

НАО «Медицинский университет Астана»

УДК: 615.073/.076:615.218.2/.3

МПК: G01N30/90, G01N33/15, G01N33/48, A61P37/08, A61P27/14

Мірзакір Құндызай Мұрапбайқызы

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИК
КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
КЕТОТИФЕНА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ БИОМАТЕРИАЛА**

7М10104 – ФАРМАЦИЯ

Диссертация
на соискание академической степени
магистра медицинских наук

Научный руководитель:
д.фарм.н., профессор Шукирбекова А.Б.

Астана 2024

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	4
ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	5
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	7
СПИСОК ТАБЛИЦ И РИСУНКОВ	8
ВВЕДЕНИЕ	9
1. КЛАССИФИКАЦИЯ И ОБЩАЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЕТОТИФЕНА (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР).....	13
1.1 Классификация и общая характеристика антигистаминных препаратов второго поколения.....	13
1.2 Фармакологическая характеристика кетотифена	16
1.3 Токсикологическое значение.....	19
1.4 Методы, используемые в фармацевтическом и химико-токсикологическом анализе производных пиперидинилиденциклогептановых препаратов	20
1.5 Методы изолирования из биоматериала азотсодержащих веществ основного характера	23
2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	26
2.1 Объекты исследования.....	26
2.2. Методы исследования	27
2.2.1 Химические методы исследования.....	27
2.2.2 Хроматографические методы исследования.....	27
2.2.2.1 Метод тонкослойной хроматографии	27
2.2.3 Спектрофотометрические методы анализа	29
2.2.3.1 Метод УФ-спектрофотометрии	29
2.2.4 Методы изолирования органических веществ из объектов биологического происхождения	30
3. МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ КЕТОТИФЕНА	32
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ)	32
3.1 Химические методы идентификации	32
3.1.1 Цветные реакции	32

3.1.2	Осадительные реакции.....	33
3.2	Физико-химические методы идентификации	36
3.2.1.	Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ)	36
3.2.2	Метод УФ-спектрофотометрии	39
4.	МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЕТОТИФЕНА	43
4.1	Метод УФ-спектрофотометрии	43
5.	ИЗУЧЕНИЕ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ КЕТОТИФЕНА ИЗ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ.....	46
5.1	Экстракция кетотифена из водных растворов органическими растворителями в зависимости от рН среды	46
6.	ВЫДЕЛЕНИЕ КЕТОТИФЕНА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА	48
6.1	Изолирование кетотифена из биологических объектов общеизвестными методами.....	48
6.1.1	Выделение кетотифена по методу А.А. Васильевой.....	48
6.1.2	Выделение кетотифена по методу Стаса-Отто в модификации А.В. Удалова.....	49
6.1.3	Выделение кетотифена по методу В.Ф. Крамаренко	49
6.2	Обнаружение кетотифен в вытяжках из биологического материала	50
6.3	Оценка количества кетотифена, извлеченного из биосубстрата	52
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	54
	ВЫВОДЫ.....	55
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	56
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	57
	ПРИЛОЖЕНИЕ А	68
	ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	69

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

1. Кодекс Республики Казахстан от 7 июля 2020 года № 360-VI ЗРК «О здоровье народа и системе здравоохранения».
2. Закон Республики Казахстан от 10 февраля 2017 года № 44-VI ЗРК «О судебно-экспертной деятельности».

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяют следующие термины с соответствующими определениями:

Высокоэффективная жидкостная хроматография – один из методов разделения сложных смесей веществ, основанный на разности распределения веществ между двумя несмешивающимися фазами, в которой жидкость, являющаяся подвижной фазой, проходит через неподвижную фазу, находящуюся в колонке.

Газо-жидкостная хроматография – вид газовой хроматографии, используемой для разделения и анализа веществ, которые могут быть переведены в газообразное состояние без их разложения. Подвижной фазой служит газ, неподвижной фазой – жидкость, нанесенная тонким слоем на твердый носитель, который помещается в стеклянную или металлическую колонку.

Газо-жидкостная хроматография с масс-селективным детектированием – комбинация жидкостных хроматографов с масс-спектрами.

Идентификация – это установление природы, вида, структуры и состояния молекул, ионов, радикалов, атомов и других частиц на основе сопоставления и отождествления экспериментальных результатов качественного анализа с соответствующими справочными данными, а в случае их отсутствия – со свойствами образцов, полученных встречным синтезом на основании предполагаемых моделей.

Изолирование – процесс перевода токсических веществ из биологических объектов в жидкую фазу (в вытяжку, дистиллят, минерализат). Изолирование лекарственных веществ из биологического материала проводится как общими, так и частными методами. Частные методы применяются при направленном анализе, т.е. когда требуется провести исследование на определенную группу веществ или указано конкретное вещество. Общие методы, применяемые при общем анализе: Стаса – Отто, Васильевой, Крамаренко и др.

Количественный анализ – совокупность химических, физико-химических и физических методов определения количественного соотношения компонентов, входящих в состав анализируемого вещества. Наряду с качественным анализом является одним из основных разделов аналитической химии.

Спектрофотометрия – физико-химический метод исследования растворов и твердых веществ, основанный на изучении спектров поглощения в ультрафиолетовой (200 - 400 нм), видимой (400 - 760 нм) и инфракрасной (>760 нм) областях спектра.

Токсикант – более широкое, чем яд, понятие, употребляющееся для обозначения веществ, вызывающих не только интоксикацию, но

провоцирующих и другие формы токсического процесса, и не только организма, но и биологических систем (клетки, популяции).

Тонкослойная хроматография (ТСХ) – представляет собой метод разделения, основанный на процессах адсорбции, распределения, ионного обмена или на их комбинации и осуществляется посредством перемещения в тонком слое (неподвижной фазе) определяемых веществ, растворенных в растворителе или в соответствующей смеси растворителей (подвижной фазе).

Химико-токсикологический анализ (ХТА) – совокупность научно обоснованных методов, применяемых на практике для выделения, обнаружения и количественного определения токсических веществ.

Хроматография – это метод исследования газовых, жидкостных, паровых или растворенных веществ путем их физико-химического разделения на монокомпоненты.

Экстрагент – это вещество, взаимодействующее с распределяемым веществом и определяющее процесс экстракции

Экстракция – это извлечение вещества из раствора или сухой смеси с помощью растворителя, практически не смешивающегося с исходной смесью.

Элюат – раствор, выходящий из хроматографической колонки.

Элюент – это газ или жидкость, применяемые в качестве подвижной фазы в хроматографической системе, которые протекают через неподвижную фазу.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ГЖХ – газожидкостная хроматография
ГЖХ-МС – газожидкостная хроматография с масс-селективным детектированием
ГФ РК – Государственная фармакопея Республики Казахстан
ГЭБ – Гематоэнцефалический барьер
ИК-спектр – инфракрасный спектр
ЛС – лекарственное средство
НД – нормативный документ
НЖФ – неподвижная жидкая фаза
НПФ – неподвижная фаза
ОФТСХ – обращенео-фазовая тонкослойная хроматография
ПФ – подвижная фаза
СФМ – спектрофотометрия
ТСХ – тонкослойная хроматография
УФ-спектр – ультрафиолетовый спектр
ФС – фармакопейная статья
ХТА – химико-токсикологический анализ
ЦНС – центральная нервная система
ЦСМЭ – центр судебно-медицинской экспертизы

СПИСОК ТАБЛИЦ И РИСУНКОВ

Рисунок 1. Кристаллы кетотифена с	35
Рисунок 2. Схема детектирования кетотифена.....	38
Рисунок 3. УФ-спектры раствора кетотифена	39
Рисунок 4. УФ-спектры раствора кетотифена в этаноле	40
Рисунок 5. УФ-спектры раствора кетотифена	41
Рисунок 6. УФ-спектры раствора кетотифена	41
Рисунок 7. Градуировочный график спектрофотометрического определения раствора кетотифен в 0,1 М растворе кислоты хлороводородной	44
Таблица 1 - Антигистаминные препараты второго поколения зарегистрированные на территории Республики Казахстан [31]	16
Таблица 2 - Результаты взаимодействия кетотифена с различными реактивами для реакции окрашивания.....	33
Таблица 3 - Результаты взаимодействия кетотифена с различными осадительными реактивами	34
Таблица 4- Значения Rf кетотифена при хроматографировании (n=5).....	37
Таблица 5 - Результаты детектирования кетотифена при использовании ряда детекторов, применяемых в ХТА	37
Таблица 6- Зависимость оптической плотности раствора кетотифена от применяемых растворителей	39
Таблица 7- Спектральные характеристики кетотифена в различных растворителях.....	42
Таблица 8 - Результаты статистической обработки величины удельного и молярного коэффициентов светопоглощения раствора кетотифена в 0,1 М растворе кислоты хлороводородной (n=5).....	43
Таблица 9 - Результаты спектрофотометрического количественного определения раствора кетотифен в 0,1 М растворе кислоты хлороводородной, рассчитанные с помощью градуировочного графика (среднее значение 5 измерений).....	45
Таблица 10 - Степень выделения кетотифена органическими растворителями в зависимости от различных уровней рН	47
Таблица 11 - Результаты определения кетотифена, извлеченного из биоматериала при помощи окрасочных и осадительных тестов.....	50
Таблица 12 - Результаты количественного определения кетотифена в модельной смеси (печень)	53

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы: Во многих развитых странах мира за последние десятилетия заметен значительный рост числа случаев аллергических заболеваний. Исследования, оценивающие глобальные, региональные, национальные и временные тенденции, указывают, что наиболее распространенные формы аллергических заболеваний являются астма, атопический дерматит, аллергический ринит, пищевая аллергия и др. [1]. Эти заболевания играют существенную роль в высокой заболеваемости и смертности как среди детей, так и среди взрослых.

В настоящее время лекарственное лечение аллергических состояний является основным методом борьбы с этим распространенным заболеванием. Это приводит к появлению на рынке все новых препаратов отечественного и зарубежного производства [2]. Однако при некоторых условиях некоторые из них могут вызывать серьезные осложнения, интоксикации разной степени тяжести и острые или хронические отравления. С ростом рынка лекарственных препаратов возрастает интерес судебно-химических и токсикологических экспертов к важным соединениям, которые при определенных обстоятельствах могут привести к осложнениям и отравлениям. Это подчеркивает необходимость разработки методов извлечения, идентификации и количественного определения таких веществ в биологических образцах, а также их включения в программы скрининга токсичности.

Кетотифен, известный препарат который проявляет свою активность в снижении аллергических реакций, широко используется в медицинской практике в качестве противогистаминного средства [3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 17]. Из-за возможных побочных эффектов, таких как усиление действия снотворных, седативных препаратов, других противоаллергических средств и алкоголя, кетотифен может быть использован в немедицинских целях, и при передозировке он представляет токсикологический интерес [18, 19, 21]. Хотя существует много работ, посвященных фармакологическому и клиническому изучению кетотифена [20, 9, 14, 15, 16], информация о его химико-токсикологическом анализе является недостаточной.

В свете токсикологических клинических проявлений отравлений, особенно важными становятся данные об анализе кетотифена в биологических образцах. Это подчеркивает значимость разработки методов для его химико-токсикологического исследования.

Цель исследования: Разработка методик качественного и количественного определения кетотифена, выделенного из биологического материала.

Задачи исследования:

1. Разработали чувствительные методики идентификации кетотифена с применением химических и физико-химических методов;
2. Разработали методики количественного определения кетотифена с использованием физико-химических методов.
3. Исследовали оптимальные условия изолирования кетотифена.
4. Оценили пригодность, достоверность разработанных методик качественного и количественного определения кетотифена, выделенного из биоматериала с помощью известных методов изолирования.

Объект и предмет исследования:

1. Таблетки «Кетотифен» (действующее вещество: кетотифена фумарат 1 мг; вспомогательные вещества: МКЦ, кальция гидрофосфат, крахмал пшеничный, магния стеарат). Производитель: Софарма АО, Болгария.
2. Биологический объект - модельная смесь, содержащая исследуемое вещество и печень животного происхождения.

Методы исследования:

1. Химические (цветные и осадительные реакции) и физико-химические методы (ТСХ, УФ - спектрофотометрия) идентификации кетотифена, выделенного из биоматериала.
2. Количественные методы определения кетотифена (УФ – спектрофотометрия).
3. Методы изолирования по А.А. Васильевой, В.Ф. Крамаренко, Стас-Отто для выделения кетотифена из биологического материала.

Научная новизна:

Научная новизна исследования заключается в том, впервые разработаны методики качественного и количественного определения кетотифена, выделенного из биоматериала для целей химико-токсикологического анализа:

1. Впервые разработаны методики качественного и количественного определения кетотифена с помощью химических и физико-химических методов.
2. Впервые изучены оптимальные условия экстракции кетотифена.
3. Оценена пригодность разработанных методик обнаружения и количественного определения кетотифена, выделенного из биоматериала, с помощью классических методов изолирования.

Практическая значимость:

На основе полученных исследовательских выводов были опубликованы научные статьи, которые затрагивают методы качественного и количественного анализа кетотифена, выделенного из биологических материалов. В этих публикациях представлены не только практические аспекты определения

кетотифена с использованием физико-химических методов, но и теоретические основы данного процесса.

Разработанные учебно-методические рекомендации внедрены в образовательный процесс НАО "Медицинский университет Астана» и КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова в рамках самостоятельной работы по дисциплине «Токсикологическая химия».

База проведения исследования:

Кафедра фармацевтических дисциплин НАО «Медицинский университет Астана», г. Астана.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Методики качественного анализа кетотифена, пригодные для целей химико-токсикологического анализа;
- Методики количественного анализа кетотифена, выделенного из биологического материала;
- Оптимальные условия экстракции кетотифена из водных растворов;
- Оценка пригодности разработанных методик обнаружения и количественного определения кетотифена, выделенного из биоматериала с помощью классических методов изолирования.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из 69 страниц, состоящая из введения, 6 глав, заключения, общих выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы и приложения. Работа изложена на страницах машинописного текста, включает 12 таблиц, 7 рисунков и 2 страницы приложения. Список использованной литературы содержит 141 наименований.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи, отмечена новизна, практическая значимость исследования и основные положения, выносимые на защиту.

