

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

ЛЕБЕДИН АЛЛА МИКОЛАЇВНА

УДК 615.218.3:615.917:547.821:54.061/062

**ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ
ХЛОРОПРАМІНУ ГІДРОХЛОРИДУ**

15. 00. 02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

АВТОРЕФЕРАТ

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

Харків - 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету Міністерства охорони здоров'я України.

Науковий керівник: доктор фармацевтичних наук, професор
МАМІНА ОЛЕНА ОЛЕКСАНДРІВНА
Національний фармацевтичний університет,
професор кафедри фундаментальної
та мовної підготовки

Офіційні опоненти: доктор фармацевтичних наук, доцент
КАПЛАУШЕНКО АНДРІЙ ГРИГОРОВИЧ
Запорізький державний медичний університет,
завідувач кафедри фізколоїдної хімії

кандидат фармацевтичних наук, доцент
ЧУБЕНКО ОЛЕКСАНДР ВЛАДКОРОВИЧ
Харківська медична академія післядипломної
освіти, доцент кафедри клінічної біохімії, судово-
медичної токсикології та фармації

Захист відбудеться “03” березня 2016 року 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 ознайомитися в бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий “02” лютого 2016 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
професор

В. А. Георгіянц

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. За даними ВООЗ алергічними хворобами вражено 15-30% населення планети, тобто різні види алергії знаходяться на одному рівні за розповсюдженням із серцево-судинними та онкологічними захворюваннями, що обумовлює зростання застосування антигістамінних препаратів у сучасній медичній практиці.

Хлоропіраміну гідрохлорид (супрастин) – належить до групи антигістамінних препаратів I покоління, характеризується багатовекторністю фармакологічних ефектів, але викликає важкі інтоксикації при перевищенні доз в результаті самолікування, вражає нервову та дихальну системи організму. Препарат потенціює токсичну дію ліків при сумісному використанні із анальгетиками, психотропними препаратами та алкоголем, при наркотичній залежності, що ускладнює діагностику інтоксикацій. Симптоми отруєння хлоропіраміном гідрохлоридом можуть бути відстрочені в часі через зниження швидкості абсорбції в результаті блоку моторики ШКТ, що викликає збільшення доз при безконтрольному його вживанні.

Згідно з літературними джерелами дані про систематичні хіміко-токсикологічні дослідження хлоропіраміну гідрохлориду відсутні, недостатньо вивчено методи його ізолювання, ідентифікації, кількісного визначення у біологічних об'єктах, що обумовлює актуальність таких досліджень при застосуванні сучасних високочутливих та селективних методів аналізу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано згідно з планом науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету «Хімічний синтез і аналіз біологічно активних речовин, створення лікарських засобів синтетичного походження» (номер державної реєстрації 0103U000475) термін дії 2003-2013 рр., перереєстровано «Хіміко-токсикологічний аналіз біологічно активних речовин та лікарських засобів» (номер державної реєстрації 0114U000958) термін дії 2014-2018 рр., а також планом проблемної комісії «Фармація» МОЗ та АМН України.

Мета і задачі дослідження. Метою дисертаційної роботи є розробка алгоритму хіміко-токсикологічного дослідження об'єктів біологічного походження на вміст хлоропіраміну, що включає ефективні та експресні методики ізолювання препарату із біологічного матеріалу, очищення витягів від співекстрактивних речовин, а також методики його ідентифікації та кількісного визначення, що придатні для цілей хіміко-токсикологічного аналізу (ХТА).

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі задачі:

- проаналізувати та узагальнити дані літератури щодо фізико-хімічних, фармакологічних і токсикологічних властивостей хлоропіраміну гідрохлориду та методів його аналізу;

- розробити чутливі методики ідентифікації хлоропіраміну за допомогою та хроматографічних методів (ТШХ, ВЕРХ, ГРХ);

- визначити умови виявлення хлоропіраміну при скринінгових дослідженнях і комбінованих отруєннях у присутності антигістамінних препаратів (дифенгідраміну гідрохлориду (димедролу), клемастину гідрофумарату (тавегілу), квіфенаді-

ну (фенкаролу), ципрогептадину гідрохлориду (перитолу), мебгідроліну (діазоліну), лоратадину та цетиризину гідрохлориду;

- розробити методики кількісного визначення хлоропіраміну, придатні для хіміко-токсикологічних досліджень (ВЕРХ, ГРХ та екстракційно-фотометричну);

- вивчити вплив природи органічних розчинників, рН середовища та електролітів на екстракцію хлоропіраміну з водних розчинів при застосуванні методу математичного планування;

- порівняти ефективність загальноприйнятих у ХТА методів ізолювання органічних сполук (О.О. Васильєвої, В.П. Крамаренка, Стаса-Отто) і методик ізолювання ацетонітрилом та хлороформом щодо хлоропіраміну, а також розробити ефективну та експресну методику ізолювання хлоропіраміну із тканин органів та біологічних рідин організму (крові, сечі); встановити умови очищення хлоропіраміну від співекстрактивних речовин у витягах із біологічного матеріалу за допомогою методів екстракції та ТШХ;

- вивчити розподіл хлоропіраміну в органах тварин, отруєних препаратом, визначити умови виявлення хлоропіраміну у витягах з органів отруєних тварин за допомогою методу газо-рідинної хромато-маспектрометрії (ГРХ/МС);

- дослідити терміни зберігання хлоропіраміну в трупному матеріалі при його гнитті.

Об'єкт дослідження - хіміко-токсикологічний аналіз хлоропіраміну гідрохлориду та антигістамінних препаратів.

Предмет дослідження - методи ізолювання хлоропіраміну із біологічного матеріалу, очищення, ідентифікації та кількісного визначення, що придатні для цілей ХТА.

Методи дослідження. Для ідентифікації та кількісного визначення хлоропіраміну гідрохлориду у водних розчинах та витягах з біологічного матеріалу використовували фізико-хімічні методи (ТШХ, ВЕРХ, ГРХ, спектрофотометрія в ультрафіолетовій області спектра та екстракційна фотометрія). Для ідентифікації хлоропіраміну у витягах з біологічного матеріалу застосовували метод ГРХ/МС. Для ізолювання хлоропіраміну з біологічного матеріалу використовували загальноприйняті методи О.О. Васильєвої, В.П. Крамаренка, Стаса-Отто та методики ізолювання ацетонітрилом і хлороформом.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше виконано систематичні хіміко-токсикологічні дослідження хлоропіраміну гідрохлориду.

Вперше встановлено хроматографічну поведінку хлоропіраміну у присутності антигістамінних препаратів в умовах загальної схеми ТШХ-скринінгу органічних отрут.

Встановлено основні хроматографічні параметри утримування та розділення хроматографічних піків при дослідженні хлоропіраміну та антигістамінних препаратів в умовах аналізу ВЕРХ-методом. Розроблено нові методики ВЕРХ, ГРХ та екстракційної фотометрії для кількісного визначення хлоропіраміну, придатні для ХТА.

Вивчено вплив факторів на екстракцію хлоропіраміну з водних розчинів (природа органічних розчинників, рН середовища, наявності електролітів) при ви-

користанні методу математичного планування з метою встановлення умов екстракції хлоропіраміну, придатних для ХТА.

За результатами порівняння вперше встановлено ефективність загальноприйнятих у ХТА методів ізолювання органічних сполук (О.О. Васильєвої, В.П. Крамаренка, Стаса-Отто) та методик ізолювання ацетонітрилом та хлороформом щодо хлоропіраміну.

Розроблено ефективну та експресну методику ізолювання хлоропіраміну з біологічного матеріалу за допомогою хлороформу. Розроблено методики виділення хлоропіраміну з біологічних рідин організму (крові, сечі).

Вивчено розподіл хлоропіраміну в органах тварин, отруєних препаратом, та рекомендовано об'єкти для проведення ХТА. Встановлено термін зберігання хлоропіраміну у біологічному матеріалі при його гнитті.

На підставі виконаних досліджень вперше запропоновано схему ХТА біологічного матеріалу на хлоропірамін. Наукову новизну одержаних результатів ілюстровано патентом України на корисну модель №89401 від 25.04.14.

Практичне значення одержаних результатів. На підставі комплексу проведених досліджень підготовлено та видано інформаційні листи №190 – 2011 «Методика аналізу антигістамінних препаратів за допомогою вискоефективної рідинної хроматографії», №211 – 2015 «Скринінг антигістамінних препаратів у біологічних об'єктах методом тонкошарової хроматографії» та методичні рекомендації «Хіміко-токсикологічне дослідження хлоропіраміну» (113.14/245.14), які затверджені МОЗ України 23.10.2014 р.

Розроблені методики ХТА хлоропіраміну рекомендовано застосовувати у практичній роботі відділень судово-медичної токсикології, в клінічних лабораторіях та у криміналістичному аналізі для вирішення питань щодо отруєння хлоропіраміном гідрохлоридом і антигістамінними препаратами.

