).

Запропонована методика ТШХ-очистки дозволяє виділити з пластини не менш як 95% препарату.

II.3. УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНА МЕТОДИКА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КЕТОТИФЕНУ

Методика побудови градувального графіка для УФ-спектрофотометричного визначення кетотифену. $50,0 \text{ мг}$ кетотифену фумарату вносять до мірної колби місткістю $250,0 \text{ см}^3$, розчиняють у $0,1 \text{ моль/дм}^3$ розчині кислоти хлористоводневої і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки (стандартний розчин 1, концентрація 200 мкг/см^3). У чотири мірні колби місткістю $100,0 \text{ см}^3$ вносять із бюретки $6,00$; $10,00$; $14,00$ та $16,00 \text{ см}^3$ стандартного розчину кетотифену фумарату 1 відповідно і доводять об'єми розчинів $0,1 \text{ моль/дм}^3$ розчином кислоти хлористоводневої до позначки (розчини 2, 3, 4 та 5 відповідно, концентрація 12 , 20 , 28 та 32 мкг/см^3 відповідно). У три мірні колби місткістю $100,0 \text{ см}^3$ вносять із

бюретки 10,00; 20,00 та 40,00 см³ розчину кетотифену фумарату 3 відповідно і доводять об'єми розчинів 0,1 моль/дм³ розчином кислоти хлористоводневої до позначки (розчини 6, 7 та 8 відповідно, концентрація 2, 4 та 8 мкг/см³ відповідно).

Після ретельного перемішування записують УФ-спектр розчину кетотифену фумарату 3 в діапазоні довжин хвиль 220 – 350 нм на спектрофотометрі СФ-46 в кюветі з товщиною шару 10 мм. Як компенсаційний розчин використовують 0,1 моль/дм³ розчин кислоти хлористоводневої. В діапазоні довжин хвиль 290 – 310 нм в УФ-спектрі кетотифену фумарату спостерігається максимум поглинання (в експерименті – за довжини хвилі 301 нм); вимірюють оптичну густину розчинів кетотифену фумарату 2 – 8 на спектрофотометрі СФ-46 за цієї довжини хвилі в кюветі з товщиною шару 10 мм. Як компенсаційний розчин використовують 0,1 моль/дм³ розчин кислоти хлористоводневої.

За отриманими даними будують градувальний графік залежності оптичної густини A від концентрації кетотифену фумарату в розчині C (мкг/см³) та розраховують відповідне рівняння лінійної залежності.

Для визначення кетотифену в отриманих витягах зазначену кількість витягу (V_2) випаровують на водяній бані за температури 60°C до повного видалення органічного шару. Сухий залишок розчиняють в 10,00 см³ 0,1 моль/дм³ розчину кислоти хлористоводневої (V_3). Після ретельного перемішування визначають оптичну густину отриманого розчину або відповідного елюату (при проведенні ТШХ-очистки) за визначеної довжини хвилі в кюветі з товщиною шару 10 мм. Як компенсаційний розчин використовують 0,1 моль/дм³ розчин кислоти хлористоводневої.

Концентрацію кетотифену фумарату в розчині C (мкг/см³) розраховують за допомогою градувального графіка або за відповідним рівнянням лінійної залежності оптичної густини від концентрації кетотифену фумарату в розчині.

Кількість кетотифену фумарату в наважці біологічного матеріалу X (мкг/10 г) розраховують за формулою:

$$X = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot 100\%}{V_2 \cdot R}, \text{ де}$$

- C – концентрація кетотифену фумарату в розчині, що спектрофотометрується, мкг/см³;
- V_1 – об'єм хлороформного витягу, що отримано із наважки біологічного матеріалу, см³;
- V_2 – об'єм хлороформного витягу, що взято для аналізу, см³;
- V_3 – об'єм 0,1 моль/дм³ розчину кислоти хлористоводневої, що використано для розчинення сухого залишку (або об'єм отриманого елюату при виконанні ТШХ-очистки), см³;
- R – ступінь ізолювання кетотифену із біологічного матеріалу, %.

II.4. ЕКСТРАКЦІЙНО-ФОТОМЕТРИЧНА МЕТОДИКА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КЕТОТИФЕНУ

Методика побудови градууювального графіка для екстракційно-фотометричного визначення кетотифену. 50,0 мг кетотифену фумарату вносять до мірної колби місткістю 250,0 см³, розчиняють у воді очищеній і доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки (стандартний розчин 1, концентрація 200 мкг/см³).