Вводная часть диссертации наглядно показывает цель, задачи, актуальность темы, ее научную новизну и практическую значимость научной работы.

В первом разделе магистерской диссертации представлен обзор литературы, в котором рассмотрены общая характеристика антигистаминных средств, фармакологические свойства кетотифена, его токсикологическое значение, общие методы химико-токсикологического исследования азотсодержащих веществ основного характера, а также методы изолирования из биологического материала азотсодержащих веществ основного характера.

Во втором разделе описаны объекты и методы, использованные автором в ходе исследований, а также четко описаны объекты и методы, использованные для обработки информации и результатов, полученных в ходе диссертационного исследования.

В третьей части магистерской диссертации описаны результаты экспериментальных исследований - данные, полученные при идентификации кетотифена химическими (окраска, осаждение) и физико-химическими (ТСХ и УФ-спектрофотометрия) методами.

В четвертой главе магистерской диссертации представлены результаты экспериментальных исследований, в частности данные, полученные при количественном анализе кетотифена методом УФ-спектрофотометрии.

В пятой главе отражено изучение условий экстракции кетотифена из водных растворов органическими растворителями. В результате проведенного исследования автором были подобраны оптимальные условия для экстракции кетотифена с учетом природы органического растворителя и рН среды.

Апробация работы. Основные материалы работы представлены и доложены:

- В сборнике материалов Буковинского международного медико-фармацевтического конгресса молодых ученых, ВІМСО 2023 год, с. 276. Украина, г. Черновцы. «Ketotifen as an object of chemical toxicological research». Публикация тезиса.

- В сборнике материалов международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Наука и молодежь: открытия и перспективы». Республика Казахстан, г. Астана, НАО «Медицинский университет Астана» 2023 г., с. 496-497. «Исследование кетотифена в химико-токсикологическом отношении». Публикация тезиса и выступление с докладом.

- В материалах IV международной научно-практической конференции, "Современное состояние фармацевтической отрасли: проблемы и перспективы". Республика Узбекистан, г. Ташкент, «Ташкентский фармацевтический институт» 2023 г., с. 236-237. «Физико-химические методы определения кетотифена». Публикация тезиса.

- В X международной научной конференции молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации», Совет по науке при фонде Нурсултана Назарбаева и АО «Южно-Казахстанская медицинская академия», 7-8 декабря 2023 года, с. 43-47, «Казахстанский журнал медицины и фармации». «Физико-химические методы анализа в идентификации кетотифена». Публикация экспериментальной статьи.

- В VI международной научно-практической конференции «Абу Али Ибн Сино и инновации в современной фармацевтике», Республика Узбекистан, г. Ташкент, «Ташкентский Фармацевтический институт» 2024 год. «Обнаружение и количественное определение кетотифена, выделенного из биоматериала с помощью УФ-спектрофотометрии». Публикация тезиса и выступление с докладом.

1. КЛАССИФИКАЦИЯ И ОБЩАЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КЕТОТИФЕНА (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

1.1 Классификация и общая характеристика антигистаминных препаратов второго поколения

В 1910 году английский физиолог Генри Дейл впервые обнаружил гистамин, и уже к 1920-м годам он был признан основным патогенным медиатором аллергических заболеваний, таких как ринит и уртикарная сыпь [22]. В 1937 году Стауб и Бове обнаружили первый антагонист рецепторов гистамина, что впоследствии послужило основанием для их награждения Нобелевской премией по физиологии и медицине в 1957 году [23, 24]. С 1942 по 1981 год введено на рынок более 40 соединений, включающихся в категорию "первого поколения" антагонистов гистаминовых рецепторов. Однако эти препараты первого поколения характеризовались активностью в отношении центральной нервной системы (ЦНС) и низкой специфичностью к рецепторам, что приводило к выраженным седативным и антихолинергическим эффектам, которые многие пациенты не желали переносить [25]. В стремлении повысить селективность и переносимость антагонистов H₁ и снизить проявление их седативных и антихолинергических побочных эффектов было разработано и внедрено новое, или второе, поколение антигистаминных препаратов [22]. С 1981 года на рынке появились новые антигистаминные препараты второго поколения, такие как терфенадин и астемизол. В последующие годы были разработаны и выпущены другие препараты, включая акривастин, азеластин, цетиризин, эбастин, эмедастин, фексофенадин, кетотифен, левокабастин, лоратадин, мизоластин и оксатомид, которые стали доступны на рынках различных регионов мира [26]. В 1983 году Шварц и его научный коллектив выдвинули гипотезу о наличии третьего рецептора гистамина. Несмотря на разработку нескольких препаратов, направленных на этот рецептор, только один из них был зарегистрирован к настоящему времени. Открытие гистаминовых рецепторов четвертого типа произошло лишь в 2000 году, когда несколько научных групп из разных стран мира работали над этой проблемой [27].

Антигистаминные препараты второго поколения проявляют высокую специфичность к рецепторам H₁, обладают низкой способностью проникновения через гематоэнцефалический барьер и обеспечивают длительное действие [28]. Первым избирательным блокатором рецепторов H₁, созданным на основе метаболита гидроксизина, стал цетиризин. Он был одобрен для использования в медицинских целях в 1987 году [27]. Эти особенности являются существенными преимуществами данных препаратов. Сегодня у медицинских специалистов и пациентов, помимо цетиризина, имеется разнообразный выбор антигистаминных препаратов второго поколения, таких как кетотифен, лоратадин, дезлоратадин, левоцетиризин, фексофенадин, рупатадин, эбастин, и биластин. Некоторые ученые выделяют

дезлоратадин в отдельную категорию, определяя его как представителя третьего поколения антигистаминных препаратов [29].

Препараты второго поколения антигистаминов обладают общими характеристиками, такими как быстрое наступление действия, часто уже через 30 минут после приема внутрь, продолжительное действие, сохраняющееся на протяжении дня и дольше, а также высокий уровень безопасности [30]. Также можно отметить разнообразие форм нового поколения препаратов: они доступны в виде таблеток, назальных и глазных капель (например, азеластин, левокабастин, олопатадин), как в форме монопрепаратов, так и в комбинации с антилейкотриеновыми препаратами (монтелукастом), интраназальными глюкокортикостероидами, а также в виде сиропов и капель для перорального приема. Это обеспечивает широкие возможности применения препаратов как у взрослых, так и у детей при различных заболеваниях. При низких концентрациях антигистаминные препараты действуют как обратимые конкурентные антагонисты гистамина, воздействуя на рецепторы H₁. Этот антагонизм приводит к уменьшению проницаемости сосудов, снижению зуда и расслаблению гладкой мускулатуры в дыхательном и желудочно-кишечном трактах.

Антигистаминные препараты второго поколения, такие как цетиризин, левоцетиризин, лоратадин, дезлоратадин и рупатадин, обладают у большинства пациентов отсутствием седативного эффекта, высокой специфичностью в связывании с H₁-гистаминовыми рецепторами и отсутствием аффинности к другим рецепторам. Их прием не зависит от приема пищи, не вызывает тахифилаксии, что позволяет принимать их в течение длительного времени. Дополнительным преимуществом этих препаратов является их противовоспалительное действие [10].

Цетиризин, синтезированный из гидроксизина, был создан в 1987 году и стал первым H₁-блокатором с высокой селективностью. До сих пор он остается основным препаратом в лечении аллергических реакций и служит эталоном для сравнения. Его действие продолжается в течение одного суток, а эффект сохраняется после прекращения приема на протяжении до трех суток. Применение у детей возможно с 6 месяцев, однако дети в возрасте от 6 до 12 месяцев должны получать его под строгим наблюдением врача. Левоцетиризин, активная форма цетиризина, обладает в два раза большей аффинностью к рецепторам H₁ по сравнению с цетиризином. Он характеризуется быстрым началом действия и полной биодоступностью, не требует метаболизма в печени. С минимальным количеством побочных эффектов и риском взаимодействия с другими препаратами, он может применяться при заболеваниях печени. Лоратадин является препаратом, который метаболизируется в организме. При прохождении через печень он превращается в активный метаболит, известный как дезлоратадин. Эффективность лоратадина может изменяться в зависимости от состояния печени пациента, что важно учитывать при сочетании с другими лекарствами

или при наличии заболеваний печени. Взаимодействие с индукторами ферментов печени, такими как этанол, зверобой, барбитураты и др., может снизить его терапевтическое действие, а с ингибиторами, такими как эритромицин, кетоконазол, циметидин и др., может привести к усилению побочных эффектов.

Рупатадин является относительно новым препаратом, который пока еще не так широко распространен в аптеках и редко применяется в клинической практике. В организме он также подвергается метаболизму, преобразуясь в несколько активных метаболитов, включая дезлоратадин, 3-гидроксидезлоратадин, 5-гидроксидезлоратадин и 6-гидроксидезлоратадин. Прием рупатадина может быть связан с риском развития фатальной аритмии, поэтому его применение требует особой осторожности у пациентов с удлинённым интервалом QT, гипокалиемией и другими сердечными проблемами. Не рекомендуется одновременное употребление рупатадина с грейпфрутовым соком, макролидами, противогрибковыми препаратами и статинами. Пациентам в возрасте 65 лет и старше также рекомендуется обратиться к врачу для подбора альтернативных лекарственных средств. Дезлоратадин, активный метаболит лоратадина, обладает более сильным действием по сравнению с самим лоратадином. Его эффект предсказуем и не подвержен влиянию активности ферментов системы цитохрома P450. При совместном приеме с другими лекарствами риск лекарственного взаимодействия исключен, и он не оказывает влияния на эффективность при заболеваниях печени. Гифенадин и Сехифенадин, имеющие схожую структуру, представляют собой особую категорию препаратов, так как обладают свойствами как препаратов первого, так и второго поколения. Они не проникают через гематоэнцефалический барьер, не влияют на центральную нервную систему, не вызывают седативного или снотворного эффекта и не оказывают воздействия на адренергические или м-холинорецепторы. Тем не менее, как и препараты первого поколения, они характеризуются коротким временем действия и часто назначаются 2–3 раза в день.

Кетотифен - уникальный препарат в группе средств против аллергии. Иногда его рассматривают как представителя первого поколения. Он блокирует высвобождение гистамина и других медиаторов, стабилизируя тучные клетки. Кроме того, обладает слабым антагонистическим действием на рецепторы H1. Обычно назначается на протяжении не менее трех месяцев, принимается дважды в день. Прекращают применение постепенно, в течение 2-4 недель. Так как эффект развивается в течение 1-2 месяцев, начинать прием кетотифена пациентам с поллинозом следует заранее. Основное применение кетотифена — борьба с бронхиальной астмой. Хотя кромоглициевая кислота имеет форму для перорального приема, ее используют внутрь только для лечения пищевой аллергии. Для борьбы с поллинозом применяют назальные и глазные капли, спреи и аэрозоли. Эффект от ее применения начинает проявляться через несколько дней или недель, поэтому рекомендуется начинать лечение

заблаговременно, перед наступлением сезона цветения, чтобы достичь максимальной эффективности. Терапия проводится на протяжении всего сезона аллергии.

Таблица 1 - Антигистаминные препараты второго поколения зарегистрированные на территории Республики Казахстан [31]

№	МНН	Торговое наименование	Производитель
1	Цетиризин	Цетиризин Вива Фарм	Вива Фарм
		Новэкс Цетиризин	Хербион Пакистан Пвт. Лтд
2	Левосетиризин	Левосетиризин	Ветпром АД
3	Лоратадин	Лоратадин-АКОС	Таблетки, 10 мг, №10
4	Дезлоратадин	Дезлоратадин-ТК	ТК Фарм Актобе
		Дезлоратадин Тева	Актавис Лтд.
		Дезлоратадин	Ветпром АД
5	Рупатадин	-	-
6	Хифенадин	-	-
7	Сехифенадин	-	-
8	Кетотифен	Кетотифен Софарма	Софарма
		Монокето	Фарма Сталлн ГмбХ
		Аллергокет®	ЛеКос
		Кетотифен	Абди Ибрахим Глобал Фарм
		Кетотифен	Белмедпрепараты РУП
9	Кромоглициевая кислота	Кромоглин® назальный спрей	Урсафарм Арцнаймиттель ГмбХ

1.2 Фармакологическая характеристика кетотифена

Кетотифен представляет собой высокоэффективное противоаллергическое средство, широко применяемое для лечения аллергических заболеваний [11, 16]. Кетотифен является препаратом второго поколения, действующий как неконкурентный антагонист рецепторов H₁ и стабилизатор тучных клеток, был разработан в 1970 году [7, 8, 9].

Кетотифен применяется в пероральных и топических офтальмологических формах для лечения аллергических расстройств, связанных с мастоцитами или также называемые тучные клетки, и другими типами аллергий, таких как астма и аллергический конъюнктивит [10, 11, 12, 13, 14, 15].

Кетотифен, препарат, обладающий свойствами антигистамина и стабилизатора тучных клеток, имеет разнообразные формы выпуска, что

включает в себя офтальмологическую (глазные капли или контактные линзы с лекарственным покрытием) и пероральную (таблетки или сироп) формы [77].

Офтальмологическая форма применяется для лечения аллергического конъюнктивита и облегчения зуда и раздражения глаз, связанных с аллергическими реакциями, в то время как пероральная форма используется для профилактики астмы, анафилактических реакций и других заболеваний, связанных с аллергией и тучными клетками [78, 79, 80].