Одержані результати досліджень впроваджено в практичну діяльність відділень судово-медичної токсикології Харківського (акт від 24.09.2014 р.); Полтавського (акт від 30.09.2014 р.); Кіровоградського (акт від 17.10.2014 р.), Дніпропетровського (акт від 25.10.2014 р.) та Чернівецького (акт від 25.10.2014 р.) бюро судово-медичної експертизи, а також в навчальний процес кафедри токсикологічної та неорганічної хімії Запорізького державного медичного університету (акт від 25.09.2014 р.), кафедри нормальної фізіології, медичної біології та біологічної хімії ПВНЗ Київського медичного університету (акт від 29.09.2014 р.), кафедри судової медицини та медичного правознавства Харківського національного медичного університету (акт від 1.10.2014 р.) та кафедри токсикологічної та аналітичної хімії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького (акт від 14.10.2014 р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертантом проаналізовано дані літератури щодо фізико-хімічних, фармакологічних і токсикологічних властивостей хлоропіраміну гідрохлориду та антигістамінних препаратів, методів аналізу хлоропіраміну в лікарських формах та біологічному матеріалі; теоретичні основи методів ХТА, визначено мету та завдання досліджень, розроблено методичні підходи до вибору методів виконання експериментальної частини дисертації.

Особисто проведено патентно-інформаційний пошук, експериментальні дослідження, статистичну обробку, аналіз і 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 ВЕРХ-методом проведено на базі НВФ „Аналітика” (м. Харків), ГРХ-методом та методами екстракції хлоропіраміну з біологічного матеріалу – на базі Харківського обласного бюро судово-медичної експертизи, ГРХ/МС-методом – на базі ХНЦВЕ (Харківського наукового центру військової екології).

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи викладено та обговорено на VII Міжнародній научній практичній конференції «Новини на научний прогрес - 2011» (м. Софія, Республіка Болгарія, 2011), Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (м. Харків, 2012), Міжвузівській конференції молодих вчених та студентів «Медицина третього тисячоліття» (м. Харків, 2012), XI науково-практичній конференції, присвяченій 90-річчю Донецького обласного бюро судово-медичної експертизи та 60-річчю кафедри судової медицини Донецького національного медичного університету ім. М. Горького (м. Донецьк, 2013), X Mezinárodní vědecká a praktická konference «Aktuální vymoženosti vědy» (м. Прага, Чеська республіка, 2014), XXII International Scientific And Practical Conference of Young Scientists and Students (м. Харків, 2015).

Публікації. Матеріали дисертації опубліковано у 16 наукових роботах, серед яких 6 статей у фахових виданнях (1 стаття опублікована за кордоном), 6 тез доповідей на науково-практичних вітчизняних і міжнародних конференціях, 2 інформаційних листа, 1 патент України на корисну модель та 1 методичні рекомендації, затверджені МОЗ України.

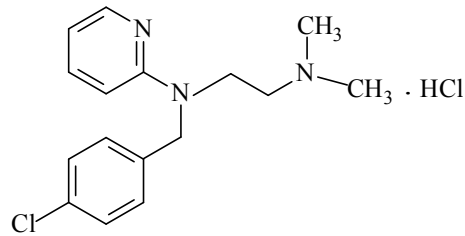
Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 177 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, огляду літератури, трьох розділів, загальних висновків, списку використаних джерел і 5 додатків (22 стор.). Обсяг основного тексту дисертації складає 137 сторінок друкованого тексту, ілюстровано 35 таблицями, 34 рисунками та 1 схемою. Список використаних джерел містить 141 найменування, серед яких 86 іноземні.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Хлоропіраміну гідрохлорид: фармакологічні та токсичні властивості, методи хіміко-токсикологічного та фармацевтичного аналізу (Огляд літератури)

В огляді літератури проведено узагальнення даних щодо фармакологічних та токсичних властивостей хлоропіраміну гідрохлориду (N-(2-піридил)-N-(пара-хлорбензил)-N',N'-диметилетиленадіаміну гідрохлориду) у порівнянні з антигістамінними препаратами, наведено результати застосування фізико-хімічних методів (ТШХ, ВЕРХ, ГРХ, мас-спектрометрії, спектральних методів) для ідентифікації і кількісного визначення хлоропіраміну гідрохлориду та

антигістамінних препаратів у водних розчинах та витягах з біологічного матеріалу, але у літературі відсутні відомості про систематичні хіміко-токсикологічні дослідження хлоропіраміну гідрохлориду.



Розробка методів виявлення хлоропіраміну гідрохлориду

Ідентифікацію хлоропіраміну гідрохлориду проведено фізико-хімічними методами – ТШХ, ВЕРХ, ГРХ та методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій області спектра.

В результаті дослідження встановлено відсутність високочутливих та селективних хімічних реакцій для ідентифікації хлоропіраміну. Вивчено хроматографічну поведінку хлоропіраміну у присутності антигістамінних препаратів ТШХ-методом з використанням трьох типів хроматографічних пластинок.

Дослідження проведено у 17 системах розчинників, з яких 8 систем рекомендовано Міжнародним комітетом з систематичного токсикологічного аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів; 6 систем застосовуються у загальному ТШХ-скринінгу органічних речовин і 3 системи для антигістамінних препаратів.

Вивчено відношення хлоропіраміну до проявників органічних речовин основного характеру, що містять у своїй структурі третинний атом нітрогену. Реактиви Маркі, Ердмана, Шейблера, ФПН, Фреде, Манделіна, кислота сульфатна концентрована, кислота нітратна концентрована з досліджуваною речовиною не дали позитивних результатів. Встановлено, що найбільш чутливими проявниками при ТШХ-аналізі хлоропіраміну є УФ-світло ($\lambda = 254$ нм) та реактив Драгендорфа, модифікований за Мунье.

Розроблені умови ТШХ-методик можна застосовувати при спрямованому ХТА на хлоропірамін. Найбільш ефективними умовами для ХТА хлоропіраміну є застосування системи розчинників етилацетат-метанол-25% розчин аміаку (85:10:5), хроматографічних пластинок Сорбфіл – ПТСХ – АФ – А ($R_f = 0,60$), скляних пластинок фірми Merck ($R_f = 0,45$). Для ідентифікації та очищення хлоропіраміну у присутності біогенних домішок також рекомендовано застосування систем рухомих розчинників та хроматографічних пластинок Сорбфіл – ПТСХ – АФ – А: метанол – 25% розчин аміаку (100:1,5) ($R_f = 0,68$); толуол – ацетон – етанол – 25% розчин аміаку (45:45:7,5:2,5) ($R_f = 0,66$); бензол – етанол – 25% розчин аміаку (80:20:1) ($R_f = 0,68$).

При неспрямованому ХТА та скринінгових дослідженнях для розділення та ідентифікації суміші хлоропіраміну та антигістамінних препаратів рекомендовано на першому етапі застосовувати систему розчинників та хроматографічні пластинки: хлороформ-метанол (90:10), Сорбфіл ПТСХ-АФ-А (R_f лоратадину = 0,96, R_f мебгідроліну = 0,79, R_f ципрогептадину = 0,70, R_f дифенгідраміну = 0,52, R_f хлоропіраміну = 0,44, R_f клемастину = 0,37, R_f квіфенадіну = 0,13 та R_f цетиризину = 0,06, що дозволило виділити чотири

хроматографічні зони: R_f 0,75 – 0,96 (для аналізу мебгідроліну та лоратадину); R_f 0,50 – 0,75 (для аналізу дифенгідраміну та ципрогептадину); R_f 0,30 – 0,50 (для аналізу клемастину та хлоропіраміну); R_f 0,06 - 0,30 (для аналізу квіфенадіну та цетиризину).

На другому етапі ТШХ-скринінгу проведено дослідження при застосуванні специфічних систем розчинників, що дозволило ефективно розділити сполуки, які входили в одну хроматографічну зону: для аналізу мебгідроліну та лоратадину – система рухомих розчинників метанол (R_f лоратадину = 0,89, R_f мебгідроліну = 0,63); толуол – ацетон – етанол-25% розчин аміаку (45:45:7,5:2,5) (R_f лоратадину = 0,88, R_f мебгідроліну = 0,65); для аналізу дифенгідраміну та ципрогептадину - метанол-25% розчин аміаку (100:1,5) (R_f ципрогептадину = 0,71, R_f дифенгідраміну = 0,55); для аналізу клемастину та хлоропіраміну - етилацетат-метанол-25% розчин аміаку (85:10:5) (R_f хлоропіраміну = 0,60, R_f клемастину = 0,45); метанол-н-бутанол (60:40) (R_f хлоропіраміну = 0,33, R_f клемастину = 0,23); метанол-25% розчин аміаку (100:1,5) (R_f хлоропіраміну = 0,35, R_f клемастину = 0,24); для аналізу квіфенадіну та цетиризину - метанол-25% розчин аміаку (100:1,5) (R_f квіфенадіну = 0,18 та R_f цетиризину = 0,82).

Для отримання надійних результатів було проведено підтвердуючі дослідження при застосуванні методів ВЕРХ, спектрофотометрії в ультрафіолетовій області спектра.

Ідентифікацію хлоропіраміну та антигістамінних препаратів проводили ВЕРХ-методом на мікроколоночному рідинному хроматографі у обернено-фазному варіанті при використанні металевої колонки з неполярним сорбентом Prontosil C 18, 5 мкм. Як рухому фазу застосовували суміш ацетонітрилу з 0,2 М розчином літію перхлорату у 0,005 М розчині кислоти хлорної; лінійний градієнт від елюенту А (5 % ацетонітрилу та 95% буферного розчину) до елюенту Б (100% ацетонітрилу) протягом 40 хв, швидкість елюювання 100 мкл/хв; оптимальний тиск насосом 2,8 – 3,2 МПа, температурний режим колонки 37 – 40°C; об'єм проби для введення – 4 мкл. Багатоканальне детектування речовин за значеннями 8 довжин хвиль (210, 220, 230, 240, 250, 260, 280 та 300 нм) проводили із застосуванням УФ-спектрофотометра (рис. 1, табл.1).

