



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **104479** (13) **C2**
(51) МПК
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

- (21) Номер заявки: **а 2012 02257**
(22) Дата подання заявки: **27.02.2012**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.02.2014**
(41) Публікація відомостей про заяву: **25.06.2012, Бюл.№ 12**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.02.2014, Бюл.№ 3**
(72) Винахідник(и):
Ковальська Олена Василівна (UA),
Маміна Олена Олександрівна (UA),
Безуглий Петро Овксентійович (UA)
(73) Власник(и):
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ,
вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Кубрак З. В. Определение этацитина в трупном материале / З. В. Кубрак, В. И. Попова // Судебно-мед. экспертиза. - 1994. - № 2. - С. 24-25.
Simultaneous determination of lincomycin and virginiamycin M1 in swine muscle, liver and kidney by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry / W.M. Sin Delia, C. Ho, Y.C.Wong et al. // Anal. chim. acta. - 2004. - Vol.517, № 1-2. - С. 39-45.
Медведева Ю. П. Дослідження ефективності методів ізолювання дилтіазему з біологічного матеріалу / Ю. П. Медведева, В. С. Бондар // Мед. хімія. - 2004. - № 2. - С. 97-100.
New and rapid fully automated method for determination of tazobactam and piperacillin in fatty tissue and serum by column switching liquid chromatography / R. Frittlar, M. Ehrlich, T.J.Galla et al. // J. Chromatogr.B - 2002. - Vol. 780, № 2. - P. 127-132.
Саломатин Е. М. Экспресс-метод изолирования производных фенотиазина из трупного материала // Судебно-мед. экспертиза. - 1989. - № 1. - С. 39-40.
Виділення фентанілу з органів трупу при застосуванні ацетонітрилу та ацетону / Е. І. Стадніченко, В. В. Болотов, В. С. Бондар, О. О. Маміна // Фармац. журн. - 1993. - № 4. - С. 66-68.
Маміна О.О. Розробка та удосконалення методів аналізу органічних лікарських речовин загального дослідження при проведенні судово-медичних експертиз. Автореферат дис... докт.фарм.наук. Харків - 2008, с.36.
Erceg Marijana et al. A LC-MS-MS Method for Determination of Low Doxazosin Concentrations in Plasma after Oral Administration to Dogs. Journal of Chromatographic Science, 2010, Vol. 48, P.114-119.
Ковальська, О.В. Хіміко-токсикологічне дослідження доксазозину : автореф. дис. ... канд. фармац. наук : 15.00.02 / О.В. Ковальська. - Х., 2012. - 24 с.

UA 104479 C2**(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ДОКСАЗОЗИНУ У БІОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ****(57) Реферат:**

Винахід належить до аналітичної хімії, а саме до способів визначення доксазозину у біологічному матеріалі при застосуванні екстракції ацетонітрилом і може застосовуватися для

визначення зазначеної речовини у фармацевтичному аналізі та при хіміко-токсикологічних дослідженнях, зокрема в судовій експертизі. Заявлений спосіб здійснюють шляхом екстрагування тканин печінки труп (проба 10,0 г) ацетонітрилом двічі об'ємами розчинника - 25,0 та 10,0 мл протягом 10 хвилин для кожної екстракції при підкислюванні проби 10 % розчином кислоти хлористоводневої до рН 2,0-2,5. Очищення ацетонітрильних витяжок здійснюється за допомогою висолювача - 2,5 % розчину натрію сульфату. Екстрагування доксазозину проводять хлороформом двічі по 10,0 мл з водно-органічної фази (рН 2,0-2,5) та двічі по 10,0 мл хлороформом - після підлогування водно-органічної фази 25 % розчином амонію гідроксиду до рН 9,0-10,0. Для очищення руйнують водно-хлороформні емульсії центрифугуванням. Отримані хлороформні екстракти випаровують до сухого залишку, який додатково очищують при розчиненні у 20,0 мл 0,1 М кислоти хлористоводневої та екстракції домішок гексаном тричі по 5,0 мл. Гексанові екстракти відкидають. Очищені хлористоводневі розчини випаровують на водяній бані до сухого залишку та очищують методом тонкошарової хроматографії. Вміст доксазозину визначають методом УФ-спектрофотометрії.