Офтальмологический раствор кетотифена в форме глазных капель действует быстро и эффективно, облегчая дискомфорт и симптомы аллергического конъюнктивита. Контактные линзы с лекарственным покрытием, содержащие кетотифен, также представляют собой удобный способ лечения аллергических реакций в глазах. Они обеспечивают длительное и постоянное воздействие препарата, что позволяет избежать регулярного применения глазных капель [81, 82].

Кроме того, кетотифен проявил свою эффективность не только в лечении аллергического конъюнктивита, но и в предотвращении приступов астмы и аллергических реакций в организме. Это делает его важным препаратом не только для лечения симптомов аллергии, но и для профилактики возможных осложнений, связанных с аллергическими реакциями [83, 84].

Кетотифен также успешно доказал свою эффективность в терапии крапивницы, снижая зуд и количество высыпаний в нескольких исследованиях рефрактерной крапивницы у пациентов, у которых традиционные методы лечения оказывались малоэффективными [14]. Механизм стабилизации тучных клеток кетотифена объясняется его способностью противодействовать деформации плазматической мембраны дегранулирующих тучных клеток [13].

Пероральный прием кетотифена находит применение в широком спектре аллергических и иммунологических заболеваний. Он эффективен как для лечения хронических состояний, таких как астма, аллергический ринит, и атопический дерматит, так и для управления острыми реакциями, например, анафилаксией. Кроме того, кетотифен доказал свою эффективность в лечении ангионевротического отека и пищевой аллергии. Особое внимание уделяется его роли в лечении системных заболеваний тучных клеток, таких как мастоцитоз и синдром активации тучных клеток (MCAS). В этих состояниях кетотифен действует как стабилизатор тучных клеток, предотвращая их избыточную активацию и высвобождение воспалительных медиаторов. Это позволяет уменьшить симптомы, такие как приступы, желудочно-кишечные расстройства и респираторные симптомы, сопровождающие эти заболевания [81, 85, 86]. При планировании лечения MCAS обычно используется комплексный подход, включающий не только прием кетотифена, но и других лекарственных препаратов, нацеленных на различные аспекты патологического процесса. Важным аспектом также является коррекция образа жизни с целью минимизации факторов, способствующих провоцирующим реакциям [87].

Кетотифен является селективным антигистаминным препаратом, то есть обратным агонистом гистаминового H1 - рецептора ($K_i = 0,166$ нМ) [88], и стабилизатором тучных клеток [89, 90, 91]. Предотвращая дегрануляцию тучных клеток, кетотифен подавляет высвобождение медиаторов воспаления, таких как гистамин и лейкотриены, которые участвуют в аллергических реакциях [89]. Действие кетотифена также основано на его ингибировании высвобождения серотонина [89]. Кетотифен также играет важную роль в предотвращении накопления эозинофилов - белых кровяных телец, которые становятся активными во время аллергических реакций и инфекций; таким образом, кетотифен помогает уменьшить воспаление [89].

Кроме того, кетотифен обладает слабой антихолинергической ($K_i = 204$ нМ для мускаринового ацетилхолинового рецептора на кончиках пальцев) и антисеротонинергической ($K_i = 38,9$ нМ для 5-HT_{2A}) активностью [88, 92]. Однако в тех дозировках, в которых он обычно используется в клинике, как антихолинергическая, так и антисеротонергическая активность кетотифена, как утверждается, незначительна [93].

Кетотифен - это липофильное соединение, которое может проникать через гематоэнцефалический барьер и оказывать воздействие на центральную нервную систему, такое как седативный эффект, увеличение веса и противосудорожная активность. Кетотифен также оказывает периферическое действие, такое как ингибирование агрегации тромбоцитов, модуляция выработки цитокинов и повышение мукоцилиарного клиренса [77, 94, 95].

Кетотифен действует как стабилизатор тучных клеток, предотвращая дегрануляцию и высвобождение гистамина и других медиаторов воспаления, таких как лейкотриены [96], простагландины и цитокины, из тучных клеток. Кетотифен также ингибирует активацию и миграцию эозинофилов, базофилов и нейтрофилов, которые участвуют в воспалительной реакции и повреждении тканей при аллергических и респираторных заболеваниях [97, 98, 99].

Кетотифен обладает двойным действием в качестве антигистаминного средства и стабилизатора тучных клеток, что делает его эффективным при профилактике и лечении различных аллергических и респираторных заболеваний, таких как астма, аллергический ринит, конъюнктивит [100], дерматит, крапивница и анафилаксия. Кетотифен также может уменьшать гиперреактивность бронхов и воспаление дыхательных путей, характерные для хронической астмы [83, 99, 101].

Период полувыведения кетотифена из плазмы крови составляет около 12 часов. Кетотифен интенсивно метаболизируется в печени путем окисления и конъюгации, а метаболиты выводятся с мочой и калом. Биодоступность кетотифена при приеме внутрь составляет около 50%, что обусловлено его метаболизмом в печени. Максимальная концентрация в плазме крови достигается примерно через 2-4 часа. Возраст, пол или нарушение функции почек существенно не влияют на фармакокинетику кетотифена, но могут

изменяться при нарушении функции печени или одновременном применении других лекарственных средств [102].

Кетотифен, как и другие антигистаминные препараты [103, 104] в основном метаболизируется ферментами цитохрома P450 (CYP), особенно CYP3A4 [105, 106] в печени. Ферменты CYP отвечают за окисление и деметилирование кетотифена, образуя основные метаболиты - норкетотифен и 10-гидроксикетотифен. Норкетотифен фармакологически активен и обладает таким же действием, как и кетотифен, в то время как 10-гидроксикетотифен неактивен. Затем метаболиты конъюгируются с глюкуроновой кислотой или сульфатом и выводятся с мочой и калом [107, 108].

1.3 Токсикологическое значение

Препарат проявляет свою способность к оказанию седативного эффекта, что следует учитывать при его использовании. В период лечения он может влиять на активности, требующие повышенного внимания, такие как управление транспортными средствами или операторская работа. Взаимодействие кетотифена с препаратами, обладающими снотворным, седативным или антигистаминным действием, может привести к усилению их эффекта из-за его способности оказывать угнетающее воздействие на центральную нервную систему. Это может проявляться в виде головокружения и замедления психических реакций. Также стоит отметить, что кетотифен способен усиливать воздействие алкоголя, что повышает риск возникновения алкогольной интоксикации при его употреблении в период лечения [19].

Совместное использование кетотифена с пероральными препаратами для лечения диабета, особенно с теми, что содержат производные сульфаниламочевины, может повысить вероятность тромбоцитопении [74]. В период беременности и кормления грудью применение препарата не рекомендуется. Лицам, реагирующим на седативный эффект, обычно начинают прием кетотифена с низких доз, например, 0,5 мг в день, постепенно увеличивая их [31]. Среди нежелательных явлений, которые могут проявиться при применении препарата, могут встречаться сонливость, сухость во рту, головокружение, замедленные реакции, увеличение аппетита, набор веса, проблемы с мочеиспусканием, цистит и аллергические реакции [31].

После перорального употребления кетотифен практически полностью всасывается в кровь. Примерно половина препарата становится доступной для организма из-за процесса "первого прохождения" через печень. Обычно максимальная концентрация в крови достигается через 2-4 часа после приема, и примерно 75% кетотифена связывается с белками плазмы [75].

Происходит метаболизм кетотифена с образованием различных метаболитов в процессе N-деметилирование, N-окисление и конъюгацию с глюкуроновой кислотой [74, 75, 76]. Основным метаболитом, N-глюкуронидом, не обладает фармакологической активностью [75].

Фармакокинетика у детей старше трех лет подобна той, которая наблюдается у взрослых.

Кетотифен выводится из организма через мочу как в неизменном виде, так и в виде метаболитов. Этот процесс проходит в две фазы, с более короткой и более длинной фазами. Около 60-70% принятой дозы выводится с мочой в течение 48 часов в виде метаболитов [74]. При приеме 2 мг кетотифена максимальная концентрация в крови достигается через 2 часа, а максимальная концентрация глюкуронида - через 4 часа [76].

Передозировка кетотифеном может привести к различным симптомам, таким как сонливость, тахикардия, дезориентация и, в редких случаях, к судорогам и коме [74].

Смертельные случаи отравления кетотифеном обычно связаны с превышением терапевтической дозы и могут проявиться через несколько часов после приема [76].

1.4 Методы, используемые в фармацевтическом и химико-токсикологическом анализе производных пиперидинилиденциклопентановых препаратов

Важно отметить, что методы химико-токсикологического и судебно-химического анализа тканей органов и биологических жидкостей на предмет присутствия кетотифена, который недавно приобрел значение в токсикологии, пока недостаточно разработаны.

Доступная литература указывает на то, что имеются лишь отдельные и недостаточно информативные публикации, касающиеся в основном анализа кетотифена в лекарственных формах.

При разработке методов судебно-химического анализа для определения кетотифена необходимо учитывать, что в своих физико-химических свойствах этот препарат, являясь производным метилпиперидина, относится к группе азотсодержащих соединений с основным характером. Это факт позволил нам провести обзор литературы, сфокусированный на химико-токсикологическом анализе именно этой подкатегории лекарственных средств.

Тонкослойная хроматография

Один из самых простых, но при этом информативных методов обнаружения - это использование хроматографии в тонких слоях сорбента (ТСХ). Благодаря своей скорости и возможности воспроизводимого проведения, ТСХ занимает ведущее положение среди методов анализа [3, 46, 62, 108, 110]. Этот метод также является одним из основных в системе скрининга лекарственных веществ и особенно полезен при анализе неизвестных соединений [46, 111, 112, 113]. Непрерывный прогресс в развитии хроматографической техники и методов сбора данных приводит к улучшению эффективности, чувствительности и точности анализа. Несмотря на широкое распространение методов, таких как газовая и жидкостная хроматография,

хроматография в тонких слоях по-прежнему остается востребованным методом из-за своей скорости, экономической выгоды и объективности. Это объясняется тем, что исследователь имеет возможность выбирать не только оптимальные сорбенты и системы растворителей, но и различные методы обнаружения. Кроме того, все анализируемые вещества и стандартные образцы могут быть представлены на одной хроматограмме, что облегчает их визуальную оценку [114].

Основным вопросом в разработке методики исследования ТСХ является правильный выбор хроматографической системы. Выбор условий хроматографирования во многом определяется физико-химическими свойствами исследуемого соединения. Однако нельзя не учитывать при этом и свойств сорбента, и свойств применяемых растворителей. Из числа сорбентов для целей хроматографического анализа наиболее широко в настоящее время применяется силикагель.

Подлинность лоратадина (Кларитина) представителя производного пиперидинилиденциклогептана, подтверждают через тонкослойную хроматографию (ТСХ), сопоставляя результаты с контрольным образцом (СО). Для этого используют раствор, полученный из растертых таблеток лоратадина эквивалентного 10 мг, растворенных в хлороформе и испытуемую надосадочную жидкость. Контрольный раствор содержит 10 мг лоратадина, растворенного в хлороформе. Образцы наносят на хроматографическую пластинку и разделяют в хроматографической камере с использованием системы растворителей. Затем пластинку сушат и анализируют в УФ-свете при 254 нм. На хроматограмме испытуемого раствора должно быть обнаружено пятно, соответствующее контрольному образцу по размеру и интенсивности поглощения [124].

Спектральные методы исследования

В доступной литературе приведены методы идентификации кетотифена и лоратадина с применением УФ-спектрофотометрии. Для кетотифена фумарата предлагается использование 0,1 М раствора хлороводородной кислоты для получения УФ-спектра в диапазоне 220-350 нм, который должен совпадать с УФ-спектром контрольного образца с максимальным поглощением при 300 нм. Этот метод также используется для обнаружения кетотифена в таблетках с использованием раствора хлороводородной кислоты в качестве растворителя и раствора-сравнения [32]. Однако эта методика была описана для определения кетотифена в крови.

Газожидкостная хроматография

В проанализированной литературе были выделена основная методика ГЖХ - использован хроматограф HP 5890 с масс-спектрометром HP 5972, капиллярная колонка HP-5MS (диаметр 0,25 мм, длина 20 см), гелий как газ-носитель (скорость 1,0 мл/мин), температуры инжектора и интерфейса

составляли 250°C и 280°C соответственно. Программирование температуры колонки варьировалось от 70°C до 270°C со скоростью 20°C/мин, с задержкой включения масс-спектрометра на 3 минуты. В методе использовалась ионизация электронным ударом с энергией ионизирующих электронов 70 эВ, а регистрация масс-спектров проводилась в режиме полного сканирования ионов с интенсивностью от 45 до 450 m/z. Ввод пробы осуществлялся вручную без разделения потока газа-носителя, а объем введенной пробы составлял 1 мкл в 95% этаноле при концентрации 10 мкг/мл. Получена хроматограмма с временем удерживания кетотифена 12,95 минут, с регистрацией характеристических ионов в диапазоне от 40 до 500 [138].

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Современная высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) широко используется в фармацевтике, биохимии и клинической токсикологии благодаря своей скорости, экономической эффективности, специфичности и воспроизводимости результатов анализа [3, 115, 116, 117, 118, 120]. ВЭЖХ выгодно отличается от других методов хроматографии по нескольким параметрам. В частности, он позволяет определять широкий диапазон молекулярных масс веществ и обеспечивает эффективное разделение при мягких условиях (чаще всего при комнатной температуре и в отсутствие контакта с воздухом). Эти особенности делают ВЭЖХ предпочтительным и часто единственным методом исследования нестабильных соединений, включая биологически активные вещества. Также ВЭЖХ обеспечивает возможность препаративного выделения чистых веществ для последующего анализа другими методами.