В.О.

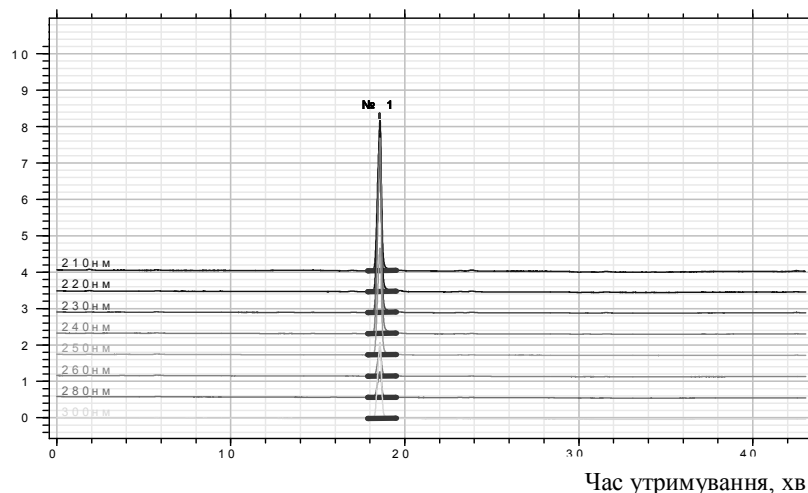


Рис.1 Хроматограма хлоропіраміну гідрохлориду (концентрація 20,0 мкг/мл)

Параметри утримування хлоропіраміну та антигістамінних препаратів ($n = 5$)

Речовини	Параметри утримування речовин		Коефіцієнт симетрії	Коефіцієнт ємності, k'
	$t_{абс}, хв$	$V_{абс}, мкл$		
Хлоропірамін	18,56 \pm 0,03	1855,9	0,81	11,37
Дифенгідрамін	20,29 \pm 0,02	2029,2	0,92	12,53
Квіфенадін	20,26 \pm 0,02	2026,4	1,01	12,51
Мебгідролін	21,18 \pm 0,03	2117,5	0,89	13,12
Цетиризин	22,23 \pm 0,02	2223,2	1,08	13,82
Лоратадин	22,45 \pm 0,02	2245,1	1,21	13,97
Ципрогептадин	22,70 \pm 0,02	2269,5	0,97	14,13
Клемастин	26,00 \pm 0,03	2600,2	1,03	16,33

Встановлено, що межа виявлення хлоропіраміну гідрохлориду ВЕРХ-методом дорівнювала 10,0 мкг/мл або 40,0 нг у пробі.

Для оцінки хроматографічного розділення суміші антигістамінних препаратів розраховували параметри розділення піків (рис. 2, табл.2). Результати досліджень свідчать про придатність уніфікованих умов хроматографування для розділення багатокомпонентної суміші речовин та можуть бути рекомендовані для аналізу біологічного матеріалу на антигістамінні препарати.

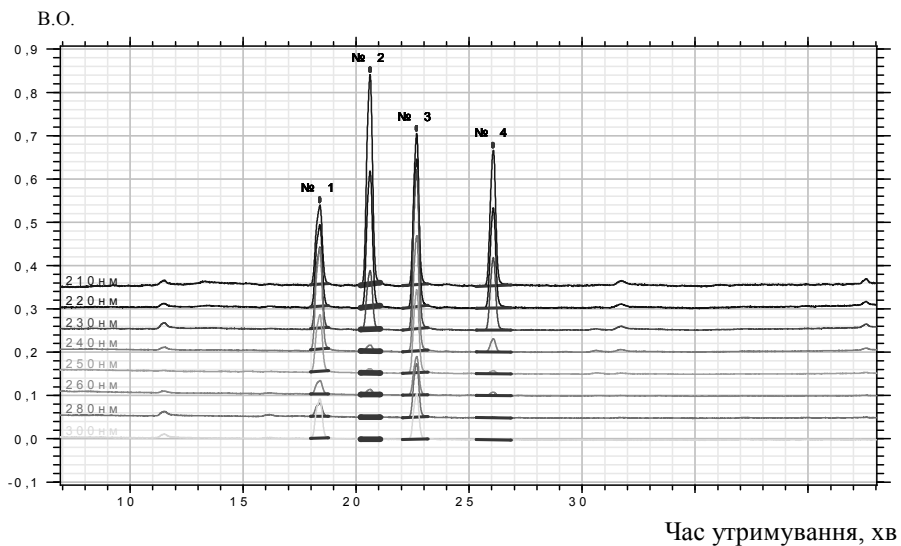


Рис. 2 Хроматографічне розділення суміші антигістамінних препаратів: 1 – хлоропіраміну (50,0 мкг/мл); 2 – дифенгідраміну (50,0 мкг/мл); 3 – ципрогептадину (70,0 мкг/мл); 4 – клемастину (50,0 мкг/мл)

Основні хроматографічні параметри розділення піків антигістамінних препаратів

Речовини	Селективність, α			Коефіцієнт розділення піків, R_s	Число теоретичних тарілок, n
Суміш хлоропіраміну, дифенгідраміну, ципрогептадину та клемастину					
Хлоропірамін	-	-	-	-	1908
Дифенгідрамін	1,1 - $\alpha_{2,1}$	-	-	2,04 - $R_{s\ 2,1}$	2281
Ципрогептадин	1,24 - $\alpha_{3,1}$	1,13 - $\alpha_{3,2}$	-	2,84 - $R_{s\ 3,2}$	2855
Клемастин	4,96 - $\alpha_{4,1}$	1,3 - $\alpha_{4,2}$	1,16 - $\alpha_{4,3}$	3,89 - $R_{s\ 4,3}$	3745
Суміш хлоропіраміну, квіфенадіну, мебгідроліну					
Квіфенадін	1,1 - $\alpha_{2,1}$	-	-	2,01 - $R_{s\ 2,1}$	2274
Мібгідролін	1,15 - $\alpha_{3,1}$	1,05 - $\alpha_{3,2}$	-	1,09 - $R_{s\ 3,2}$	2485
Суміш хлоропіраміну, лоратадину або цетиризину					
Лоратадин	1,23 - $\alpha_{2,1}$	-	-	4,59 - $R_{s\ 2,1}$	2792
Цетиризин	1,22 - $\alpha_{2,1}$	-	-	4,33 - $R_{s\ 2,1}$	2738

Ідентифікацію хлоропіраміну гідрохлориду ГРХ-методом проводили на газовому хроматографі в умовах: капілярна колонка 30м x 320 мкм з нерухомою рідиною фазою – 5%-фенілдиметилполісилоксан, 0,25 мкм.

Встановлено оптимальний температурний режим колонки при лінійному програмуванні: 5 хв при 180°C; зростання температури від 180°C до 200°C зі швидкістю 15°C/хв та від 200°C до 255°C зі швидкістю 6°C/хв; при 255°C температурний режим зберігався протягом 6 хв.

Температура випарника складала 300°C, детектора - 300°C; швидкість надання гелію в хроматографічну колонку – 60,0 мл/хв; водню при детектуванні хлоропіраміну гідрохлориду – 40,0 мл/хв; повітря – 450 мл/хв. При ГРХ-аналізі досліджували проби водного розчину хлоропіраміну гідрохлориду з концентрацією 0,25 – 2,0 мкг/мкл. Введення досліджуваної проби об'ємом 1 мкл виконували за допомогою мікрошприца «Hamilton» місткістю 10 мкл.

У результаті досліджень встановлено, що час утримування хлоропіраміну гідрохлориду складав $16,1 \pm 0,2$ хв, коефіцієнт симетрії – 1,0; число теоретичних тарілок – 1441,4, що свідчило про селективність і придатність запропонованої хроматографічної системи для проведення аналізу в біологічних об'єктах. Межа виявлення складала 0,1 мкг/мл, що відповідало вмісту хлоропіраміну гідрохлориду 0,1 нг в пробі (рис. 3).

При виборі оптимальних умов аналізу хлоропіраміну гідрохлориду методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій області спектру, придатних для ХТА, отримано УФ-спектри поглинання розчинів хлоропіраміну гідрохлориду у воді, етанолі, 0,1 М розчині кислоти хлоридної та 0,01 М розчині натрію гідроксиду з концентрацією 20,0 мкг/мл при застосуванні спектрофотометра, кюве-

ти товщиною 10 мм, у діапазоні 220-350 нм, розчини порівняння – відповідні розчинники.