Винахід належить до аналітичної хімії, а саме до способів визначення доксазозину у біологічному матеріалі при застосуванні екстракції ацетонітрилом і може застосовуватися для визначення зазначеної речовини у фармацевтичному аналізі та при хіміко-токсикологічних дослідженнях.

5 Доксазозин-1-(4-аміно-6,7-диметокси-2-хіназолініл)-4-[(1,4-бензоді-оксан-2-іл)-карбоніл] піперазину мезилат, α_1 -адреноблокатор, широко застосовується у медичній практиці при лікуванні артеріальної гіпертензії та гіпертрофії простати; при передозуванні вражає серцево-судинну систему, порушує функції нирок [1, 2].

10 При досліджуванні біологічного матеріалу на наявність доксазозину важливими є етапи ізолювання отрути та очищення одержаних витяжок. Тому для підвищення надійності та відтворюваності отриманих результатів актуальною є розробка ефективних і експресних методик виділення речовин. Найбільш широко розповсюджені методи екстракційного виділення отруту, які можна розділити на загальноприйняті методи та методи, розроблені з урахуванням індивідуальних властивостей речовин або окремих груп речовин [3-6].

15 Використання гідрофільних, амфіфільних та ліпофільних розчинників обумовлено фізико-хімічними властивостями досліджуваних речовин, що має значення при утворенні сольватних оболонок молекул отруту та здатності розчинника до взаємодії з біологічним матеріалом на клітинному рівні. Широке розповсюдження у хіміко-токсикологічному аналізі отруту набули різні методики екстракції речовин амфіфільним розчинником ацетонітрилом.

20 Відомий спосіб визначення етацизину при екстрагуванні ацетонітрилом. Для чого біологічний матеріал (проба 100,0 г) підкислюють 10 % розчином кислоти щавлевої до pH 2,0; екстракцію отрути проводять триразово 100,0, 80,0 та 80,0 мл при ретельному перемішуванні кожної проби протягом 2, 1 та 1 год. відповідно. Як висолювач застосовують 25 % розчин амонію сульфату; для реекстрагування етацизину хлороформом водну фазу підлугують до pH 8,0 [7].

25 Спосіб визначення має певні недоліки, обумовлені використанням підкислюючого агенту (10 % розчином кислоти щавлевої, недостатньо активно руйнуючої зв'язки речовини з білками), зміни у об'ємах ацетонітрилу (триразово 100,0, 80,0 та 80,0 мл, при чому екстрагується значно більше біогенних домішок), використання певного висолювача (25 % розчин амонію сульфату, який гідролізується із зміною pH середовища); очищення обмежено застосуванням лише екстракційного методу.

Існує спосіб визначення органічних сполук (антибіотиків лінкоміцину та віргініаміцину) у тканинах м'язів, печінки та нирок при екстрагуванні гомогенізованих біологічних об'єктів ацетонітрилом з наступним очищенням витяжок від ліпідів екстракцією н-гексаном [8].

35 Відомий також спосіб визначення дилтіазему при екстрагуванні ацетонітрилом з біологічного матеріалу (проби 5,0 г), що передбачає використовувати нейтральний ацетонітрил з наступним очищенням витяжок центрифугуванням та екстракцією домішок етером [9].

Обидва способи мають недоліки, обумовлені відсутністю підкислюючого агенту (недостатньо активно руйнуються зв'язки речовини з білками), відсутністю використання висолювача (значно збільшується вміст домішок у екстрактах); очищення обмежено застосуванням лише екстракційного методу.

40 Існує спосіб визначення органічних сполук (антибіотиків тазобактаму та піперациліну) у жировій тканині при екстрагуванні ацетонітрилом. Профільтровані ацетонітрильні екстракти з жирової тканини аналізують без додаткового очищення ВЕРХ-методом при застосуванні автоматизованої методики з переключенням колонок, сорбент однієї з яких модифікований аміногрупами, що надає можливості при використанні рухомої фази - ацетонітрил-вода (1:20) сконцентрувати отрути з наступним переключенням на аналітичну колонку [10].

Спосіб визначення має певні недоліки, обумовлені використанням різноманітних умов екстрагування та очищення витяжок, які враховують індивідуальні властивості лише досліджуваних речовин з групи антибіотиків.