В практике экспресс-анализа лекарственных и наркотических веществ, а также при проведении химико-токсикологических исследований, метод ВЭЖХ широко применяется для направленного анализа, то есть определения конкретных соединений в различных биологических средах, а также для скрининга [51, 52, 61, 119, 120, 121]. Существует также вариант ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием представлен как эффективная стратегия для скрининга важных токсикологических соединений. Многими авторами было изучено более 300 различных веществ, включая кетотифен, извлеченных из образцов крови или плазмы с применением ЖЖЭ при pH 9,5 смесь хлороформ-2-пропанол-гептан (60:14:26). В процессе ВЭЖХ использовались определенные условия, включая изократический режим колонок, сорбент - Nova PAK C18 (Waters) при 30° C, состав элюента метанол тетрагидрофуран - фосфатный буфер pH 2,6, а идентификация проводилась с помощью сравнения с предварительно сохраненными данными в компьютерной библиотеке.

Некоторые авторы предлагают разработанный и проверенный метод ВЭЖХ с ультрафиолетовым детектированием, который отличается простотой, чувствительностью, быстротой и стабильностью. Этот метод применялся для определения содержания кетотифена в фармацевтических препаратах, таких

как таблетки и сиропы. В процессе ВЭЖХ использовалась технология изократического элюирования с использованием колонки с обращенной фазой С8, детектирования при 297 нм и смеси метанола, триэтиламинфосфатного буфера (рН 2,8; 0,04 М) и тетрагидрофурана в качестве подвижной фазы. Метод утвержден на селективность, линейность и точность в соответствии с рекомендациями Международной конференции по гармонизации 1996 года (ICH) [122].

Для другого представителя производного пиперидинилиденциклогептана - лоратадина используется следующая методика ВЭЖХ [125]:

- для приготовления испытуемого раствора лоратадина точную порцию препарата передавали в сосуд объемом 20 мл и добавляли 10 мл метанола, затем смесь перемешивали в течение 30 минут. Полученную смесь фильтровали через бумажный фильтр и доводили объем до 25 мл метанолом. К осадку в сосуде добавляли еще 10 мл метанола, перемешивали 10 минут и фильтровали суспензию через тот же фильтр в ту же мерную колбу. Осадок на фильтре промывали метанолом, а объем полученного фильтрата доводили до метки метанолом. Полученный раствор проходил дополнительную фильтрацию через мембранный фильтр с размером пор 0,47 мкм, отбрасывая первые 2 мл фильтрата;

- для приготовления раствора сравнения лоратадина в мерную колбу объемом 50 мл помещали около 50 мг препарата и растворяли в 40 мл метанола. Затем объем раствора доводили метанолом до метки и перемешивали. Далее 5,0 мл полученного раствора передавали в мерную колбу объемом 50 мл, доводили объем раствора метанолом до метки и перемешивали. Полученный раствор также проходил фильтрацию через мембранный фильтр с размером пор 0,47 мкм, отбрасывая первые 2 мл фильтрата;

- для проверки пригодности хроматографической системы в мерную колбу объемом 50 мл помещали 2 мг примеси дезлоратадина и 2 мг примеси лоратадина, растворяли в 40 мл метанола, доводили объем раствора до метки метанолом и перемешивали.

1.5 Методы изолирования из биоматериала азотсодержащих веществ основного характера

Важно отметить, что успех качественного и количественного анализа при любом методе в значительной степени зависит от правильной подготовки образцов, особенно в случае биологических материалов.

Вопреки появлению отдельных специализированных методов изоляции в последние годы [33, 34, 35, 36, 37, 38]. В судебно-химических лабораториях наиболее распространенными стали методы изоляции азотсодержащих основных соединений из биологических тканей, основанные на экстракции с использованием подкисленной воды. Особенно выделяется метод, использующий воду, подкисленную щавелевой кислотой, который остается

востребованным [39, 40, 41, 42, 43]. В частных схемах изолирования применяются ацетонитрил [44, 45], ацетон [34, 35, 36].

Для выделения основных веществ из биологических жидкостей обычно применяется метод жидкостно-жидкостной экстракции [44, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52] базируемый на разделении веществ между двумя растворителями, которые не смешиваются между собой. Эффективность извлечения зависит от характеристик анализируемого вещества, таких как его pK_a , способность к ионизации, а также от pH среды и селективности выбранного экстрагента [43, 47, 53, 54, 55, 68]. В методе жидкостно-жидкостной экстракции в качестве экстрагента часто применяются смеси растворителей, такие как хлороформ [49, 43, 56, 57] с этилацетатом [58, 59, 60], комбинации хлороформа с *n*-бутанолом, хлороформа с изопропанолом и другие.

Для извлечения и концентрации лекарственных и токсических веществ основного типа из мочи часто используется экстракция после предварительного гидролиза, обычно с применением кислоты, для разложения глюкуроидов и увеличения количества нативных соединений. При анализе лекарственных веществ из крови наилучшие результаты обычно достигаются при использовании сыворотки или плазмы крови. Многие лекарственные и токсические вещества основного типа существенно связываются с белками крови, преимущественно с глобулинами, поэтому анализ часто проводится в безбелковом фильтрате после осаждения белков различными методами, такими как добавление органических растворителей (например, ацетон, ацетонитрил, метанол, этанол), кислот (например, трихлоруксусная, вольфрамовая) или электролитов (например, аммоний и сульфаты натрия, хлорид натрия) [43, 58, 61, 62, 63]. Помимо методов экстракции, осаждения и центрифугирования, важными способами очистки и концентрирования веществ основного типа являются хроматографические методы, в особенности хроматография в тонких слоях сорбента. Этот метод сочетает в себе очистку, разделение и первичную идентификацию анализируемых соединений [46, 62, 64, 65, 66, 67]. Принципы и приемы хроматографического анализа суть одинаковы для всех соединений, с отличиями в использованных сорбентах и составе систем элюирования [46, 68, 69].

Вместо жидкостно-жидкостной экстракции (ЖЖЭ), можно использовать более простой метод подготовки образцов, известный как твердофазная экстракция (ТФЭ), основанный на сорбции веществ на твердом носителе. Для этого используются патроны, заполненные сорбентом, обладающим высокой эффективностью. Метод ТФЭ широко применяется для подготовки образцов, включая биологические жидкости (такие как моча, кровь, сыворотка) и экстракты этих жидкостей для анализа лекарственных и наркотических веществ.

Принцип ТФЭ основан на колоночной хроматографии, где компоненты взаимодействуют с твердой фазой в матрице. Матрица представляет собой жидкую среду, в которой растворяется исследуемый объект, а твердая фаза -

специальный сорбент, находящийся между пористыми фильтрами в патроне из инертного материала. В качестве сорбента чаще всего используется силикагель и его модифицированные формы. Процесс ТФЭ заключается в сорбции вещества и примесей из матрицы на сорбенте, а затем смывании сорбированных компонентов растворителями с различной полярностью от матрицы.

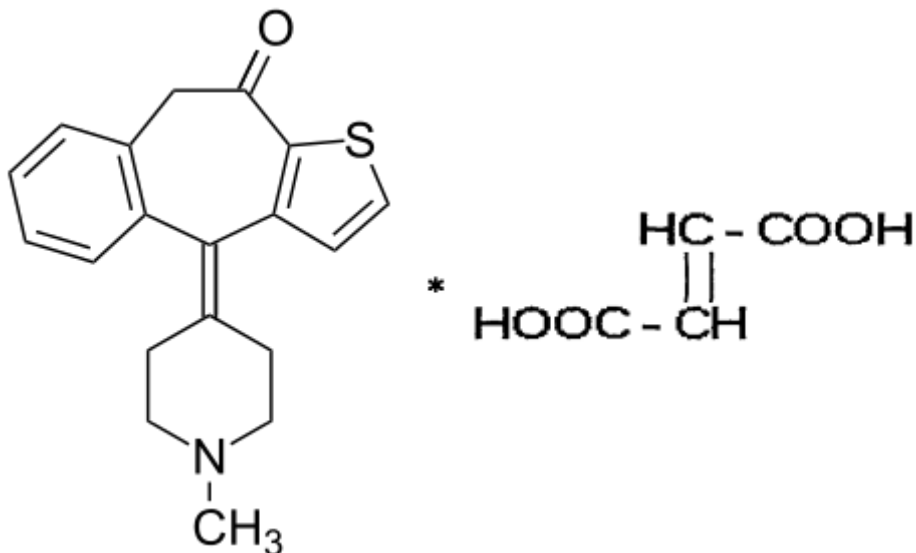
Основное преимущество ТФЭ перед традиционными методами подготовки образцов заключается в возможности одновременного извлечения и усиления концентрации целевых компонентов. Этот метод обеспечивает значительное увеличение скорости и эффективности процесса экстракции, что расширяет возможности применения хроматографических и спектральных методов анализа [70, 71].

Из обзора литературы видно, что до настоящего времени не проводилось химико-токсикологических исследований кетотифена, что представляет собой важную проблему. Наша задача заключается в разработке доступных и простых методик для проведения химико-токсикологического анализа данного вещества, с целью получения объективной и достоверной оценки результатов исследований.

2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной главе приводится описание объектов исследования, а также теоретические основы использованных в работе методов анализа.

2.1 Объекты исследования



4,9 – Дигидро – 4 – (1 – метил – 4 – пиперидинилиден) – 10Н – бензо [4, 5] циклогепта [1, 2b] тиофен – 10 – она фумарат.

Кетотифен – *Ketotifen Fumarate* – кетотифена фумарат.

Основные синонимы: Зарегистрированные лекарственные препараты содержащие в себе активное вещество кетотифен - Монокето, Кетотифен Софарма, Аллергокет и др. (Таблица 1) [31].

Кетотифена фумарат – белый или слегка желтовато-белый кристаллический порошок, практически не имеющий запаха. Обладает высокой гигроскопичностью. Точка плавления составляет от 184 до 200°C. Практически нерастворимы в воде, растворим в этаноле и метаноле. Очень мало растворим в хлороформе. Кетотифена фумарат хранят в тщательно закрытой упаковке, защищенной от воздействия влаги и света, при температуре от +15 до +20°C [32].

При проведении исследования в качестве стандартного образца (СО) использовали кетотифен фумарат, выделенный из лекарственной формы – таблетки 1 мг «Кетотифен Софарма» фирмы Софарма (Болгария) с содержанием основного вещества не менее 99%.

Модельная смесь. Для проведения качественного и количественного анализа кетотифена фумарата, выделенного из материала, биологического происхождения необходимо провести исследование и анализ чистого препарата.

В качестве биологического материала использовали модельные смеси, состоящие из исследуемого вещества и печени животного происхождения.

2.2. Методы исследования

Во время проведения исследований по идентификации кетотифена были применены следующие физико-химические методы анализа: ТСХ, УФ-спектрофотометрия, а также химические методы (осадительные, цветные реакции и реакции на функциональные группы).

При разработке методик количественного определения кетотифена были применены методы УФ-спектрофотометрии.

2.2.1 Химические методы исследования

При проведении химико-токсикологических исследований для выявления азотсодержащих соединений с основным характером широко применяются традиционные методы, такие как реакции осаждения и окрашивания, а также микрокристаллоскопические реакции.

Реакции окрашивания обычно не являются самостоятельными методами, а представляют собой лишь один из компонентов комплексного анализа. Их значение проявляется во взаимодействии с другими реакциями и методами, что является ключевым аспектом в химико-токсикологических исследованиях [72,73].

Реакции осаждения представляют собой метод анализа азотсодержащих соединений основного характера с использованием общеалкалоидных осадительных реактивов. Они основаны на способности этих соединений образовывать малорастворимые соли с кислотами, солями тяжелых металлов и комплексными иодидами. Несмотря на их универсальность, эти реакции отличаются высокой чувствительностью и могут предоставить важные данные о наличии исследуемых соединений при образовании кристаллических осадков [72,73].

Микрокристаллоскопические реакции представляют собой важный инструмент в комплексе методов идентификации азотсодержащих веществ в химико-токсикологических исследованиях [72,73].

2.2.2 Хроматографические методы исследования

2.2.2.1 Метод тонкослойной хроматографии

Тонкослойная хроматография (ТСХ) представляет собой метод разделения, основанный на использовании неподвижной фазы, состоящей из специально подготовленного тонкого слоя материала, нанесенного на подложку из стекла, металла или пластмассы. Перед проведением процедуры хроматографирования растворы анализируемых веществ наносят на пластину. Разделение происходит благодаря различным процессам, таким как адсорбция, распределение, ионный обмен или их сочетание, при перемещении исследуемых веществ в тонком слое неподвижной фазы под действием подвижной фазы, состоящей из растворителя или соответствующей смеси растворителей [126].

Этот метод широко используется в химико-токсикологическом анализе, в том числе для анализа лекарственных ядов благодаря своей селективности, чувствительности, простоте и удобству применения [127].

Для проведения исследований применялись хроматографические пластины производства ЗАО "Сорбполимер", такие как "Сорбфил" ПТСХ-П-В-УФ и "Сорбфил" ПТСХ-АФ-А-УФ размером 10x15 см. Эти пластины изготавливаются с использованием полимерной (полиэтилентерефталатной) или алюминиевой подложки, на которую наносится фракционированный сорбент толщиной 90-120 мкм с помощью специального связующего вещества.

Пластина для тонкослойной хроматографии состоит из слоя сорбента, закрепленного на подложке. В качестве сорбентов чаще всего используют оксид алюминия, силикагель и полиамид. Обычно пластинки применяют однократно.

Для разработки методики идентификации кетотифена с использованием тонкослойной хроматографии (ТСХ) исследовали его поведение в различных хроматографических системах, которые широко применяются в анализе "лекарственных ядов" в химико-токсикологических исследованиях:

- универсальная система для экспресс-анализа острых интоксикаций: толуол: ацетон: этанол: 25% р-р аммиака (45:45:7,5:2,5);
- частная система для обнаружения опийных алкалоидов: этилацетат: метанол: 25% р-р аммиака (17:2:1);
- общая система для идентификации веществ основного характера: диоксан: хлороформ: ацетон: 25% р-р аммиака (47,5:45:5:2,5).