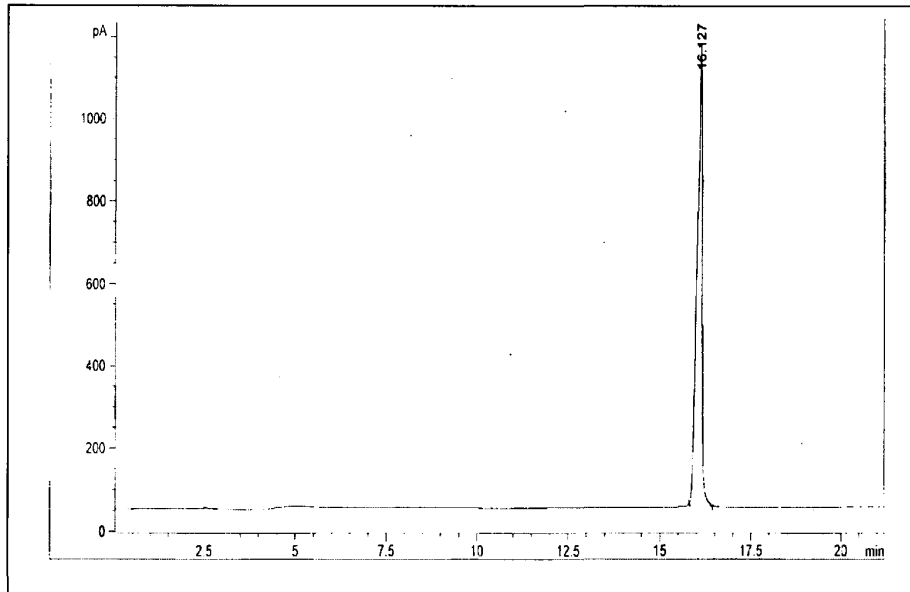


Рис. 3 Хроматограма водного розчину хлоропіраміну гідрохлориду (2,0 мкг/мкл) в розроблених умовах ГРХ-аналізу

Встановлено, що оптимальними умовами, які забезпечували найбільшу чутливість аналізу, було застосування 0,1 М розчину кислоти хлоридної, λ_{\max} 312 ± 2 нм, межа виявлення – 5,0 мкг/мл.

Розробка методик кількісного визначення хлоропіраміну гідрохлориду

Кількісне визначення хлоропіраміну гідрохлориду проводили фізико-хімічними методами (ВЕРХ, ГРХ, методами абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій області спектру та екстракційної фотометрії).

При виборі оптимальних умов екстракційно-фотометричного аналізу хлоропіраміну вивчено вплив рН середовища, наявності та розташування замісників у будові індикаторів на утворення та екстрагування іонних асоціатів хлоропіраміну із сульфогалеїновими барвниками - бромтимоловим синім (БТС), бромфеноловим синім (БФС), бромкрезоловим пурпуровим (БКП) та бромкрезоловим зеленим (БКЗ), які широко застосовуються у ХТА (рис. 4).

В результаті дослідження встановлено оптимальні умови визначення хлоропіраміну екстракційно-фотометричним методом: використання 4,0 мл буферного розчину Бріттона-Робінсона (рН 7,0); 5,0 мл реактиву БТС; одноразова екстракція іонних асоціатів 10,0 мл хлороформу, визначення оптичної густини на спектрофотометрі при $\lambda_{\max} = 410 \pm 2$ нм; кювета товщиною 10 мм; розчин порівняння – хлороформ (питомий показник поглинання ($A_{1\%}^{1\text{см}} = 69,2$), молярний показник поглинання ($\epsilon = 2258$).

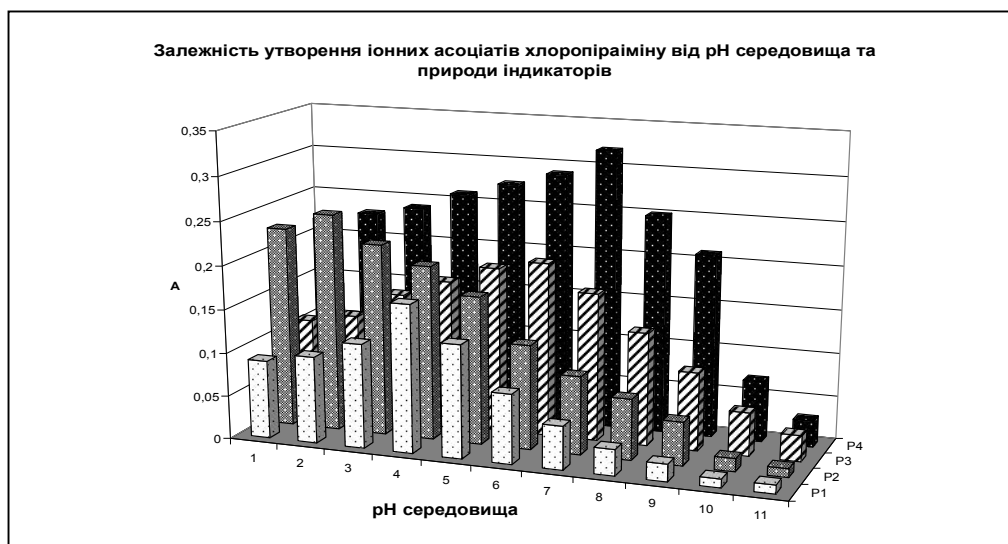


Рис. 4 Залежність оптичної густини забарвлених розчинів, які містили іонні асоціати хлоропіраміну із індикаторами від рН середовища: -БФС, - БКП, -БКЗ, - БТС

Встановлено склад іонних асоціатів хлоропіраміну та БТС (1:1) та значення константи дисоціації $0,306 \cdot 10^{-6}$ (метод ізомольних серій) або $1,546 \cdot 10^{-6}$ (методом “насичування”), які свідчать про близькі значення констант дисоціації, отриманих при застосуванні різних методів.

Для розрахунку вмісту хлоропіраміну гідрохлориду в модельних розчинах хроматографічними та спектральними методами застосовували градуювальні графіки або відповідні рівняння прямих. Результати досліджень наведені у табл. 3.

Таблиця 3

Результати кількісного визначення хлоропіраміну гідрохлориду у модельних розчинах хроматографічними та спектральними методами

Метод аналізу	Коефіцієнти регресії градуювальних графіків		Коефіцієнт кореляції (R)	Інтервал лінійності графіка, мкг/мл	Нижня межа визначення, мкг/мл	$\bar{\varepsilon}$, % (n = 5, P = 95%)
	а	в				
Спектрофотометрія в УФ-області спектру	-0,018	0,024	0,999	5,0 – 35,0	5,0	± 1,95
Екстракційна фотометрія	-0,00007	0,00692	0,999	15,0-125,0	15,0	± 2,16
ВЕРХ-метод	0,00041	0,00029	0,999	10,0-200,0	10,0	± 1,91
ГРХ-метод	$-0,12 \cdot 10^3$	$4,01 \cdot 10^3$	0,999	0,25 - 2,0	0,25	± 2,11

Аналіз хлоропіраміну гідрохлориду методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій області спектра проводили при використанні 0,1 М розчину кислоти хлоридної як розчинника, λ_{\max} 312 ± 2 нм.

Для хлоропіраміну гідрохлориду розроблено методики кількісного визначення за допомогою ВЕРХ- і ГРХ-методів в умовах, запропонованих для ідентифікації препарату. Кількісне визначення хлоропіраміну гідрохлориду виконували методом абсолютного калібрування за площею піків.

Дослідження ступеню екстракції хлоропіраміну з водних розчинів органічними розчинниками

Вивчено вплив факторів (природа екстрагенту, рН середовища, наявність та концентрація висолювача) на ступінь екстракції хлоропіраміну з водних розчинів органічними розчинниками при застосуванні методу математичного планування експерименту (рис. 5).

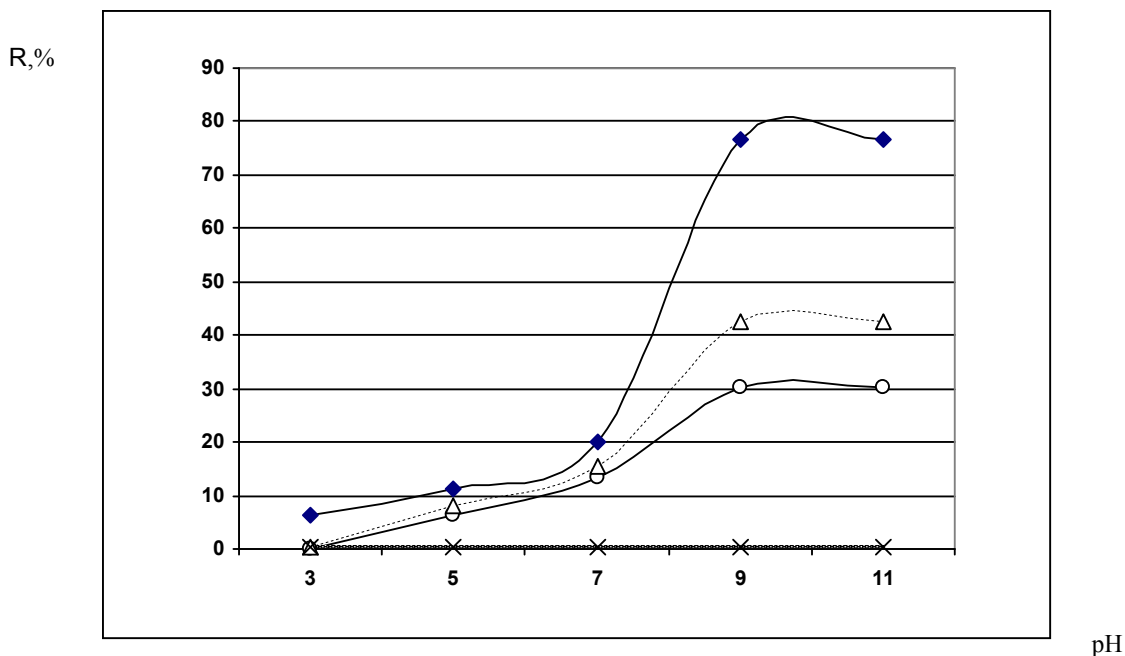


Рис. 5 Залежність ступеня екстракції хлоропіраміну з водних розчинів від рН середовища і природи органічних розчинників: – Δ– етилацетат; – ○– бензол; – ■– хлороформ; – x– гексан

Розробка методик ізолювання хлоропіраміну із біологічного матеріалу

При дослідженні ізолювання хлоропіраміну з біологічного матеріалу та біологічних рідин використовували модельні суміші 10,0 г подрібненої тканини печінки тварини, що не зазнала гнилісних змін, 10,0 мл крові і сечі та 1,0 мг препарату, контрольні проби.