У три мірні колби місткістю 100,0 см³ вносять із бюретки 6,00; 8,00 та 10,00 см³ стандартного розчину кетотифену фумарату 1 відповідно і доводять об'єми розчинів водою очищеною до позначки (розчини 2, 3 та 4 відповідно, концентрація 12, 16 та 20 мкг/см³ відповідно). У три мірні колби місткістю 100,0 см³ вносять із бюретки 10,00; 20,00 та 40,00 см³ розчину кетотифену фумарату 4 відповідно і доводять об'єми розчинів водою очищеною до позначки (розчини 5, 6 та 7 відповідно, концентрація 2, 4 та 8 мкг/см³ відповідно).

В ряд ділильних лійок вносять по 5,00 см³ ацетатного буферного розчину з рН = 4,6, по 2,00 см³ 0,02% розчину метилового оранжевого та по 5,00 см³ розчинів кетотифену фумарату 2 – 7 відповідно. До отриманих сумішей додають по 15,00 см³ хлороформу. Суміші у ділильних лійках

струшують протягом 5 хв за допомогою механічного струшувача і залишають на 10 хв для розділення шарів. Збирають по 10,00 см³ хлороформних шарів, відкидаючи їх перші та останні порції (близько 1,00 см³), і додають до них по 1,00 см³ 1% розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі. Одержані суміші ретельно перемішують та визначають оптичну густину на фотоелектроколориметрі КФК-2 в кюветі з товщиною шару 20 мм (світлофільтр з $\lambda_{\text{еф}} = 540 \pm 10$ нм). Як компенсаційний розчин використовують хлороформ.

За отриманими даними будують градувальний графік залежності оптичної густини A від концентрації кетотифену фумарату в розчині C (мкг/см³) та розраховують відповідне рівняння лінійної залежності.

Для визначення кетотифену в отриманих витягах зазначену кількість витягу (V_2) випаровують на водяній бані до повного видалення органічного шару. Сухий залишок розчиняють в 10,00 см³ 0,01 моль/дм³ розчину кислоти хлористоводневої (V_3) та ретельно перемішують. В ділільну лійку вносять 5,00 см³ ацетатного буферного розчину з рН = 4,6, 2,00 см³ 0,02% розчину метилового оранжевого та 5,00 см³ отриманого розчину або відповідного елюату (при проведенні ТШХ-очистки), до отриманої суміші додають 15,00 см³ хлороформу. Далі виконують дослідження як зазначено вище.

Концентрацію кетотифену фумарату в розчині C (мкг/см³) розраховують за допомогою градувального графіка або за відповідним рівнянням лінійної залежності оптичної густини від концентрації кетотифену фумарату в розчині.

Кількість кетотифену фумарату в наважці біологічного матеріалу X (мкг/10 г) розраховують за формулою:

$$X = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot 100\%}{V_2 \cdot R}, \text{ де}$$

- C – концентрація кетотифену фумарату в розчині, що фотометрується, мкг/см³;
- V_1 – об'єм хлороформного витягу, що отримано із наважки біологі-

чного матеріалу, см^3 ;

- V_2 – об'єм хлороформного витягу, що взято для аналізу, см^3 ;
- V_3 – об'єм $0,01$ моль/ дм^3 розчину кислоти хлористоводневої, що використано для розчинення сухого залишку (або об'єм отриманого елюату при виконанні ТШХ-очистки), см^3 ;
- R – ступінь ізолювання кетотифену із біологічного матеріалу, %.

II.5. МЕТОДИКА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КЕТОТИФЕНУ МЕТОДОМ ВЕРХ

Визначення проводять на хроматографі «Міліхром А-02» (ЗАТ «Еко-Нова», Новосибірськ, РФ). Обробку хроматограм проводять за допомогою програми «Аналітика–Chrom», розробленої НВФ «Аналітика» (м. Харків).

Умови хроматографування:

- колонка – $\varnothing 2 \times 75$ мм;
обернена фаза ProntoSIL–120–5–C18AQ («Bischoff Analystechnik und Geräte GmbH», Німеччина);
ефективність не менше 5000 теоретичних тарілок;
- температура – 40°C ;
- елюент А – $[4$ моль/ дм^3 LiClO_4 – $0,1$ моль/ дм^3 HClO_4] – H_2O (5:95);
- елюент Б – ацетонітрил «для ВЕРХ»;
- потік – 100 мкл/хв;
- градієнт – лінійний від 5% до 100% ацетонітрилу за 40 хв, потім 100% ацетонітрил протягом 3 хв;
- детектор – УФ-спектрофотометричний за 8 довжин хвиль (210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 та 300 нм).

Придатність ВЕРХ-системи періодично контролюють шляхом хроматографування спеціального контрольного багатокомпонентного розчину.

Методика побудови градуувального графіка для кількісного визначення кетотифену методом ВЕРХ. $100,0$ мг кетотифену вносять до мірної колби місткістю $100,0$ см^3 , розчиняють в $10,00$ см^3 $0,1$ моль/ дм^3 розчину кислоти хлористоводневої та доводять об'єм розчину водою очищеною до по-

значки (стандартний розчин 1, концентрація 1000 мкг/см³).