После разделения смеси, которую анализируют, на отдельные компоненты хроматографирование прекращают, а в хроматографических зонах проводят качественные и количественные исследования (детектирование). Для нахождения бесцветных соединений чаще всего используют облучение УФ-светом, обработку химическими реагентами, погружения в раствор для проявки, капельное нанесение реагента, экстрагирование зоны вещества из сорбента для дальнейшего исследования.

Идентификацию компонентов осуществляли с помощью свидетелей - известных эталонных веществ сравнения, использующихся одновременно на одной пластине с веществом, которое анализируют.

Хроматографирование проводили в хроматографической камере.

Основной качественной характеристикой ТСХ является относительная величина удержания R_f , которая представляет собой отношение расстояния от точки нанесения пятна до центра пятна после хроматографирования, к расстоянию, пройденному фронтом растворителя от точки нанесения [124, 126, 127, 128]:

$$R_f = L_x / L, \quad (2.1)$$

где:

L_x - расстояние от точки нанесения пятна до верхней кромки пятна после хроматографирования;

L - расстояние, которое прошел фронт растворителя от точки нанесения.

Относительная величина удержания R_f является ключевым для идентификации соединений, так как каждое соединение имеет свой уникальный R_f [128]. При проведении идентификации указывается, что в условиях эксперимента R_f исследуемого вещества соответствует R_f образца-сравнения или стандарта. Эффективное распределение веществ происходит в диапазоне R_f от 0,2 до 0,7, а насыщение камеры растворителями влияет на значение R_f - в ненасыщенной камере R_f повышается. R_f также зависит от размера пробы и способа ее нанесения [130]. Результаты анализа могут быть повлияны условиями проведения эксперимента, поэтому для уменьшения влияния используется относительная величина R_s , которая отображает соотношение R_f исследуемого вещества к R_f стандарта. Несмотря на полное совпадение R_f исследуемого вещества и стандарта, результаты качественного определения методом ТСХ рекомендуется подтверждать другими методами [131].

2.2.3 Спектрофотометрические методы анализа

2.2.3.1 Метод УФ-спектрофотометрии

Многие органические и неорганические соединения проявляют способность максимально поглощать свет определенных длин волн в ультрафиолетовом диапазоне, что делает их важными для идентификации и количественного анализа в области токсикологической химии. Этот процесс поглощения света в ультрафиолетовой и видимой областях возникает из-за энергетических переходов, в которых участвуют электроны, находящиеся на внешних орбиталях или валентных уровнях атомов. Соединения с кратными связями (например, $>C=C$, $-N=O$, $>C=S$, $>C=O$ и другие) и ароматические соединения имеют особую способность к поглощению электромагнитной энергии в ультрафиолетовом диапазоне [132].

Метод УФ-спектрофотометрии обладает высокой чувствительностью и достаточной точностью, однако для его применения необходима тщательная очистка исследуемых веществ от сопутствующих примесей. Этот процесс может представлять сложности в рамках химико-токсикологических исследований, особенно при анализе образцов биологического происхождения [129, 134].

Принцип метода является сопоставление уровня поглощения излучения исследуемым веществом с спектром стандартного раствора. Два классических закона абсорбциометрии описывают степень поглощения излучения при определенной монохроматической длине волны. Закон Ламберта (или Бугера) утверждает, что при постоянной концентрации однородной поглощающей системы интенсивность света экспоненциально уменьшается с увеличением

длины пути. Закон Бера, с другой стороны, связан с концентрацией и утверждает, что при определенной длине пути передаваемая интенсивность света экспоненциально уменьшается с увеличением концентрации, что выражается оптической плотностью (A). Комбинируя эти два закона, получаем известный закон Бугера-Ламберта-Бера [126].

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \log \frac{I}{I_0}, \quad (2.2)$$

где:

$$T = (I_0 / I);$$

I_0 - интенсивность излучения, падающего на вещество;

I - интенсивность излучения, прошедшего сквозь вещество.

В случаях сравнения спектров, оптическая плотность часто представляется в логарифмической форме. Логарифмическое выражение закона Бугера-Ламберта-Бера отражает влияние молярного коэффициента поглощения (ϵ), концентрации (C) и длины оптического пути (B) [126]:

$$\log A = \log \epsilon + \log C + \log B, \quad (2.3)$$

где:

ϵ - молярный показатель поглощения;

B - длина оптического пути, в см;

C - концентрация вещества в растворе, моль/л.

Для разработки методики качественного и количественного анализа кетотифена исследования проводили на спектрофотометре Agilent Cary 60 (США), который позволяет просканировать весь диапазон длин волн в ультрафиолетовой и видимой областях от 190 до 1100 нм. Скорость сканирования до 24 000 нм/мин. При анализе спектров кетотифена готовили его растворы в различных растворителях, включая очищенную воду, 10% раствор гидроксида натрия и 0,1 М раствор HCL. Спектрофотометрия в ультрафиолетовой области широко используется в химико-токсикологических исследованиях благодаря своей достаточной точности и чувствительности. Однако этот метод требует предварительной очистки исследуемых соединений от примесей и сопутствующих веществ, что может быть затруднительно при анализе токсикологических образцов биологического происхождения [133, 134].

2.2.4 Методы изолирования органических веществ из объектов биологического происхождения

Анализ исследуемых веществ в биологических образцах представляет собой сложную задачу, даже с учетом появления новых методов анализа.

Поэтому для проведения химико-токсикологического анализа требуется последовательное выполнение нескольких этапов.

На первом этапе анализа проводится пробподготовка, где основной целью является извлечение исследуемых веществ из биологических образцов. В химико-токсикологическом анализе, изолирование представляет собой процесс перевода важных с точки зрения токсикологии соединений из образцов в жидкую фазу, такую как дистиллят, минерализат или вытяжка [129]. Иногда для извлечения токсичных и высокоактивных веществ из биологического материала применяют экстракционные методы, которые заключаются в перемещении данных соединений из водной среды в органический растворитель [135, 136].

После этого производится очистка анализируемых веществ от примесей и механических примесей, для чего используют центрифугирование, фильтрование, экстракцию, осаждение, а также другие физико-химические методы [137].

На последующем этапе осуществляется обнаружение и количественный анализ изолированных соединений.

В ходе исследования извлечения кетотифена фумарата из биологического образца, мы провели сравнительный анализ наиболее распространенных методов изоляции и экстракции органических соединений в химико-токсикологическом анализе, включая метод Стаса-Отто, метод А.А. Васильевой и метод В.Ф. Крамаренко.

3. МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ КЕТОТИФЕНА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ)

3.1 Химические методы идентификации

Для идентификации кетотифена были использованы осадительные и цветные реакции, а также микрокристаллоскопические реакции.

Для проведения реакций использовали стандартный раствор кетотифена фумарата 1 мг/мл.

Чувствительность реакций и предельное разведение рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{V \cdot 10^6}{m} \rightarrow m = \frac{C}{V \cdot 10^6}, \quad (3.1)$$

где : C - предельное разведение;
V - объем капли, мл (0,05);
m - предел обнаружения, мкг.

3.1.1 Цветные реакции

В процессе проведения анализа, мы наносили каплю реактива на сухой остаток основания кетотифена, который получили после испарения его хлороформного раствора, и визуально оценивали результаты реакции. Полученные данные представлены в таблице.... Как видно из таблицы, кетотифен не показывает окрашивания при взаимодействии с реактивом Эрдмана и концентрированной хлористоводородной кислотой. Наиболее чувствительными для обнаружения кетотифена оказались следующие реакции:

- с реактивом Марки, содержащим концентрированную серную кислоту и формальдегид, наблюдается сиреневато-фиолетовое окрашивание;
- с реактивом Манделина, содержащим концентрированную серную кислоту и кислоту ванадиевую, наблюдается розовое, переходящее в фиолетовое окрашивание;
- с концентрированной серной кислотой наблюдается зеленовато-желтое окрашивание, которое со временем исчезает.

Наиболее яркой и чувствительной (2 мкг) считается реакция кетотифена с концентрированной серной кислотой, содержащей формальдегид. Также реактив Марки был использован для обнаружения зон локализации кетотифена в хроматографическом исследовании (метод пипетирования).

Предел обнаружения кетотифена при использовании этих реакций в хлороформных экстрактах, полученных из биологического материала, составляет 0,16 мкг.

Таблица 2 - Результаты взаимодействия кетотифена с различными реактивами для реакции окрашивания

№ п/п	Реактив	Результат взаимодействия	Цвет	мкг
1	Кислота серная концентрированная	положительная	Зеленовато-желтое	10
2	Кислота азотная концентрированная	Слабо положительная	Желтое исчезающее	15
3	Кислота хлористоводородная концентрированная	отрицательная	-	-
4	Реактив Марки	Резко положительная	Сиреневато-фиолетовое	2
5	Реактив Фреде	Слабо положительная	Зеленоватое исчезающее	12,5
6	Реактив Манделина	Резко положительная	Розово-фиолетовое	4
7	Реактив Эрдмана	отрицательная	-	-

3.1.2 Осадительные реакции

Было проведено изучение реакции кетотифена с различными осадительными реактивами.

В ходе исследования применялись следующие методики: сначала растворяли сухой остаток основания в небольшом количестве 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной, после чего добавляли одну каплю соответствующего реактива. Затем производили визуальное наблюдение и через 5-10 минут анализировали в поле зрения микроскопа. Проводились испытания на взаимодействие кетотифена с различными реактивами, включая концентрированные азотную, серную и хлористоводородную кислоты, а также реактивы Марки, Фреде, Манделина и Эрдмана. Полученные результаты приведены в таблице 3. Выводы показывают, что с большинством реактивов наблюдались обильные, главным образом аморфные осадки при взаимодействии с кетотифеном. Наиболее чувствительной реакцией оказалось взаимодействие с реактивом Драгендорфа, где минимальное количество обнаруженного вещества составило 0,8 мкг в пробе. Некоторые реактивы, такие как мидииодид, ртуть дихлорид, кислота золотохлористоводородная и

ализариновый красный, вызывали образование осадков с кристаллической структурой, однако процесс обычно протекал медленно, и микроскопическое изображение не всегда было очень наглядным. Наиболее чувствительной и специфичной реакцией оказалось взаимодействие с 5% раствором кислоты золотохлористоводородной, при котором наблюдалось образование тонких шестигранных пластинок в поле зрения микроскопа (рисунок 1). Чувствительность обнаружения данного метода составляла 2 мкг вещества в пробе.

Таблица 3 - Результаты взаимодействия кетотифена с различными осадительными реактивами

№ п/п	Реактив	Результаты взаимодействия	
		Аморфный	Кристаллический
1	Кислота пикриновая	слабо положительная	отрицательная
2	Реактив Драгендорфа	резко положительная	отрицательная
3	Реактив Бушарда	резко положительная	отрицательная
4	Реактив Зонненшейна	слабо положительная	отрицательная
5	Реактив Майера	положительная	отрицательная
6	Реактив Марме	положительная	отрицательная
7	Реактив Рейнеке	положительная	отрицательная
8	Реактив Шейблера	слабо положительная	отрицательная
9	Реактив железно-йодидный	резко положительная	отрицательная
10	Реактив медно-йодидный	резко положительная	слабо положительная
11	Реактив медно-пиридиновый	слабо положительная	отрицательная

12	Реактив хлор-цинк-йод	положительная	отрицательная
13	Раствор ртути (II) хлорида	резко положительная	слабо положительная
14	Раствор кобальта роданида	слабо положительная	отрицательная
15	Раствор цинка роданида	слабо положительная	отрицательная
16	Раствор калия иерманганата	слабо положительная	отрицательная
17	Раствор кадмия йодида	слабо положительная	отрицательная
18	Реактив золотохлористо-водородной кислоты	резко положительная	резко положительная

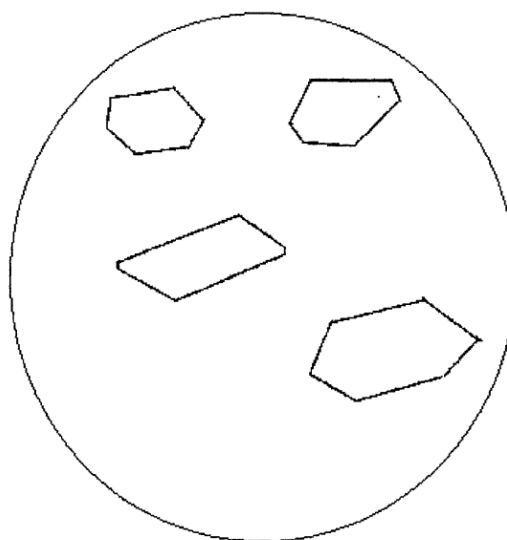


Рисунок 1. Кристаллы кетотифена с кислотой золотохлористоводородной

Реактивы группового осаждения алкалоидов также дают осадки с белковыми веществами и продуктами их гидролиза. Таким образом, представленные реакции с реактивами группового осаждения алкалоидов

можно использовать только как предварительные пробы на наличие азотсодержащих органических соединений основного характера, которые выделены из биологического материала.

3.2 Физико-химические методы идентификации

3.2.1. Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ)

Тонкослойная хроматография особенно в варианте ВЭТСХ - высокоэффективной тонкослойной хроматографии является базовым методом благодаря своей доступности, простоте выполнения, достаточной чувствительности и избирательности. Применение ее традиционно для судебно-химической практики и оправдало себя при определении токсических органических веществ различных химических классов при исследовании экстрактов из органов различного характера и состояния. Из числа преимуществ метода следует отметить также простоту подготовки хроматографических пластинок к анализу, возможность несложного и эффективного контроля за хроматографическим разделением (с помощью метчиков); небольшие объемы используемых для элюирования растворителей; возможность применения многократного хроматографирования. В целом ряде случаев хорошие результаты дает и круговая хроматография.

При исследованиях использованы хроматографические пластинки «Сорбфил» ПТСХ-П-В-УФ и «Сорбфил» ПТСХ-АФ-А-УФ (Россия) на основе немодифицированного силикагеля, закрепленного на поверхности подложки с помощью связующего - силиказоля.

