

**УКРАЇНА****(19) UA****(11) 73425****(13) U****(51) МПК****G01N 33/48 (2006.01)****G01N 33/15 (2006.01)**

**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 02255	(72) Винахідник(и): Ковальська Олена Василівна (UA), Маміна Олена Олександрівна (UA), Безуглий Петро Овксентійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 27.02.2012	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.09.2012	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.09.2012, Бюл.№ 18	

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

Спосіб визначення доксазозину у біологічному матеріалі 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 підлюговування водно-органічної фази. Пробу тканини печінки масою 10,0 г двічі екстрагують по 10 хвилин відповідно 25,0 мл і 10,0 мл ацетонітрилу. Доксазозин реекстрагують хлороформом двічі по 10,0 мл, водно-органічну фазу підлюговують 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.

UA 73425 U

Корисна модель 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 етакініну 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 етакініну хлороформом водну фазу підлюговують до pH 8,0 [7].

25 Спосіб визначення має певні недоліки, обумовлені використанням підкислюючого агента (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, причому 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 агента (недостатньо активно руйнуються зв'язки речовини з білками), відсутністю використання висолювача (значно збільшується вміст домішок у екстрактах); очищення обмежено застосуванням лише екстракційного методу.

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 аміно-групами, 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 підлюговування 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 корисної моделі 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 корисною моделлю, 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.

Корисною моделлю 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 витяжок 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 трупа (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 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 графіка $C = 0,001 + 8,99 A$, де C - концентрація доксазозину у стандартному розчині, мкг/мл, A - оптична густина.

Корисна модель 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. Доксиазозин 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 підлогування 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 Мунье, (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 спектрофотометра СФ-46, кювети товщиною 10 мм; λ_{\max} 250±1 нм; розчину порівняння, який отримано з контрольної проби. Вміст доксазозину розраховували за рівнянням градувального графіка $C = 0,001 + 8,99 A$, де C - концентрація доксазозину у стандартному розчині, мкг/мл, A - оптична густина. Встановлено, що інтервал лінійності градувального графіка 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 этацизина 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. Медведєва Ю. П. Дослідження ефективності методів ізолювання дилтіазему з біологічного матеріалу / Ю. П. Медведєва, 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. Frittlr, M. Ehrlich, T J.Galla et al. // J. Chromatogr.B-2002.- Vol. 780, № 2. - Р. 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 трупа 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 КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

15

1. Спосіб 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 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.

25

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

30

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

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