У дві мірні колби місткістю 100,0 см³ вносять 40,00 та 10,00 см³ стандартного розчину кетотифену 1 відповідно і доводять об'єми розчинів 0,01 моль/дм³ розчином кислоти хлористоводневої до позначки (стандартні розчини 2 та 3 відповідно, концентрація 400 та 100 мкг/см³ відповідно). До мірної колби місткістю 100,0 см³ вносять 10,00 см³ розчину кетотифену 2 і доводять об'єм розчину 0,01 моль/дм³ розчином кислоти хлористоводневої до позначки (стандартний розчин 4, концентрація 40 мкг/см³). У дві мірні колби місткістю 100,0 см³ вносять 10,00 та 5,00 см³ розчину кетотифену 4 відповідно і доводять об'єми розчинів 0,01 моль/дм³ розчином кислоти хлористоводневої до позначки (розчини 5 та 6 відповідно, концентрація 4 та 2 мкг/см³ відповідно). До мірної колби місткістю 100,0 см³ вносять 10,00 см³ розчину кетотифену 3 і доводять об'єм розчину 0,01 моль/дм³ розчином кислоти хлористоводневої до позначки (розчин 7, концентрація 1 мкг/см³).

Розчини кетотифену 2 – 7 хроматографують за вищезазначених умов; об'єм проби для хроматографування становить 2 мкл.

За отриманими даними будують градувальний графік залежності площі піку S від концентрації кетотифену в розчині C (мкг/см³) та розраховують відповідне рівняння лінійної залежності.

Для визначення кетотифену в отриманих витягах проводять хроматографування відповідних отриманих елюатів за вищезазначених умов; об'єм проби становить 2 мкл. За необхідності об'єм проби може бути збільшений до 200 мкл.

Ідентифікацію кетотифену проводять за основними хроматографічними параметрами – абсолютними часом t_R та об'ємом V_R утримування та спектральними характеристиками R (табл. 2).

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

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

Методика дозволяє виявити 2 нг кетотифену в пробі.

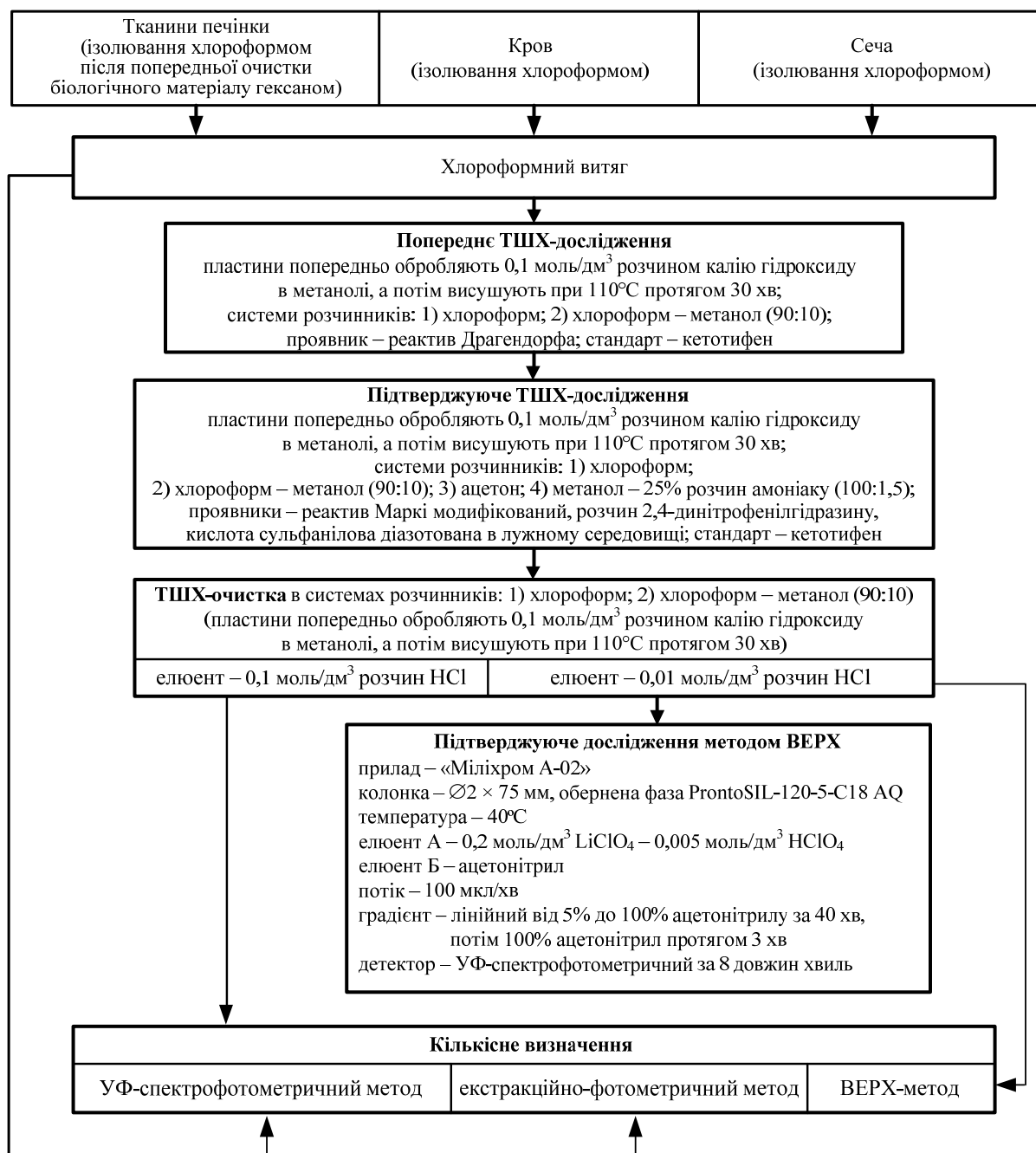
Концентрацію кетотифену в розчині C (мкг/см³) розраховують за допомогою градуювального графіка або за відповідним рівнянням лінійної залежності площі піку від концентрації кетотифену в розчині.