Для создания оптимальных условий хроматографирования одной из первоочередных задач является и выбор системы растворителей, который связан как с природой сорбента, так и со свойствами анализируемого вещества.

Была исследована хроматографическая подвижность кетотифена в индивидуальных растворителях (был взят элюотропный ряд по Шталго - гексан, гептан, циклогексан, четыреххлористый углерод, хлороформ, эфир, этилацетат, пиридин, ацетон, этанол, метанол, характеризующий изменение адсорбируемости вещества с изменением полярности растворителей) [116] и различных (двух-, трех-, четырех-) комбинированных системах растворителей, применяемых в клинических и химико-токсикологических анализах лекарственных соединений, в том числе азотсодержащих веществ основного характера. Подвижную фазу готовили энергичным встряхиванием компонентов растворителей в склянке с притертой пробкой. Время насыщения камеры парами растворителей 25 минут.

Метчиком служил стандартный раствор кетотифена с концентрацией 1 мг/мл в хлороформе или 95% этаноле. Для обнаружения зон локализации кетотифена на хроматограммах использовали поэтапную обработку с применением:

- экспозиции (визуальное наблюдение) пластинки в УФ-свете при светофильтре $\lambda = 254$ нм;

- обработки реактивом общегруппового назначения (реактив Драгендорфа) модифицированный по Мунье и по Бергофф-Дельвичу;

На линию старта хроматографической пластины наносили 10 мкл (10 мкг) стандартного раствора кетотифен. Пластины высушивали, помещали в предварительно насыщенную подвижной фазой камеру и хроматографировали в наиболее оптимальных системах растворителей. Время насыщения камеры - 25 минут. Длина пробега растворителя во всех случаях составляла 10 см. Значения Rf (n=5) кетотифена в использованных системах растворителей представлены в таблице 4.

Таблица 4- Значения Rf кетотифена при хроматографировании (n=5)

№	Система растворителей	Значение Rf
1	Этилацетат – этанол – аммиак 25% (34:4:2)	0,7
2	Этанол – аммиак 25%	0,45
3	Бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (20:5:25)	0,35
4	Этилацетат – ацетон – аммиак 25% (26:12:2)	0,17
5	Хлороформ - ацетон- аммиак 25% (45:5:2,5)	0,05

Таблица 5 - Результаты детектирования кетотифена при использовании ряда детекторов, применяемых в ХТА

Детектор	Эффект	Чувствительность, мкг
УФ - свет (254 нм)	Область поглощения темно-синего цвета при 254 нм	1,5
Реактив Драгендорфа, модифицированный по Мунье	Пятно оранжево-коричневого цвета	0,8
Реактив Драгендорфа	Желтовато- или красновато-оранжевые пятно	0,3
Реактив Манделина	Нет эффекта	3
Реактив Марки	Светло-оранжевое пятно	1,2

Для апробации хроматографического исследования на стартовую линию хроматографических пластинок с помощью калиброванного капилляра

наносили стандартный раствор кетотифена. Отмечали длину пробега растворителей - 10 см (линия финиша) и хроматографировали в герметично закрывающихся камерах. После пробега растворителя пластинки доставали, удаляли растворитель в токе холодного воздуха и проводили детектирование опрыскиванием из пульверизатора реактивом Драгендорфа или капельно (пипетированием) реактивом Марки. Рассчитывали показатель Rf. Значение Rf для кетотифена составило 0,7. После обработки пластинки реактивом Драгендорфа обнаруживалось желтовато- или красновато-оранжевые пятно кетотифена.

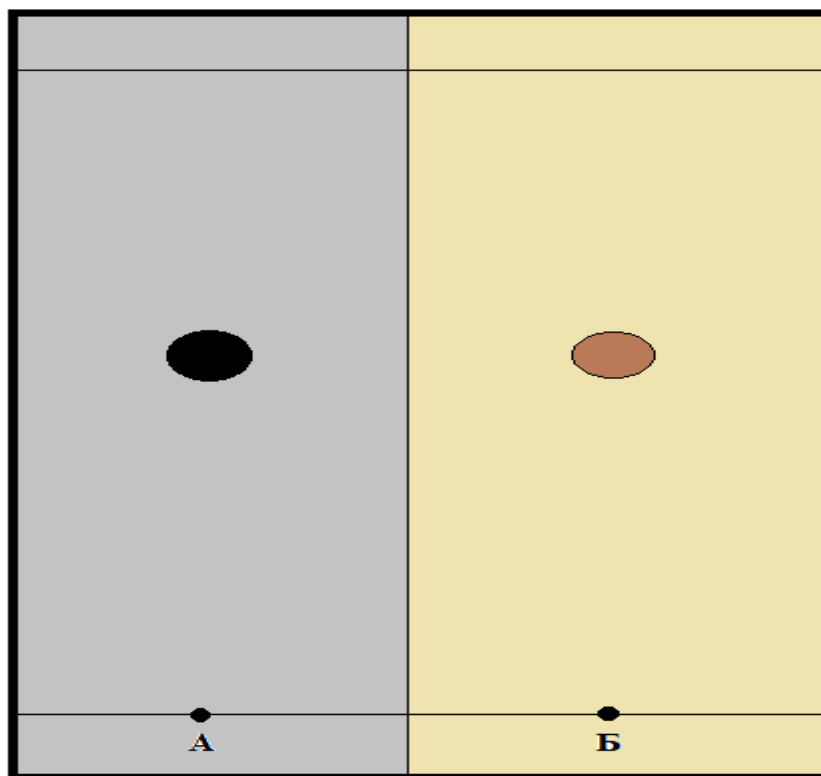


Рисунок 2. Схема детектирования кетотифена

А - изображение хроматографической пластины под УФ-освещением при длине волны 254 нм; Б - при воздействии реактивом Драгендорфа

Следующим шагом нашей работы стало определение чувствительности выбранных детекторов. Для этого на пластинки наносили микрошприцом стандартные растворы исследуемого вещества в хлороформе в количестве, соответствующем 5,0; 2,5; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5 и 0,01 мкг исследуемого вещества. Пластинки хроматографировали во всех выбранных системах растворителей.

Как показывает таблица 5, все использованные методы обнаружения обладают значительной чувствительностью. Однако наиболее чувствительным является реактив Драгендорфа, с обнаружимым пределом в 0,3 мкг. Среди более специфических методов следует отметить реактив Марки, обнаружимый при уровне в 1,2 мкг.

3.2.2 Метод УФ-спектрофотометрии

Метод УФ – спектрофотометрии широко используется в современном химическом, фармацевтическом и химико-токсикологическом анализах для установления структуры химических соединений, а также для их идентификации. Обнаружение веществ методом УФ-спектрофотометрии основано на сравнении спектра поглощения исследуемого вещества с приведенным в литературе спектром данного соединения или с полученным ранее спектром заведомо известного образца.

Для изучения спектров кетотифена готовили его растворы в соответствующих растворителях (см. раздел 2.2.3.1) с таким расчетом, чтобы концентрация приготовленных растворов составляла 15 мкг/мл. Оптическую плотность приготовленных растворов определяли с помощью прибора Cary 60 в кювете с толщиной слоя жидкости 10 мм. Измерения оптической плотности проводили в диапазонах длин волн 200 - 400 нм.

Результаты выполненных нами исследований приведены на рисунке 3-7 и в таблице 7.

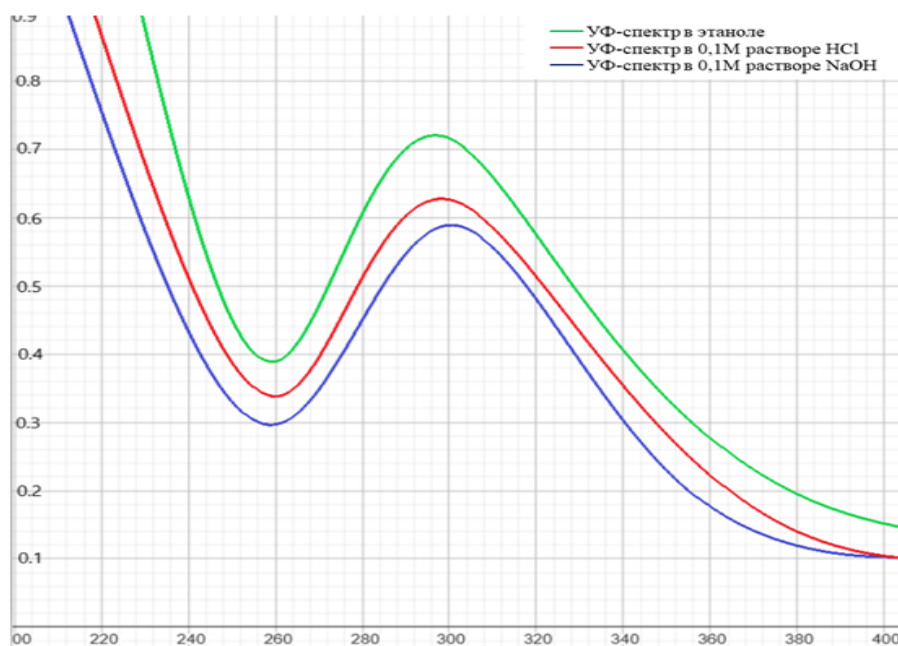


Рисунок 3. УФ-спектры раствора кетотифена (15 мкг/мл) в различных растворителях

Таблица 6- Зависимость оптической плотности раствора кетотифена от применяемых растворителей

№	Длина	Оптическая плотность
---	-------	----------------------

	волны, λ , нм	Этанол	0,1 М раствор кислоты хлороводородной	10% спиртовый раствор гидроксида натрия
1	260	0,3899	0,3504	0,3034
2	270	0,4987	0,4045	0,3309
3	280	0,6021	0,5044	0,4552
4	290	0,7011	0,6113	0,5501
5	300	0,7193	0,6309	0,5909
6	310	0,6602	0,5732	0,5413
7	320	0,5972	0,5247	0,5023

В УФ-спектрах растворов кетотифена в этаноле наблюдали один максимум поглощения при длине волны 298 нм (рисунок 4).



Рисунок 4. УФ-спектры раствора кетотифена в этаноле

В УФ-спектрах растворов кетотифена в 0,1 М растворе кислоты хлороводородной наблюдали один максимум поглощения при длине волны 300 нм (рисунок 5).

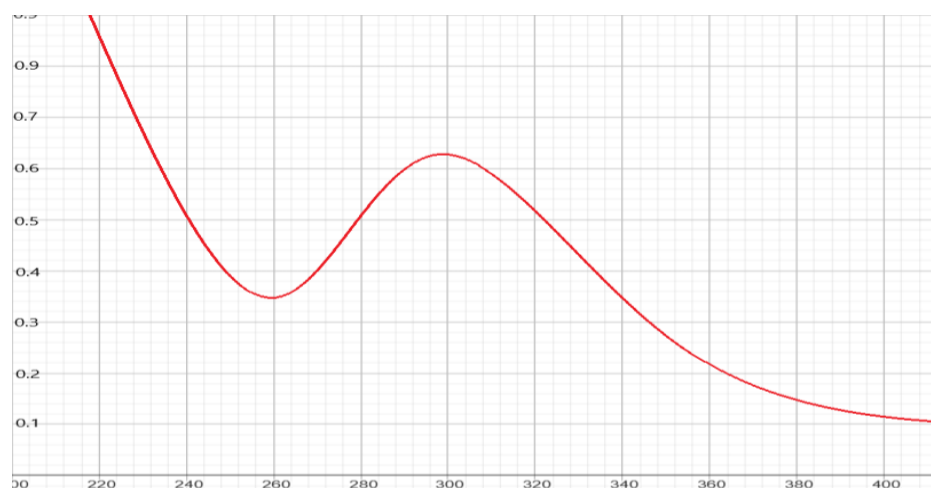


Рисунок 5. УФ-спектры раствора кетотифена в 0,1 М растворе кислоты хлороводородной

В УФ-спектрах растворов кетотифена в щелочной среде (10% спиртовый раствор гидроксида натрия) наблюдали один максимум поглощения при длине волны 299 нм (рисунок 6).

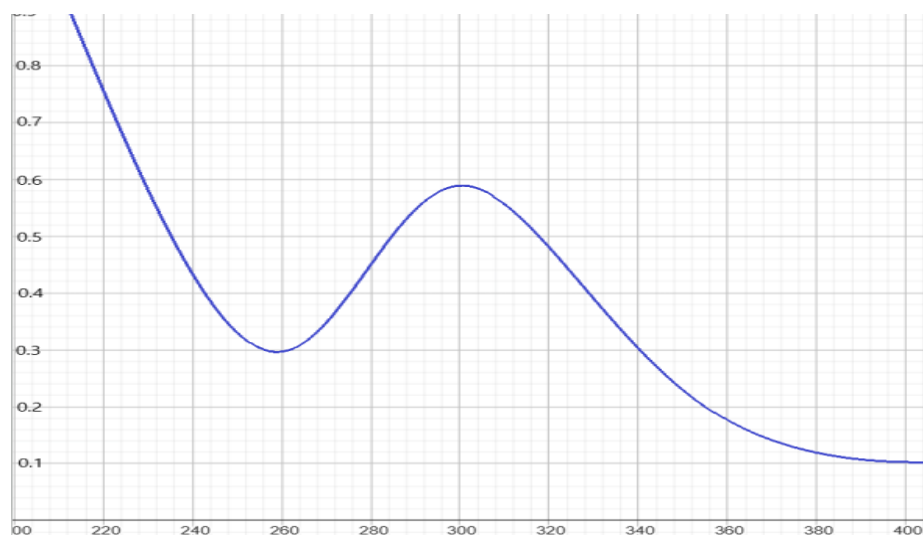


Рисунок 6. УФ-спектры раствора кетотифена в 10% спиртовом растворе гидроксида натрия

Наиболее интенсивным является максимум поглощения кетотифена при длине волны 300 нм в 0,1 М растворе кислоты хлороводородной. Поэтому для дальнейших исследований мы использовали кетотифен в 0,1 М растворе кислоты хлороводородной.