50 За прототип вибрано спосіб визначення азотовмісних лікарських речовин, до яких належить доксазозин (похідних фенотіазіну та фентанілу) у біологічному матеріалі (проба 50,0 г) при екстрагуванні ацетонітрилом, який складається з основних етапів: підкислення проб 10 % розчином кислоти хлористоводневої до pH 2,0-3,0; триразова екстракція порціями 100,0, 50,0 та 50,0 мл ацетонітрилу при настоюванні проб протягом 30, 15 та 15 хв. відповідно. Очищення витяжок здійснюється методом висолювання у 2,5 % розчині натрію сульфату, центрифугуванням та екстракцією домішок діетиловим етером. Отрути реекстрагуються етером після підлугування водної фази 40 % розчином натрію гідроксиду до pH 12,0-13,0; очищення обмежене застосуванням лише екстракційного методу [11, 12].

Спосіб визначення має певні недоліки, обумовлені використанням різноманітних умов екстрагування та очищення витяжок, які не враховують індивідуальні властивості доксазозину.

Задача винаходу полягає у створенні нового способу визначення доксазозину у біологічному матеріалі при застосуванні екстракції ацетонітрилом, який шляхом вибору оптимальних умов екстрагування та очищення витяжок при врахуванні властивостей доксазозину забезпечує максимальне виділення доксазозину з біологічного матеріалу при мінімальному екстрагуванні біогенних домішок, а також ефективного очищення витяжок від домішок з наступним достовірним та точним визначенням доксазозину у пробі методом УФ-спектрофотометрії.

Поставлена задача вирішується таким чином, що у способі визначення доксазозину у біологічному матеріалі, що включає екстрагування ацетонітрилом проби біологічного матеріалу, підкисленої 10 % розчином кислоти хлористоводневої до рН 2,0-2,5, очищення одержаної витяжки шляхом висолювання 2,5 % розчином натрію сульфату з подальшою реекстракцією доксазозину органічним розчинником після підлугування водно-органічної фази, згідно з винаходом на відміну від прототипу пробу тканини печінки масою 10,0 г двічі екстрагують по 10 хвилин відповідно 25,0 мл і 10,0 мл ацетонітрилу, а доксазозин реекстрагують хлороформом двічі по 10,0 мл, водно-органічну фазу підлугують 25,0 % розчином амонію гідроксиду до рН 9,0-10,0 з повторною екстракцією хлороформом двічі по 10,0 мл, витяжки об'єднують, випарюють до сухого залишку і послідовно очищують шляхом розчинення у кислоті хлористоводневій, екстракції домішок гексаном, проведення тонкошарової хроматографії з подальшим кількісним визначенням доксазозину методом УФ-спектрофотометрії.

Винаходом передбачено, що тонкошарову хроматографію проводять у системі рухомих розчинників хлороформ-ацетон 80:20.

Дослідним шляхом визначене наступне. Мінімізація маси проби біологічного матеріалу (10,0 г) та об'єму екстрагента ацетонітрилу (25,0 і 10,0 мл) при здійсненні заявленого способу обумовлює зменшення кількості екстрагованих домішок.

Підлугування водно-органічної фази слабшим за прототип лугом - 25 % розчином амонію гідроксиду до рН 9,0-10,0 забезпечує необхідні умови виділення саме доксазозину і є економічно доцільним.

Проведені авторами дослідження з вибору оптимальних умов екстрагування доксазозину з біологічного матеріалу довели оптимальність використання хлороформних витягів з водно-ацетонітрильних фаз при рН 2,0-2,5, тому що доксазозин - слабка основа, солі якої у кислому середовищі гідролізуються, тому можлива втрата речовини.

Дослідження з вибору оптимальних умов очищення отриманих витяжок від домішок довели також оптимальність використання гексану для екстрагування домішок, тому що доксазозин не екстрагується гексаном з хлористоводневої кислоти.

Всі параметри заявленого способу визначені експериментальним шляхом, а їх сукупність є новою, невідомою з джерел інформації.

Дослідами доведено, що при застосуванні заявленого способу можливо екстрагувати з біологічного матеріалу $89,7 \pm 4,8$ % доксазозину.

Заявлений спосіб може бути використаний для визначення як для речовин основного, так і кислотного характеру.