Кількість хлоропіраміну гідрохлориду, що використовували для проведення модельних дослідів, було розраховано, виходячи з даних літератури щодо кількості препарату при токсичних враженнях людини. Нами були розроблені модифіковані методики ізолювання хлоропіраміну за методами О.О. Васильєвої, Стаса-Отто, В.П. Крамаренка, хлороформом і ацетонітрилом.

Очищення екстрактів було проведено екстракційним методом при застосуванні гексану та ТШХ-методом в умовах: система рухомих органічних розчинників – етилацетат – метанол – 25% розчин аміаку (85:10:5); хроматографічні пластини Сорбфіл ПСТХ –АФ – А; проявник – реактив Драгендорфа за Муньє (чутливість проявника – 1,0 мкг речовин у пробі); R_f хлоропіраміну = 0,60 – 0,63; домішки – на лінії старту або на лінії фінішу. Після очищення кількість хлоропіраміну у витягах визначали методами спектрофотометрії в УФ-області спектра, екстракційної фотометрії та ВЕРХ-методом (рис. 6).

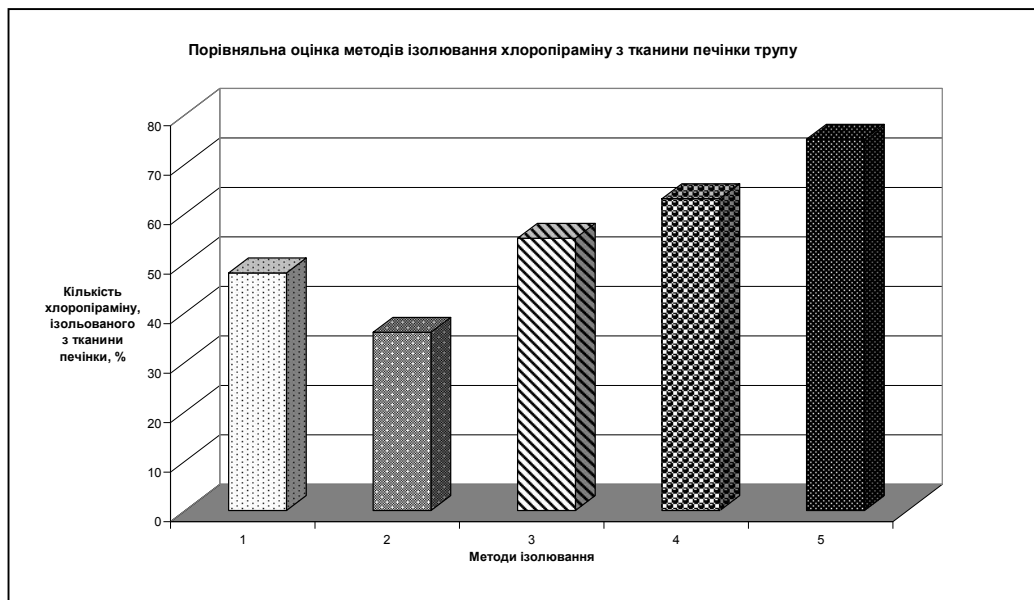


Рис. 6 Результати порівняльної оцінки методів ізолювання хлоропіраміну:

- 1 – Васильєвої О.О. (водою, підкисленою оксалатною кислотою);
- 2 – Стаса-Отто (етанолом, підкисленим оксалатною кислотою);
- 3 – Крамаренка В.П. (водою, підкисленою сульфатною кислотою);
- 4 – ізолювання ацетонітрилом;
- 5 – ізолювання хлороформом

Для вибору об'єктів при проведенні ХТА вивчено розподіл хлоропіраміну в органах отруєних тварин. Хлоропіраміну гідрохлорид вводили щурам у шлунок у вигляді суспензії у воді, що містить $218,5 \pm 2,5$ мг препарату (LD_{50} становить для щурів 920 мг/кг при пероральному застосуванні). Через 5 год щурів декапітували.

Для дослідження брали кров, серце, мозок, печінку, нирки, легені, селезінку, шлунок та кишківник із вмістом. Виділення хлоропіраміну із органів проводили із використанням модифікованої методики О.О. Васильєвої, яка застосовується при проведенні судово-токсикологічних експертиз.

Для очищення витягів домішки екстрагували гексаном при рН 2,0. Кількісне визначення проводили найбільш чутливим ГРХ-методом за методикою абсолютного калібрування. Встановлено, що найбільшу кількість хлоропіраміну визначено у нирках, селезінці та печінці; значно меншу кількість досліджуваної речови-

ни знайдено у кишківнику із вмістом, шлунку із вмістом, легенях, мозоку, серці та крові (рис. 7). Аналіз хлоропіраміну ГРХ/МС-методом виконували на газовому хроматографі Hewlett Packard HP-6890/5972A з мас-селективним детектором. Розділення компонентів суміші проводили на капілярній колонці Rxi-5MS (5% Diphenyl Methyl Siloxane), 30 м x 250 мкм, 0,25 мкм. За хроматограмами проводили пошук з використанням бібліотек мас-спектрів “Nist 02 Spectra Lib” и “Wiley 138”.

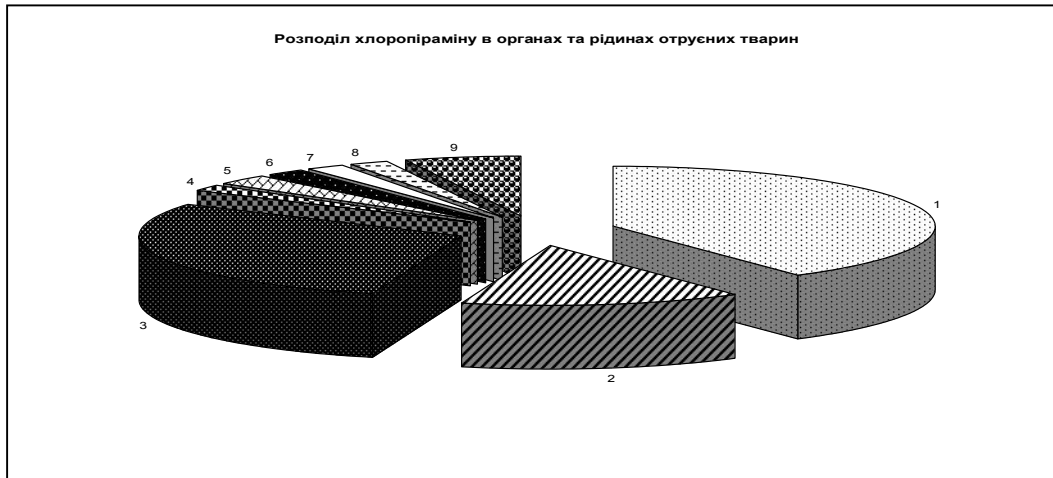


Рис. 7 Розподіл хлоропіраміну в органах та рідинах отруєних тварин (мг на 100 г об'єкту): 1-нирки, 2-печінка, 3-селезінка, 4- шлунок із вмістом, 5- кишківник із вмістом, 6-серце, 7-легені, 8-мозок, 9-кров

Для отримання надійних та відтворюваних результатів проводили дериватизацію екстрактів з органів отруєних тварин (рис.8) у напрямках: силілування, застосовуючи реактив – біс-[триметилсиліл]трифлуор-ацетамід (BSTFA) та подвійного метилювання.

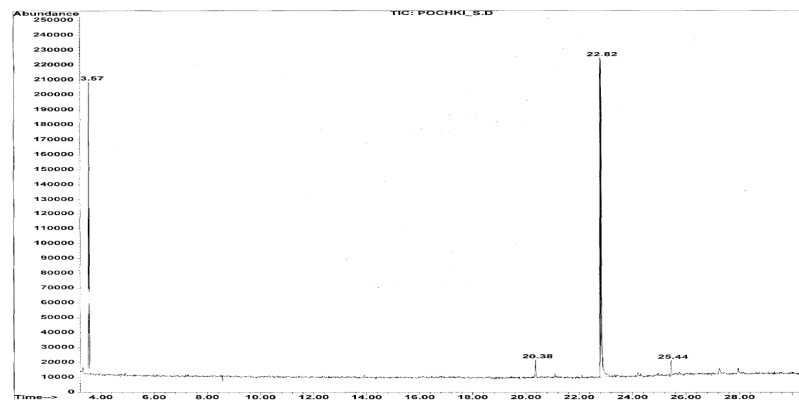


Рис. 8 ГРХ-хроматограма дериватизованого екстракту нирок щурів

Встановлено, що на ГРХ-хроматограмі дериватизованого екстракту нирок отруєних тварин чітко виявляються піки з часом утримування: 3,57; 20,38; 22,82

та 25,44 хв, що свідчить про наявність нативної форми хлоропіраміну, реактиву для дериватизації та фталатів.