Удельный ($A_{1\text{см}}^{1\%}$) и молярный (ϵ) коэффициент светопоглощения рассчитывают по следующим формулам:

$$A_{1\text{см}}^{1\%} = b \cdot C, \quad (3.1)$$

где:

A - оптическая плотность;

b - толщина слоя, см (1 см);

C - концентрация раствора кетотифена, % ($\cdot 10^{-4}$),

$$\varepsilon = \frac{A}{b \cdot C}, \quad (3.2)$$

где:

C – концентрация раствора, моль/л.

Молярный коэффициент светопоглощения можно также определить с помощью следующей формулы:

$$\varepsilon = (A_{1\text{см}}^{1\%}) \cdot \frac{M}{10}, \quad (3.3)$$

где:

M - молярная масса препарата.

Таблица 7- Спектральные характеристики кетотифена в различных растворителях

Растворители	Кетотифен	
	$A_{1\text{см}}^{1\%}$	ε
Этанол	299	15909,25
10% спиртовой раствор гидроксида натрия	323	14083,69
0,1 М кислота хлороводородная	333	14986,82

4. МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЕТОТИФЕНА

4.1 Метод УФ-спектрофотометрии

Метод спектрофотометрического количественного определения лекарственных средств достаточно широко применяется в фармацевтическом и химико-токсикологическом анализах. Достоинство этого метода заключается в чувствительности, специфичности, воспроизводимости и доступности.

При разработке УФ - спектрофотометрической методики количественного определения кетотифена были использованы предварительно полученные УФ - спектры раствора кетотифена в 0,1 М растворе кислоты хлороводородной (см. раздел 3.2.2)

Построение градуировочного графика. Для построения калибровочного графика точную навеску 0,05 г кетотифена растворяли в 0,1М растворе кислоты хлористоводородной в мерной колбе на 25 мл (раствор А) доводили до метки 0,1М раствором кислоты хлористоводородной (раствор Б). В мерные колбы на 25мл отмеривали по 0,3; 0,6; 1,0; 1,3; 1,6; 2,0 мл раствора Б и доводили до метки 0,1М раствором кислоты хлористоводородной. Абсорбцию стандартных растворов измеряли при 300 нм на спектрофотометре Сору 60 в 1 см кюветах относительно чистого растворителя. Как раствор сравнения использовали 0,1 М раствор кислоты хлороводородной. По результатам измерения оптической плотности рассчитывали удельные и молярные коэффициенты светопоглощения. Результаты приведены в таблице 8.

Таблица 8 - Результаты статистической обработки величины удельного и молярного коэффициентов светопоглощения раствора кетотифена в 0,1 М растворе кислоты хлороводородной (n=5)

Концентрация кетотифен, мкг/мл	Оптическая плотность	$A_{1\text{см}}^{1\%}$	Метрологические характеристики	E	Метрологические характеристики
5	0,125	337,5	$\bar{X}=333,383;$ $S^2=7,17;$	14360,62	$\bar{X}=14185,4;$ $S^2=12987,58;$
10	0,352	335,0	$S=2,7;$	14254,251	$S=363,65;$
15	0,577	332,1	$S_{\bar{x}}=2,67;$	4130,85	$S_{\bar{x}}=113,96;$
20	0,796	334,0	$\Delta\bar{X}=\pm 7,5;$	14211,7	$\Delta\bar{X}=\pm 319,1;$
25	1,006	331,7	$\bar{\varepsilon}=1,33;$	14113,831	$\bar{\varepsilon}=7,15;$
30	1,037	330,0	$\bar{X} \pm \Delta\bar{X} =$ $333,38 \pm 7,5$	4,041,5	$\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$ $=14185,4 \pm 319,1$

Из данных, приведенных в таблице 9, можно сделать вывод, что подчинение основному закону светопоглощения наблюдается в интервалах концентраций кетотифена от 5 до 32 мкг/мл. Расчеты удельного и молярного коэффициентов светопоглощения проводили по формуле:

$$A^{1\%}_{1\text{см}} = \frac{A}{C * l}; \quad (4.1)$$

где: $A^{1\%}_{1\text{см}}$ - удельный коэффициент светопоглощения;
 A – оптическая плотность;
 C - концентрация вещества, %;
 l - толщина слоя жидкости, см.

$$\varepsilon = A^{1\%}_{1\text{см}} * \frac{M}{10}; \quad (4.2)$$

где: ε - молярный коэффициент светопоглощения;
 M - молекулярная масса вещества.

Разработанную методику мы использовали для количественного определения кетотифена спектрофотометрическим методом в растворах различной концентрации. Для расчета количества кетотифен в растворах использовали градуировочный график (рисунок 7).

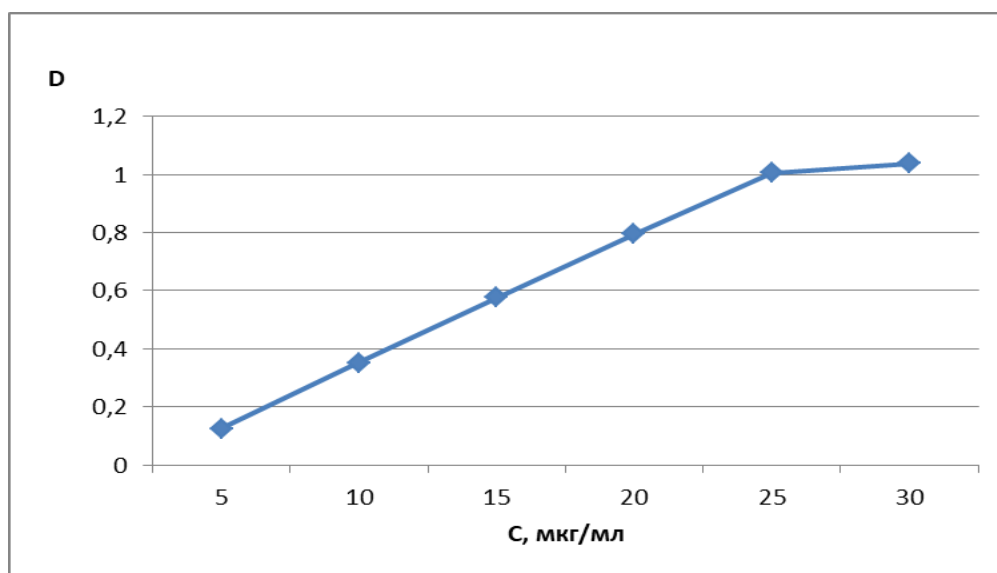


Рисунок 7. Градуировочный график спектрофотометрического определения раствора кетотифен в 0,1 М растворе кислоты хлороводородной

Зависимость оптической плотности от концентрации кетотифена была аппроксимирована линейным уравнением с помощью метода наименьших квадратов на ПК. Коэффициент корреляции составил 0,999982. Калибровочный график УФ-спектрофотометрического определения кетотифена представлены на рис. 7. Подчинение основному закону светопоглощения наблюдается в интервалах концентраций кетотифена от 5 до 25 мкг/мл.

Результаты спектрофотометрического количественного определения кетотифена в растворах с помощью разработанной методики приведены в таблице 9.

Таблица 9 - Результаты спектрофотометрического количественного определения раствора кетотифен в 0,1 М растворе кислоты хлороводородной, рассчитанные с помощью градуировочного графика (среднее значение 5 измерений)

Взято кетотифена, мкг	Оптическая плотность (A)	Найдено		Метрологические характеристики
		мкг	%	
5	0,125	4,905	98,1	$\bar{X}=99,54 \%$ $S^2=0,06;$ $S=1,26$ $S\bar{x}=0,25$ $\Delta\bar{X}=0,715;$ $\bar{\varepsilon}=1,33$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}= 99,54 \pm 0,715$
10	0,352	9,93	99,3	
15	0,577	14,8	98,7	
20	0,796	19,7	98,5	
25	1,006	24,37	97,5	
30	1,037	29,25	97,8	

Из данных таблицы 9 видно, что относительная ошибка при статистической обработке результатов определения удельного показателя поглощения составляет $\pm 1,33$.

5. ИЗУЧЕНИЕ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ КЕТОТИФЕНА ИЗ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ

5.1 Экстракция кетотифена из водных растворов органическими растворителями в зависимости от рН среды

Метод использования органических растворителей для извлечения веществ получил широкое распространение в области химико-токсикологического анализа. Этот метод позволяет изолировать и сконцентрировать токсичные соединения, одновременно удаляя большинство примесей [35]. Этот метод включает процесс извлечения исследуемых веществ из объектов исследования при помощи различных растворителей. Экстракция может проводиться как из твердых веществ, так и из жидкостей, что определяет две основные формы: экстракцию в системе твердое тело — жидкость и экстракцию в системе жидкость — жидкость, которую также называют жидкостной экстракцией [72, 73, 135, 139, 140].

Мы осуществили экспериментальную проверку гипотез относительно влияния рН на процесс экстрагирования кетотифена различными органическими растворителями. Для этого мы использовали универсальные буферные растворы Бриттона и Робинсона, а также чистые органические растворители - хлороформ, диэтиловый эфир и гексан. Использовали растворители с наименьшей смешиваемостью с водой, и не включали в исследование растворители с более высокими значениями диэлектрической проницаемости.

Для измерения значений рН мы использовали РН-метр модели РН-150МИ.

Для проведения исследования мы смешивали 1 миллилитр водного раствора, содержащего 0,2 миллиграмма кетотифена, с 9 миллилитрами универсальной буферной смеси определенного значения рН, после чего добавляли 10 миллилитров одного из органических растворителей. Затем смесь взбалтывалась в течение 10 минут на электромагнитной мешалке. После разделения фаз с помощью делительной воронки органический растворитель фильтровали через стеклянный фильтр с безводным натрием сульфатом. Остаток органического растворителя испаряли при комнатной температуре до полного высыхания, а затем растворяли в 10 миллилитрах 0,1М раствора хлористоводородной кислоты для последующего количественного определения при помощи УФ-спектрофотометра Agilent Cary 60 при длине волны 300 нм.

В таблице представлены результаты измерения эффективности извлечения кетотифена органическими растворителями из водных растворов при изменении значения рН.

Таблица 10 - Степень выделения кетотифена органическими растворителями в зависимости от различных уровней рН

Значения рН Водного раствора	Экстракция кетотифена в %		
	Хлороформ	Диэтиловый эфир	Гексан
2	36,98	42,02	21,5
3	42,02	59,05	22,87
4	59,05	70,73	22,4
5	70,73	69,05	23,5
6	77,38	70,73	29,8
7	78,11	77,55	31,5
8	96,55	79,05	35,9
9	99,83	80,73	38,58
10	99,84	84,99	39,8
11	99,86	89,05	41,56
12	85,6	86,03	47,26
13	87,5	83,45	47,5
14	82,3	77,42	45,4

Из результатов следует, что кетотифен эффективно извлекается органическими растворителями при определенных значениях рН. Например, при рН 8 начинается экстракция, а при рН 11 достигается максимальная эффективность с использованием хлороформа. Эти наблюдения говорят в пользу применения хлороформа в качестве оптимального растворителя для изолирования кетотифена в химико-токсикологических анализах биологических образцов.

Полученные данные послужили основой для разработки методик определения кетотифена в биосубстратах. Однако для успешного выделения из биологических образцов необходимо учитывать не только значение рН и растворимость, но и другие факторы, такие как связывание с белками и другими соэкстрагирующими веществами, а также потенциальное влияние фоновых соединений и процессы биотрансформации.

6. ВЫДЕЛЕНИЕ КЕТОТИФЕНА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

6.1 Изолирование кетотифена из биологических объектов общеизвестными методами

Эффективность метода изоляции вещества из объекта исследования имеет критическое значение для результатов химико-токсикологического анализа. Успех анализа зависит от таких факторов, как количество извлеченного вещества, разрешающая способность метода и чистота получаемых остатков. В российских судебно-химических лабораториях наиболее распространены методы изоляции азотсодержащих лекарственных веществ, основанные на использовании подкисленной воды.

В ходе исследования методами изолирования кетотифена мы использовали модельные образцы. Созданные модельные смеси состояли из исследуемого вещества и печени животного происхождения. Из всех внутренних органов, подлежащих химико-токсикологическому анализу, печень представляет особую ценность. Учитывая сложность анализа ткани печени, наша работа была направлена на моделирование эксперимента с использованием свежего биологического материала.

В рамках нашего исследования мы анализировали эффективность изоляции кетотифена из биологических образцов с применением традиционных методов выделения важных токсикологических соединений:

1. Метод Стаса-Отто в модификации А.В. Удалова, основанный на использовании этанола, к которому добавлялась щавелевая кислота для подкисления.
2. Метод А.А. Васильевой, где вода использовалась в сочетании с щавелевой кислотой для подкисления.
3. Метод В.Ф. Крамаренко, в котором вода использовалась вместе с серной кислотой для подкисления.

6.1.1 Выделение кетотифена по методу А.А. Васильевой

Для извлечения кетотифена из биологического материала был применен метод А.А. Васильевой, описанный в публикации [141], однако, с учетом применения более чувствительных методов анализа, мы внесли изменения в методику, что позволило сократить массу используемого биологического объекта до 10,0 г., также были изменены объемы используемых экстрагирующих жидкостей для извлечения кетотифена из биологического материала. Для исследования биологического объекта мы добавляли 100 миллилитров дистиллированной воды к объекту в соотношении 1:2 и подкисляли до значения рН 1-2, используя насыщенный водный раствор щавелевой кислоты. Значение рН определяли с помощью универсального индикатора. После двухчасового настаивания при периодическом перемешивании водное извлечение вместе с объектом подвергали

центрифугированию при скорости 5 тысячи оборотов в минуту в течение 25 минут. Извлечение из водного экстракта производили с использованием хлороформа при рН 10-11 (путем добавления 25% раствора аммиака) дважды по 25 мл на электровстряхивателе в течение 10 минут. Хлороформные извлечения объединяли и фильтровали через сухой мелкопористый стеклянный фильтр с безводным натрия сульфатом. Объем доводили хлороформом до 50 мл в мерной колбе перед проведением дальнейших исследований.