Заявлений спосіб здійснюють шляхом екстрагування тканин печінки труп (проба 10,0 г) ацетонітрилом двічі об'ємами розчиннику - 25,0 та 10,0 мл протягом 10 хвилин для кожної екстракції при підкислюванні проби 10 % розчином кислоти хлористоводневої до рН 2,0-2,5. Очищення ацетонітрильних витяжок здійснюється за допомогою висолювача - 2,5 % розчину натрію сульфату. Екстрагування доксазозину проводять хлороформом двічі по 10,0 мл з водно-органічної фази (рН 2,0-2,5) та двічі по 10,0 мл хлороформом - після підлугування водно-органічної фази 25 % розчином амонію гідроксиду до рН 9,0-10,0. Для очищення руйнують водно-хлороформні емульсії центрифугуванням.

Отримані хлороформні екстракти випаровують до сухого залишку, який додатково очищують при розчиненні у 20,0 мл 0,1 М кислоти хлористоводневої та екстракції домішок гексаном тричі по 5,0 мл. Гексанові екстракти відкидають. Очищені хлористоводневі розчини випаровують на водяній бані до сухого залишку, який розчиняють у 5,0 мл етанолу та очищують методом тонкошарової хроматографії.

Вміст доксазозину в етанольних розчинах визначають методом УФ-спектрофотометрії при 250 нм при товщині шару 10 мм, розчин порівняння - етанольний розчин, отриманий з контрольної проби за наведеною вище методикою.

Вміст доксазозину розраховують за рівнянням градувального графіку $C = 0,001 + 8,99 A$, де C - концентрація доксазозину у стандартному розчині, мкг/мл, A - оптична густина.

Винахід ілюструється прикладом.

Приклад 1. Ефективність заявленого способу було досліджено на моделі отруєння проби печінки тварин доксазозином.

0,2 мг доксазозину вносили у проби тканини печінки тварин без ознак гниття по 10,0 г. Проби з доксазозином та контрольні проби залишали на добу при кімнатній температурі. Доксазозин екстрагували ацетонітрилом двічі об'ємами розчинника - 25,0 та 10,0 мл протягом 10 хвилин для кожної екстракції при підкислюванні проби 10 % розчином кислоти хлористоводневої до pH 2,0-2,5. Очищення ацетонітрильних витяжок здійснювали за допомогою висолювача - 2,5 % розчину натрію сульфату.

Екстрагування доксазозину проводили хлороформом двічі по 10,0 мл з водно-органічної фази (pH 2,0-2,5) та двічі по 10,0 мл хлороформом - після підлюговування водно-органічної фази 25 % розчином амонію гідроксиду (pH 9,0-10,0). Для очищення руйнували водно-хлороформні емульсії центрифугуванням 6000 об/хв. протягом 10 хвилин.

Отримані хлороформні екстракти випаровували до сухого залишку, який додатково очищували при розчиненні у 20,0 мл 0,1 М кислоти хлористоводневої та екстракції домішок гексаном тричі по 5,0 мл. Гексанові екстракти відкидали, очищені хлористоводневі розчини випаровували при кімнатній температурі до сухого залишку, який розчиняли у 5,0 мл етанолу та очищували методом тонкошарової хроматографії.

Оптимальні умови хроматографування: система рухомих розчинників -хлороформ-ацетон (80:20); хроматографічні пластини Сорбфіл ПСТХ-АФ-А; проявник - реактив Драгендорфа за Муньє, (чутливість проявнику -1-3 мкг речовин у пробі); R_f доксазозину = 0,54-0,56, домішки - на лінії старту або на лінії фінішу.

Для кількісного визначення доксазозину в екстрактах застосовували УФ-спектрофотометричний метод при використанні спектрофотометру СФ-46, кювети товщиною 10 мм; λ_{\max} 250±1 нм; розчину порівняння, який отримано з контрольної проби. Вміст доксазозину розраховували за рівнянням градувального графіку $C = 0,001 + 8,99 A$, де C - концентрація доксазозину у стандартному розчині, мкг/мл, A - оптична густина. Встановлено, що інтервал лінійності градувального графіку складав у діапазоні концентрацій (1,0-8,0 мкг/мл); нижня межа визначення - (0,9 мкг/мл).

Отримані дані свідчать про відтворюваність результатів визначення доксазозину за заявленим способом визначення у біологічному матеріалі при застосуванні екстракції ацетонітрилом - до 89,7 %, що підтверджується метрологічними характеристиками доксазозину (відносна невизначеність не перевищує - + 4,8 %).