Пік з часом утримування 22,82 хв свідчить про присутність в екстракті нативної форми хлоропіраміну (М.м. 289), мас-спектр якої має характерні іони m/z : 58, 125, 71, 72, 127, 79, 219 (рис. 9).

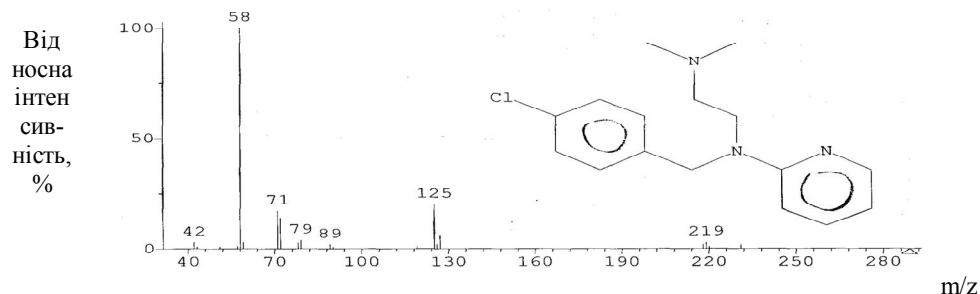


Рис. 9 Мас-спектр витяга з нирок за часом утримування 22,82 хв (наявність нативної форми хлоропіраміну)

В результаті досліджень витягів з органів отруєних тварин встановлено, що у кишківнику із вмістом, шлунку із вмістом, серці, мозоку, легенях, крові ідентифікували лише нативну речовину – хлоропірамін та були зафіксовані вищезазначені фонові сигнали.

Нами визначено термін зберігання хлоропіраміну в біологічному матеріалі при його гнитті при температурі 5°C 7, 14, 21 та 28 днів. Ізолювання хлоропіраміну проводили методом Стаса-Отто, рекомендованого для судово-токсикологічного аналізу біологічного матеріалу при його гнитті. Очищення витягів виконували екстракцією гексаном та ТШХ-методом, кількісне визначення хлоропіраміну проводили методом спектрофотометрії в УФ-області у розроблених умовах. Встановлено, що через 21 день зберігання досліджуваної речовини при гнитті у печінці трупа можна виявити 13,8% хлоропіраміну; через 28 днів зберігання виявити хлоропірамін неможливо (рис. 10).

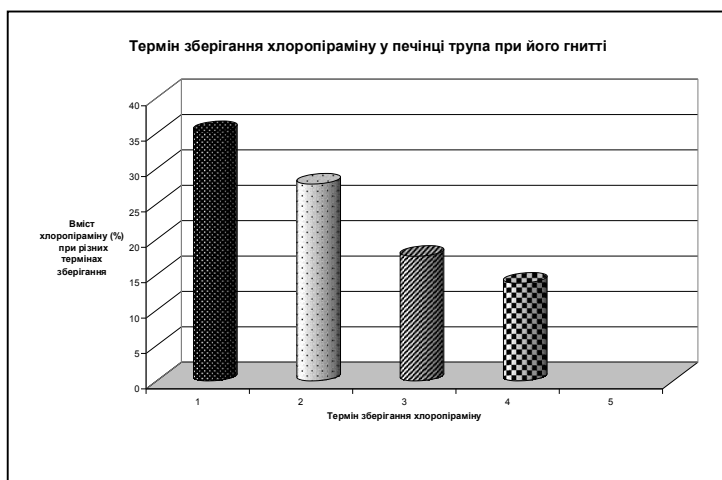
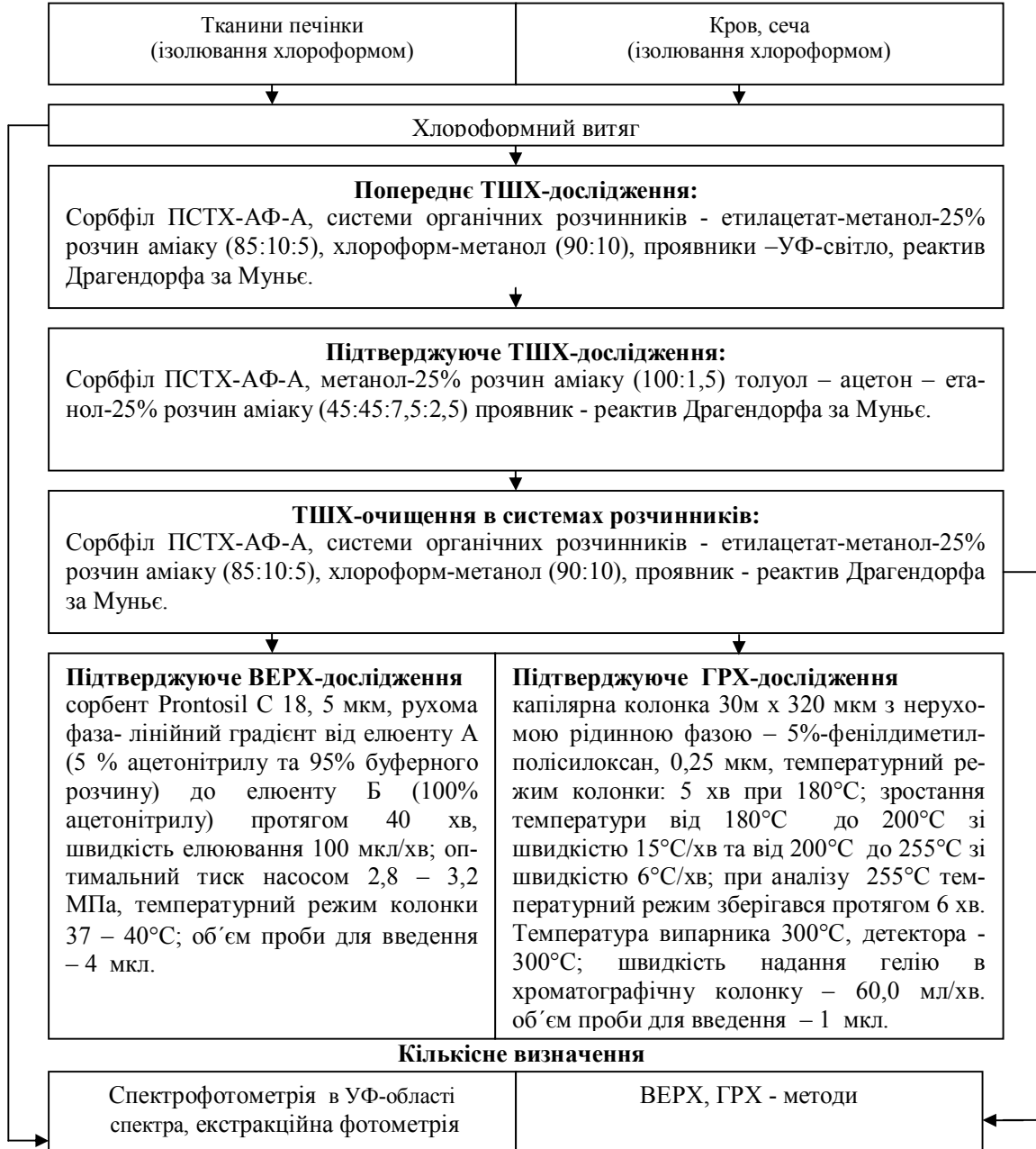


Рис. 10 Зберігання хлоропіраміну у печінці трупа при його гнитті: 1 – початковий вміст; 2 – через 7 днів; 3 – 14 днів; 4 – 21 день; 5 – 28 днів

В результаті досліджень нами розроблена схема спрямованого аналізу біологічного матеріалу на хлоропірамін.

Схема

Спрямований аналіз хлоропіраміну в тканині печінки, крові та сечі трупа



Фрагменти схеми впроваджено у практику судово-токсикологічних відділень та у навчальний процес медичних вишів. Наукова новизна результатів роботи підтверджена патентом та інформаційними листами.

ВИСНОВКИ

Вперше на основі комплексних систематичних досліджень наведено теоретичне узагальнення та вирішення наукового завдання, що виявляється в розробці методів ХТА хлоропіраміну, обґрунтовано схему спрямованого ХТА біологічного матеріалу на хлоропірамін, що містить методики його ізолювання із біологічного матеріалу, очищення отриманих витягів, ідентифікації та кількісного визначення.

1. Розроблено чутливі методики ідентифікації хлоропіраміну гідрохлориду за допомогою ТШХ, ВЕРХ, ГРХ-методів.

Вивчено хроматографічну поведінку хлоропіраміну у присутності антигістамінних препаратів ТШХ-методом. Встановлено, що найбільш придатні умови для ХТА хлоропіраміну: систему рухомих розчинників – етилацетат – метанол – 25% розчин аміаку (85:10:5), хроматографічні пластинки Сорбфіл – ПТСХ – АФ – А, R_f хлоропіраміну = 0,60-0,63. При скринінгових дослідженнях суміші хлоропіраміну та антигістамінних препаратів рекомендовано систему розчинників та хроматографічні пластинки: хлороформ-метанол (90:10), Сорбфіл ПСТХ-АФ-А (R_f лоратадину = 0,96, R_f мекгидроліну = 0,79, R_f ципрогептадину = 0,70, R_f дифенгідраміну = 0,52, R_f хлоропіраміну = 0,44, R_f клемастину = 0,37, R_f квіфенадіну = 0,13 та R_f цетиризину = 0,06).