Кількість кетотифену фумарату в наважці біологічного матеріалу X (мкг/10 г) розраховували за формулою:

$$X = \frac{C \cdot 1,375 \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot 100\%}{V_2 \cdot R}, \text{ де}$$

- C – концентрація кетотифену в елюаті, мкг/см³;
- 1,375 – коефіцієнт перерахунку кетотифену на кетотифену фумарат;
- V_1 – об'єм хлороформного витягу, що отримано із наважки біологічного матеріалу, см³;
- V_2 – об'єм хлороформного витягу, що взято для аналізу, см³;
- V_3 – об'єм отриманого елюату, см³;
- R – ступінь ізолювання кетотифену із біологічного матеріалу, %.

II.6. СХЕМА СПРЯМОВАНОГО АНАЛІЗУ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ НА КЕТОТИФЕН



ВИСНОВКИ

Застосування вперше запропонованого комплексу методик дозволить ефективно, експресно та специфічно ідентифікувати та кількісно визначити кетотифен у витягах із об'єктів біологічного походження, що в свою чергу дозволить фіксувати випадки гострих та смертельних отруєнь зазначеним препаратом.

Запропоновані методики ідентифікації та кількісного визначення не дозволяють виявити кетотифен при прийомі середньої терапевтичної дози, завдяки чому неможливо зробити хибнопозитивний висновок про отруєння кетотифеном.

Експерт може дозволити собі обирати методику кількісного визначення кетотифену в залежності від наявності у нього відповідного обладнання та мети дослідження.

ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Барам, Г. И.* Новые возможности высокоэффективной жидкостной хроматографии в фармакопейном анализе / *Г. И. Барам, Д. В. Рейхарт, Е. Д. Гольдберг* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т. 135. – №1. – С. 75 – 79.
2. *Болотов, В. В.* Кольорові реакції і тонкошарова хроматографія кетотифену / *В. В. Болотов, Е. Ю. Ахмедов, Ю. О. Мирошниченко* // Вісн. фармації. – 2011. – №1 (65). – С. 43 – 45.
3. Фотометричне визначення кетотифену / *В. В. Болотов, Ю. О. Мирошниченко, Е. Ю. Ахмедов, Л. Ю. Клименко* // Вісн. фармації. – 2011. – №3 (67). – С. 50 – 53.
4. Застосування вискоєфективної рідинної хроматографії в аналізі кетотифену / *В. В. Болотов, Ю. О. Мирошниченко, Л. Ю. Клименко, Е. Ю. Ахмедов* // Укр. мед. альм. – 2012. – Т. 15, №5 (додаток). – С. 40 – 42.
5. Методы изолирования кетотифена из тканей печени / *Ю. А. Мирошниченко, Л. Ю. Клименко, В. В. Болотов, Э. Ю. Ахмедов* // Фармация Казахстана. – 2013. – №7. – С. 41 – 44.
6. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material / edited by *A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop*. – 4th ed. – London: Pharmaceutical Press, 2011. – 2609 p.
7. Ketotifen overdose in infancy associated with development of epilepsy and mild mental retardation / *H. Yokoyama, M. Hirose, M. Uematsu, K. Hagi-noya, K. Iinuma, S. Kimura* // *Pediatr. Int.* – 2012. – V. 54 (6). – P. 963.