Таким чином, заявлений спосіб визначення доксазозину у біологічному матеріалі при застосуванні екстракції ацетонітрилом характеризується надійністю та відтворюваністю результатів, отриманих за розробленими умовами.

Спосіб може бути запропонованим для впровадження в практику роботи бюро судово-медичної експертизи, токсикологічних та наркологічних центрів, клінічних лабораторій по вивченню лікарських речовин у біологічних об'єктах.

Джерела інформації:

1. Машковский М. Д. Лекарственные средства - М.: ООО "Изд-во "Новая волна", 2010. - 1216 с.

2. Топчий І. І. Роль доксазозину в лікуванні хворих на діабетичну нефропатію з артеріальною гіпертензією / Топчий І. І., Денисенко В. П., Несен А. О. // Врач, практ. - 2006. - № 2. - С. 45-49.

3. Liu K. Enantioselective determination of doxazosin in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using ovomucoid chiral stationary phase. / Liu K, Zhong D, Chen X. // J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci-2010. - Vol. 878, № 26. - P. 2415-2420.

4. Bhavesh D. Determination of DOXAZOSIN in human plasma by reversed phase ion-pair HPLC with fluorescence Detection/ D. Bhavesh, S.Pinal, V.Saroj, Shivprakash.// Indian Journal of Pharmaceutical science-2002. - Vol. 64, № 4. - P. 354-356.

5. Randall C. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man Chemical Toxicology Institute- Foster City, 2000 - 918 p.

6. Clarke E.J.C. Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material London: The Pharm. Press, electronic version, 2005.

7. Кубрак З. В. Определение этагизина в трупном материале / З. В. Кубрак, В. И. Попова // Судебно-мед. экспертиза. - 1994. - № 2. - С. 24-25.

8. Simultaneous determination of lincomycin and virginiamycin M_1 in swine muscle, liver and kidney by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry / W.M. Sin Delia, C. Ho, Y.C.Wong et al. // Anal. chim. acta. - 2004. - Vol. 517, № 1-2. - С. 39-45.

9. Медведева Ю. П. Дослідження ефективності методів ізолювання дилтіазему з біологічного матеріалу / Ю. П. Медведева, В. С. Бондар // Мед. хімія. - 2004. - № 2. - С. 97-100.

10. New and rapid fully automated method for determination of tazobactam and piperacillin in fatty tissue and serum by column switching liquid chromatography / R. Frittlер, M. Ehrlich, T.J. Galla et al. // J. Chromatogr.B-2002. - Vol. 780, № 2. - P. 127-132.

11. Саломатин Е. М. Экспресс-метод изолирования производных фенотиазина из трупного материала // Судебно-мед. экспертиза. - 1989. - № 1. - С. 39-40.

12. Виділення фентанілу з органів трупу при застосуванні ацетонітрилу та ацетону / Е. І. Стадніченко, В. В. Болотов, В. С. Бондар, О. О. Маміна // Фармац. журн. - 1993. - № 4. - С. 66-68.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб визначення доксазозину в біологічному матеріалі, що включає екстрагування ацетонітрилом проби біологічного матеріалу, підкисленої 10 % розчином кислоти хлористоводневої до рН 2,0-2,5, очищення одержаної витяжки шляхом висолювання 2,5 % розчином натрію сульфату з подальшою реекстракцією доксазозину органічним розчинником після підлогування водно-органічної фази, який **відрізняється** тим, що пробу тканини печінки масою 10,0 г двічі екстрагують по 10 хвилин відповідно 25,0 мл і 10,0 мл ацетонітрилу, а доксазозин реекстрагують хлороформом двічі по 10,0 мл, водно-органічну фазу підлогувають 25,0 % розчином амонію гідроксиду до рН 9,0-10,0 з повторною екстракцією хлороформом двічі по 10,0 мл, витяжки об'єднують, випарюють до сухого залишку і послідовно очищують шляхом розчинення у кислоті хлористоводневій, екстракції домішок гексаном, проведення тонкошарової хроматографії з подальшим кількісним визначенням доксазозину методом УФ-спектрофотометрії.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що тонкошарову хроматографію проводять у системі рухомих розчинників хлороформ-ацетон 80:20.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601