За результатами досліджень вивчено поведінку хлоропіраміну та антигістамінних препаратів методом ВЕРХ. Встановлено їх основні параметри утримування, спектральні відношення та основні параметри розділення піків речовин в умовах аналізу. Межа виявлення хлоропіраміну гідрохлориду ВЕРХ-методом – 40,0 нг в пробі.

Встановлено температурну програму та нерухому рідинну фазу у сукупності з рештою параметрів хроматографічного процесу, які забезпечували розробку ГРХ-методики аналізу хлоропіраміну гідрохлориду, придатну для хіміко-токсикологічного дослідження. Межа виявлення хлоропіраміну гідрохлориду ГРХ-методом – 0,10 нг в пробі.

2. Розроблено методики кількісного визначення хлоропіраміну гідрохлориду, придатні для ХТА (ВЕРХ, ГРХ-методики, екстракційна фотометрія).

Запропоновано методику екстракційно-фотометричного визначення хлоропіраміну гідрохлориду з використанням бромтимолового синього, що дає можливість визначити препарат у межах концентрацій 15,0 – 125,0 мкг/мл. Відносна невизначеність середнього результату становить $\pm 2,16\%$.

Визначено умови аналізу хлоропіраміну гідрохлориду методом абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій області спектра, придатні для ХТА. Встановлено, що препарат можливо визначити у межах концентрацій 5,0 – 35,0 мкг/мл. Відносна невизначеність середнього результату становить $\pm 1,95\%$.

Запропоновано методики кількісного визначення хлоропіраміну ВЕРХ- та ГРХ-методами. Встановлено, що препарат можливо визначити ВЕРХ-методом у межах концентрацій 10,0 – 200,0 мкг/мл, відносна невизначеність середнього результату становить $\pm 1,91\%$; ГРХ-методом – у межах концентрацій 0,25 – 2,0 мкг/мл, відносна невизначеність середнього результату – $\pm 2,11\%$.

3. Вивчено вплив факторів (природа екстрагента, рН середовища, наявність та концентрація висолювача) на ступінь екстракції хлоропіраміну з водних розчинів органічними розчинниками при застосуванні методу математичного планування експерименту.

Встановлено, що оптимальними значеннями для екстракції хлоропіраміну з водної фази (76,6%) є використання хлороформу як екстрагента при рН 9,0 – 10,0. Введення висолювача не має значного впливу на кінцевий результат екстрагування.

4. За результатами порівняння вперше встановлено ефективність загальноприйнятих у ХТА методів ізолювання органічних сполук. Розроблено ефективну методику ізолювання хлоропіраміну за допомогою хлороформу з наступним очищенням екстракційним та ТШХ-методами, що дозволяє виділити до $73,4 \pm 3,51\%$ хлоропіраміну. Розроблено методики ізолювання хлоропіраміну з біологічних рідин організму (крові та сечі), що дозволяють виділити до $38,6 \pm 4,22\%$ та $56,4 \pm 3,15\%$ речовини відповідно.

5. Запропоновано методики очищення витягів з біологічних об'єктів екстракційним методом при застосуванні гексану (рН 2,0) та ТШХ-методом в умовах – система рухомих розчинників – етилацетат – метанол – 25% розчин аміаку (85:10:5); хроматографічні пластини Сорбфіл ПСТХ-АФ-А; проявник – реактив Драгендорфа за Муньє.

6. Встановлено, що за розробленими ГРХ/МС-методиками хлоропірамін можливо виявити у витягах з органів та рідин отруєних шурів (нирках, селезінки, печінці; кишківнику із вмістом, шлунку із вмістом, легенях, мозоку, серці та крові).

7. Встановлено термін зберігання хлоропіраміну в біологічному матеріалі при його гнитті – через 21 день зберігання досліджуваної речовини у печінці трупа при її гнитті можна виявити 13,8% хлоропіраміну; через 28 днів зберігання хлоропірамін виявити неможливо.

8. За результатами досліджень запропоновано схему спрямованого аналізу біологічного матеріалу на хлоропірамін.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Лебедин, А. М. Використання ВЕРХ-методу для ідентифікації та кількісного визначення хлоропіраміну / А. М. Лебедин, О. О. Маміна, Н. Ю. Бевз // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2011. – Т. 6, – № 3 – С. 132-134. *(Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка статті).*

2. Лебедин, А. М. Вибір оптимальних умов аналізу хлоропіраміну методом УФ-спектрофотометрії, придатних для хіміко-токсикологічних досліджень / А. М. Лебедин, О. О. Маміна, Л. І. Боряк // Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика. – 2012. – Вип. 21., кн. 4. – С. 313-318. *(Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка статті).*

3. Лебедин, А. М. Ідентифікація та розділення антигістамінних препаратів при їх сумісній присутності методом вискоефективної рідинної хроматографії /

А. М. Лебедин, О. О. Маміна // Фармацевт. журн. – 2011. – № 4. – С. 83-85. *(Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка статті).*

4. Лебедин, А. Н. Использование хлороформа для экстракции хлоропирамиды гидрохлорида из биологического материала / А. Н. Лебедин, Е. А. Мамина, З. И. Коваленко // Фармація Казахстана. – 2014. – № 7. – С. 30-32. *(Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка статті).*

5. Лебедин, А. М. Екстрагування хлоропіраміну гідрофільними розчинниками з біологічного матеріалу // А. М. Лебедин, О. О. Маміна // Укр. біофарм. журн. – 2014. – Т. 34, № 5. – С. 79-82. *(Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка статті).*

6. Визначення хлоропіраміну у біологічних рідинах методом екстракційної фотометрії / О. О. Маміна, Л. І. Рибалка, А. М. Лебедин, Г. А. Нікульшина // Укр. біофарм. журн. – 2015. – Т. 39, № 4 – С. 67-70. *(Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка статті).*

7. Патент на корисну модель № 89401 Україна, МПК G01N30/02. Спосіб визначення хлоропіраміну гідрохлориду методом газо-рідинної хроматографії / А. М. Лебедин, О. О. Маміна, Є. Л. Бондаренко. – № u 2013 09835; заявл. – 08.08.2013р.; опубл. 25.04. 2014 р. – Бюл. № 8. – 6 с. *(Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка опису патенту, обґрунтування формули корисної моделі).*

8. Лебедин, А. М. Застосування багатоканального детектування при ВЕРХ-аналізі антигістамінних засобів / А. М. Лебедин, О. О. Маміна // Новини на научний прогрес 2011 : матеріали за VII Міжнародна научна практична конференція. – Софія, Республіка Б'юлгарія : Б'юл ГРАД-БГ, 2011. – Т. 8. – С. 49-53. *(Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка тез).*

9. Лебедин, А. М., Вибір оптимальних умов ідентифікації хлоропіраміну методом газо-рідинної хроматографії, придатних для судово-медичної експертизи / А. М. Лебедин, О. О. Маміна, Є. Л. Бондаренко, Г. А. Нікульшина // Медицина третього тисячоліття: тез. допов. міжвуз. конф. молодих вчених та студентів. – Х. : ХНМУ, 2012. – С. 29-30. *(Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка тез).*

10. Лебедин, А. М. Ідентифікації та кількісного визначення хлоропіраміну методом похідної спектрофотометрії / А. М. Лебедин, В. А. Горох, О. О. Маміна // Актуальні питання створення нових лікарських засобів : тез. доп. Всеукр. наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених. – Х. : НФаУ, 2012. – С. 140. *(Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка тез).*

11. Дослідження антигістамінних препаратів методом тонкошарової хроматографії / О. О. Маміна, А. М. Лебедин, Є. Л. Бондаренко, Н. О. Шум // Питання судової медицини та експертної практики : XI зб. наук. праць, присвячена

90-річчю Донецької судово-мед. експертизи. – Донецьк, 2013. – С. 101-102. *(Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка тез).*

12. Lebedin, A. M. Isolation of chloropyramine from liver tissue of corpses / A. M. Lebedin, O. O. Mamina, Z. I. Kovalenko // Skutečné vědecké úspěchy : Mezinárodní vědecká a praktická conference, 27-30 června 2014 roku. – Praha, Česká republika : Education and Science, 2014. – Vol. 12. – P. 29-30. *(Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка тез).*

13. Investigation of chloropyramine in the rotting biological material / A. M. Lebedin, O. O. Mamina, E. I. Othmani, A. Balhau // Actual Questions of Development of New Drugs : XXII International Scientific And Practical Conference of Young Scientists and Students, April 23, 2015, Kharkiv. – Kharkiv, 2015. P. 134. *(Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка тез).*

14. Лебедин, А. М. Методика аналізу антигістамінних препаратів за допомогою високоефективної рідинної хроматографії : інформ. лист № 190 / А. М. Лебедин, О. О. Маміна. – К., 2011. – Вип. 9. – 4 с. *(Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка інформаційного листа).*

15. Маміна, О. О. Скринінг антигістамінних препаратів у біологічних об'єктах методом тонкошарової хроматографії : інформ. лист № 211 / О. О. Маміна, Л. І. Рибалка, А. М. Лебедин. – К., 2015. – Вип. 11. – 4 с. *(Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка інформаційного листа).*

16. Маміна, О. О. Хіміко-токсикологічне дослідження хлоропіраміну : метод. рек. / О. О. Маміна, А. М. Лебедин, З. І. Коваленко. – К., 2014. – 17 с. *(Особистий внесок здобувача – проведення експериментальних досліджень, аналіз та узагальнення отриманих даних, підготовка методичних рекомендацій).*

Лебедин А. М. Хіміко-токсикологічне дослідження хлоропіраміну гідрохлориду. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія. – Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2016.

Дисертацію присвячено хіміко-токсикологічному аналізу хлоропіраміну гідрохлориду. Розроблено методики ідентифікації хлоропіраміну при скринінгових дослідженнях і комбінованих отруєннях у присутності антигістамінних препаратів (дифенгідраміну гідрохлориду (димедролу), клемастину гідрофумарату (тавегілу), квіфенадіну (фенкаролу), ципрогептадину гідрохлориду (перитолу), мебгідроліну (діазоліну), лоратадину та цетиризину гідрохлориду) за допомогою методів ТШХ, ВЕРХ, ГРХ.

Розроблено методики кількісного визначення хлоропіраміну гідрохлориду за допомогою спектрофотометрії в УФ-області спектра, екстракційної фотометрії, ВЕРХ, ГРХ, придатні для цілей хіміко-токсикологічного аналізу.

Порівняно ефективність загальних методів ізолювання органічних сполук щодо хлоропіраміну. Розроблено індивідуальний метод ізолювання хлоропіраміну хлороформом із біологічного матеріалу. Запропоновано методику очищення хлоропіраміну від співекстрактивних речовин у витягах із біологічного матеріалу із застосуванням екстракції гексаном і ТШХ-методом.

Вивчено розподіл хлоропіраміну в органах отруєних тварин. Встановлено, що при летальних отруєннях хлоропіраміну необхідно досліджувати шлунок і кишківник із вмістом, селезінку, печінку, легені, мозок, нирки. При застосуванні ГРХ/МС – методики проведено ідентифікування хлоропіраміну у витягах з органів отруєних тварин. Встановлено термін зберігання хлоропіраміну в біологічному матеріалі при його гнитті.

Обґрунтовано схему спрямованого хіміко-токсикологічного аналізу біоматеріалу на хлоропірамін. Наукова новизна результатів роботи підтверджена патентом та інформаційними листами.

Ключові слова: хлоропіраміну гідрохлорид, антигістамінні препарати, хіміко-токсикологічний аналіз.

Лебедин А. Н. Химико-токсикологическое исследование хлоропирамина гидрохлорида. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия. – Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, Харьков, 2016.

Диссертационная работа посвящена химико-токсикологическому исследованию хлоропирамина гидрохлорида. Идентификацию хлоропирамина проводили физико-химическими (ТСХ, ВЭЖХ, ГЖХ) методами.

Изучено хроматографическое поведение хлоропирамина в присутствии антигистаминных препаратов: дифенгидрамина гидрохлорида (димедрола), клемастина гидрофумарата (тавегила), квивинадина (фенкарола), ципрогептадина гидрохлорида (перитола), мебгидролина (диазолина), лоратадина и цетиризина гидрохлорида ТСХ-методом с использованием трех типов хроматографических пластин и 17 систем растворителей. Установлено, что наиболее чувствительными проявителями при ТСХ-анализе хлоропирамина являются УФ-свет ($\lambda = 254$ нм) и реактив Драгендорфа, модифицированный по Мунье.

При ВЭЖХ-анализе хлоропирамина гидрохлорида и антигистаминных препаратов установлены основные параметры идентификации: время и объем удерживания, спектральные отношения, а также параметры разделения пиков. Установлено, что минимальная концентрация хлоропирамина гидрохлорида в растворе, которую можно определить при помощи разработанной методики, равна 10,0 мкг/мл, что соответствует содержанию 40,0 нг вещества в пробе. В результате ГЖХ-анализа установлено, что разработанная хроматографическая методика характеризуется селективностью и высокой чувствительностью, так как минимальная концентрация хлоропирамина гидрохлорида в растворе, которую можно

определить, равна 0,1 мкг/мл, что соответствует содержанию вещества 0,1 нг в пробе. Идентификацию хлоропирамина гидрохлорида методом спектрофотометрии в УФ-области спектра проводили в условиях, обеспечивающих наибольшую чувствительность анализа – растворитель – 0,1 М раствор кислоты хлоридной, λ_{\max} 312 ± 2 нм. Предел обнаружения препарата – 5,0 мкг/мл.

Разработаны методики количественного определения хлоропирамина гидрохлорида, пригодные для ХТА (ВЭЖХ, ГЖХ-методики, экстракционная фотометрия). Методика экстракционно-фотометрического определения хлоропирамина гидрохлорида с использованием бромтимолового синего позволяет определить препарат в пределах концентраций 15,0 – 125,0 мкг/мл, относительная неопределенность среднего результата – ± 2,16%. При проведении исследований установлено, что методом абсорбционной спектрофотометрии в ультрафиолетовой области спектра можно определить хлоропирамина гидрохлорид в пределах концентраций 5,0 – 35,0 мкг/мл, относительная неопределенность среднего результата – ± 1,95%. При использовании разработанных ВЭЖХ- и ГЖХ-методик количественного определения хлоропирамина гидрохлорида можно определить препарат в пределах концентраций 10,0 – 200,0 мкг/мл, относительная неопределенность среднего результата – ± 1,91% (ВЭЖХ-метод); в пределах концентраций 0,25 – 2,0 мкг/мл, относительная неопределенность среднего результата – ± 2,11% (ГЖХ-метод).

Изучено влияние факторов (природы экстрагента, рН среды, присутствия и концентрации высаливателя) на степень экстракции хлоропирамина из водных растворов органическими растворителями при использовании метода математического планирования эксперимента. Установлено, что оптимальными значениями для экстракции хлоропирамина из водной фазы (76,6%) является применение хлороформа как экстрагента при рН 9,0 – 10,0.

Проведена сравнительная оценка результатов общепринятых методов изолирования органических соединений основного характера относительно хлоропирамина. Разработана эффективная методика выделения хлоропирамина с помощью хлороформа с последующим очищением экстракционным и ТСХ-методами, что позволяет определить до 73,4 ± 3,51% хлоропирамина. Разработаны методики изолирования хлоропирамина из крови и мочи, которые позволяют определить 38,6 ± 4,22% и 56,4 ± 3,15% вещества соответственно.

Изучено распределение хлоропирамина в органах отравленных животных. Установлено, что при летальных отравлениях хлоропирамином необходимо исследовать кишечник с содержимым, печень, легкие, мозг, почки, селезенку, кровь. Идентификация хлоропирамина в полученных экстрактах из органов отравленных животных проведена ГЖХ/МС - методом.

Установлены сроки сохранения хлоропирамина в биологическом материале при его гнилом разложении – через 21 день сохранения хлоропирамина в печени трупа при ее загнивании можно определить 13,8% вещества; через 28 дней сохранения хлоропирамин определить невозможно.

В результате систематических исследований обоснована схема направленного химико-токсикологического анализа биоматериала на хлоропирамин, кото-

рая включает методики его изолирования из биологического материала, очищения полученных экстрактов, идентификации и количественного определения.

Ключевые слова: хлоропирамина гидрохлорид, антигистаминные препараты, химико-токсикологический анализ.

Lebedin A. M. Chemical-toxicological investigation of Chloropyramine hydrochloride. - A manuscript.

The dissertation for the Candidate of pharmaceutical sciences degree in the Speciality 15.00.02 – Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy. – National University of Pharmacy, Kharkov, 2016.

The thesis is devoted to the chemical-toxicological analysis Chloropyramine hydrochloride. Identification Chloropyramine was performed by physicochemical (TLC, HPLC, GLC) methods. The methods of identification Chloropyramine in screening studies and combined poisoning in the presence of antihistamines: diphenhydramine hydrochloride (dimedrolum), clemastine fumarate (tavegil), kvifenadine (phencarolum), cyproheptadine hydrochloride (peritol), mebhydrolin (diazolinum), loratadine and cetirizine hydrochloride were developed by TLC, HPLC, GLC methods.

Methods of quantitative determination chloropyramine using UV spectrophotometry, extractive photometry, HPLC, GLC suitable for the purposes of chemical-toxicological analysis were developed. A comparison of the efficiency of the common methods of isolation Chloropyramine was conducted. The method of isolating of individual Chloropyramine by chloroform from biological material was developed. The method of Chloropyramine cleaning from admixtures in extracts from biological material using hexane extraction and TLC method was proposed.

The distribution of Chloropyramine in bodies of poisonous animals was studied. It was established that the fatal poisoning Chloropyramine is necessary to examine the stomach and intestines containing, spleen, liver, lungs, brain, kidneys. When using the GLC / MS technique identification Chloropyramine in extracts from organs of animals poisoned was conducted. Set retention period Chloropyramine in biological material when it is rotting. The scheme of directed chemical-toxicological analysis of biological material on Chloropyramine was substantiated. Scientific novelty of the work is confirmed by patent and newsletters.

Keywords: Chloropyramine hydrochloride, antihistamines, chemical-toxicological analysis.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я

МОЗ – Міністерство охорони здоров'я

ТЛХ – тонкошарова хроматографія

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ГРХ – газо-рідинна хроматографія

ГРХ/МС – газо-рідинна хромато-мас-спектрометрія

ХТА – хіміко-токсикологічний аналіз

LIST OF ABBREVIATIONS

WHO - World Health Organization

MoH - Ministry of Health

TLC - thin layer chromatography

HPLC - high performance liquid chromatography

GLC - gas-liquid chromatography

GLC / MS - gas-liquid chromatography- mass-spectrometry

CTA - chemical-toxicological analysis