6.1.2 Выделение кетотифена по методу Стаса-Отто в модификации

А.В. Удалова

Для создания модельной или соответствующей контрольной смеси 20 мл 96-процентного этанола заливали и оставляли на 24 часа в теплом месте (25-30°C) при постоянном перемешивании. Затем смесь центрифугировали (5 минут при 5000 об./мин.) и сливали спиртовое извлечение. Биологический материал повторно заливали 20 мл 96-процентного этанола и оставляли на 18 часов при постоянном перемешивании. После этого снова центрифугировали смесь (5 минут при 5000 об./мин.) и сливали спиртовое извлечение. Полученные спиртовые извлечения объединяли, а биологический материал промывали этанолом. Промывную жидкость добавляли к ранее полученным этанольным извлечениям и подкисляли 6 моль/дм³ раствором хлористоводородной кислоты до рН=2. Затем переносят в фарфоровую чашку и упаривают на водяной бане (при температуре не выше 40°C) до густоты сиропа. Сиропообразную жидкость трижды обрабатывают ацетоном порциями по 7,5 мл, смесь центрифугируют (5 минут при 5000 об./мин.). Центрифугат снова упаривают до объема 0,5 мл, остаток дважды поочередно обрабатывают 2,5 мл диэтилового эфира и 2 мл 0,1 моль/дм³ раствора хлористоводородной кислоты. Органический слой собирают и фильтруют через бумажный фильтр с добавлением 1 г натрия сульфата безводного в мерную колбу емкостью 25 мл, доводят объем хлороформом до метки (извлечение 4А – основное и контрольное). Кислое водное извлечение подщелачивают 25-процентным раствором аммиака до рН=11 и трижды экстрагируют хлороформом порциями по 10 мл (при образовании стойких эмульсий применяют центрифугирование (5 минут при 5000 об./мин.)). "Щелочные" хлороформные извлечения объединяют и фильтруют через бумажный фильтр с добавлением 1 г натрия сульфата безводного в мерную колбу емкостью 25 мл, доводят объем хлороформом до метки (извлечение 4Б – основное и контрольное).

6.1.3 Выделение кетотифена по методу В.Ф. Крамаренко

Для выделения кетотифена из биологического материала мы применили модифицированный метод, основанный на методике В.П. Крамаренко. Сначала мы подготовили модельные смеси кетотифена и печени в соответствии с указанным в разделе 6.1.1. способом. Затем каждую модельную смесь мы дополнили 10 миллилитрами 0,02 М раствора серной кислоты до достижения

значения рН в диапазоне 2-3 и оставили настаиваться в течение 2 часов с периодическим перемешиванием. Далее мы отделяли раствор от биоматериала и добавляли новые порции 0,02 М раствора серной кислоты по 10 миллилитров, проводя двукратное настаивание (по 1 часу), поддерживая рН в указанном диапазоне и периодически перемешивая. Объединенные кислые водные вытяжки мы процедили и подвергли центрифугированию в течение 5 минут при 5000 оборотах в минуту. Верхний слой мы отделили, а осадок настаивали в течение двух часов 0,2 М раствором серной кислоты. После центрифугирования мы соединяли центрифугат с кислым водным извлечением и проводили дальнейшие исследования. Кислые водные вытяжки мы экстрагировали трижды диэтиловым эфиром по 10 миллилитров, а полученные эфирные слои не подвергали дальнейшему анализу. Оставшиеся после экстракции кислые водные вытяжки мы щелочили 20% раствором гидроксида натрия с рН 10,0 и экстрагировали трижды хлороформом по 10 миллилитров. Полученные щелочные хлороформные слои мы объединяли и проводили их дальнейший анализ на идентификацию и количественный анализ кетотифена. В случае образования устойчивых эмульсий в процессе экстракции, мы подвергали их центрифугированию в течение 5 минут при 5000 оборотах в минуту.

6.2 Обнаружение кетотифен в вытяжках из биологического материала

Для выявления кетотифена, извлеченного из биологического образца, мы применили разнообразные методы, включая проведение окрасочных и осадительных тестов, анализ методом УФ-спектрофотометрии и использование техники тонкослойной хроматографии.

Цветные и осадительные реакции. При анализе вытяжек из биологического образца на предмет содержания кетотифена мы проводили испарение 5 мл хлороформного экстракта на водяной бане, последующее перенесение на белые фарфоровые чашки и испарение растворителя. Для осуществления цветных и осадительных реакций мы наносили соответствующие реактивы на сухие остатки по капле. Полученные результаты были сопоставимы с результатами анализов, проведенных с использованием стандартного раствора, описанными в разделе 3.1.

Таблица 11 - Результаты определения кетотифена, извлеченного из биоматериала при помощи окрасочных и осадительных тестов

№	Тип реакции	Реактивы	Эффект реакции
1	Цветные реакции	Кислота серная концентрированная	Зеленовато-желтое

2		Кислота азотная концентрированная	Желтое исчезающее	
3		Реактив Марки	Сиреневато-фиолетовое	
4		Реактив Фреде	Зеленоватое исчезающее	
5		Реактив Манделина	Розовое фиолетовое	
6		Осадительные реакции	Реактив Драгендорфа	Аморфный осадок
7	Реактив Бушарда		Аморфный осадок	-
8	Реактив Зоннenschейна		Аморфный осадок	-
9	Реактив Майера		Аморфный осадок	-
10	Реактив медно-йодидный		Аморфный осадок	Легкий кристаллический осадок
11	Раствор ртути (II) хлорида		Аморфный осадок	Легкий кристаллический осадок
12	Реактив кислоты золотохлористоводородной		Аморфный осадок	Кристаллический

Тонкослойная хроматография (ТСХ). Пластинки для проведения хроматографии (см. раздел 3.2.1) предварительно активировали и высушивали в сушильном шкафу в течение 25 минут. Подвижную фазу приготавливали путем энергичного перемешивания компонентов растворителей в закупоренной склянке. На стартовую линию наносили 3 образца с использованием стеклянных капилляров: стандартный раствор кетотифена в хлороформе; хлороформный экстракт кетотифена из биоматериала; полученный в контрольном эксперименте хлороформный экстракт из биологического образца.

В качестве системы растворителей применялись: этилацетат-этанол-аммиак 25 % (34:4:2). Для обнаружения пятен использовался метод УФ-света при длине волны 254 нм, с последующим опрыскиванием реактивом

Драгендорфа модифицированному по Бергофф-Дельвичу. Хроматографическую камеру насыщали в течение 25 минут. Длина пробега растворителя составляла 10 см.

Значение Rf для кетотифена составило 0,7. После обработки пластинки реактивом Драгендорфа модифицированному по Бергофф-Дельвичу обнаруживалось желтовато- или красновато-оранжевые пятно кетотифена.

УФ-спектрофотометрия. После проведения хроматографии отдельную часть хроматограммы, соответствующую пятну исследуемого вещества, выделяли с помощью скальпеля. Кетотифен, элюированный сорбентом, экстрагировали трижды с использованием 10 мл хлороформа и исследовали его фотоабсорбцию в ультрафиолетовой области (190 до 1100 нм) при помощи спектрофотометра Agilent Cary 60 (США) и кювет с толщиной рабочего слоя 10 мм (1 см). После очистки хлороформного элюата через складчатый фильтр, полученный фильтрат концентрировали в выпарной чашке на водяной бане до получения сухого остатка. Полученные УФ-спектры кетотифена, выделенного из биологического материала, соответствовали УФ-спектрам стандартного хлороформного раствора кетотифена при длине волны 300нм. Для сравнения использовался элюат, полученный из сорбента в холостой пробе.

6.3 Оценка количества кетотифена, извлеченного из биосубстрата

Методика проведения УФ-спектрофотометрического анализа кетотифена. Далее была использована методика УФ-спектрофотометрического количественного определения кетотифена для исследования биологического материала. Проведено несколько серий опытов по определению содержания кетотифена в искусственной смеси с биологическим объектом (свежей печени). Каждая серия экспериментов включала контрольный опыт, где печень использовалась без добавления исследуемого вещества и хранилась в тех же условиях. Указанное количество хлороформных извлечений испаряли на водяной бане до того момента, пока не был полностью удален органический слой. Затем сухие остатки растворяли в 10 мл 0,1 моль/дм³ раствора хлористоводородной кислоты.

Результаты количественного определения кетотифена, изолированного из биосубстрата, представлены в таблице 12.

Таблица 12 - Результаты количественного определения кетотифена в модельной смеси (печень)

№	Метод изолирования	Выделено кетотифена, %	Метрологические характеристики
1	А.А. Васильева	42,04±2,74	$\bar{X}=42,04; S^2=1,38; S =2,3; S_{\bar{x}} = 1,34; \Delta \bar{X} = \pm 2,74; \varepsilon= 6,7; \bar{X} \pm \Delta \bar{X}=42,04 \pm 2,74$
2	В.Ф. Крамаренко	29,61±1,97	$\bar{X}=29,61; S^2=0,53; S =1,67; S_{\bar{x}} = 1,54; \Delta \bar{X} = \pm 1,97; \varepsilon= 2,67; \bar{X} \pm \Delta \bar{X}=29,61 \pm 1,97$
3	Стаса-Отто в модификации А.В. Удалова	22,24±2,89	$\bar{X}=22,24; S^2=0,78; S =2,13; S_{\bar{x}} = 1,04; \Delta \bar{X} = \pm 2,89; \varepsilon= 3,73; \bar{X} \pm \Delta \bar{X}=22,24 \pm 2,89$

Результаты оценки эффективности разработанных нами методов для количественного определения кетотифена, выделенного из биологического материала стандартными методами изоляции, показывают, что методика изолирования хлороформом при рН 11 методом А.А. Васильева, выделяет наибольший процент кетотифена при анализе методом УФ-спектрофотометрии (42,04±2,74).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одно из основных направлений в химико-токсикологическом анализе заключается в разработке методов изоляции, качественного и количественного анализа веществ с токсикологической значимостью.

В рамках проведенных исследований впервые были разработаны методы для качественного и количественного определения кетотифена, который имеет важное значение в токсикологии.

Химические методы идентификации предложены для первичного обнаружения кетотифена, однако из-за их низкой чувствительности результаты следует подтверждать физико-химическими методами исследования.

Для качественного анализа кетотифена, извлеченного из биологического материала, предложена методика хроматографии в тонком слое сорбента. Исследования показали удовлетворительные значения R_f для кетотифена при использовании системы растворителей: этилацетат-этанол-аммиак 25 % (34:4:2) на пластинках «Сорбфил», что обеспечивает наилучшее разделение пятен. Оптимальный способ детектирования кетотифена - облучение пластины УФ-светом (254 нм) с последующим опрыскиванием пластины реактивом Драгендорфа.

Для химико-токсикологического анализа разработаны методики обнаружения и количественного определения кетотифена с использованием УФ-спектрофотометрии.

Изучены степень экстракции кетотифена органическими растворителями, и определены оптимальные условия экстрагирования из водных растворов. Хлороформ оказался оптимальным экстрагентом с максимальным выходом кетотифена при рН 11 (99,86%).

Проведена сравнительная оценка методов выделения кетотифена из биологического материала, включая классические методы изолирования, такие как метод Стаса-Отто в модификации А.В. Удалова и методы, разработанные А.А. Васильевой и В.П. Крамаренко. Обнаружено, что эти методы позволяют выделить от $22,24 \pm 2,89$ до $42,04 \pm 2,74$ препарата из биоматериала, при этом методика изолирования хлороформом при рН 11 методом А.А. Васильева показал наилучший выход кетотифена ($42,04 \pm 2,74$).

ВЫВОДЫ

1. Разработаны чувствительные методики обнаружения кетотифена при помощи химических и физико-химических методов анализа:

а) Цветные и осадочные реакции могут быть использованы в качестве предварительных проб и должны быть подтверждены физико-химическими методами анализа;

б) при идентификации кетотифена методом ТСХ наилучшее разделение пятен кетотифена с оптимальным значением R_f наблюдали при использовании системы растворителей: этилацетат: этилацетат-этанол-аммиак 25 % (34:4:2) на пластинках «Сорбфил». Оптимальным способом детектирования кетотифена является облучение хроматографической пластинки в УФ-свете (254 нм), с последующим опрыскиванием реактивом Драгендорфа. Значение R_f для кетотифена составило 0,7.

в) при анализе кетотифена методом УФ-спектрофотометрии наиболее интенсивный максимум поглощения наблюдали при длине волны 300 нм в 0,1 М хлористоводородной кислоте.

2. Разработаны методики количественного определения кетотифена методом УФ-спектрофотометрии. Количество кетотифена рассчитывали при построении калибровочного графика в растворах различной концентрации (5 - 25 мкг/мл). Коэффициент корреляции равен 0,999982.

3. При изучении условий экстракции кетотифена из водных растворов органическими растворителями установлено, что для изолирования кетотифена наиболее оптимальным экстрагентом является хлороформ (99,86%). Наибольшее извлечение исследуемого вещества из водных растворов наблюдается в пределах рН среды - от 8 до 11 (96,55 - 99,86 %).

4. При проведении сравнительной оценки методов изолирования кетотифена из биоматериала установлено, что наибольший процент кетотифена выделяется методом изолирования хлороформом ($42,04 \pm 2,74$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

На основе полученных исследовательских выводов были опубликованы научные статьи, которые затрагивают методы качественного и количественного анализа кетотифена, выделенного из биологических материалов. В этих публикациях представлены не только практические аспекты определения кетотифена с использованием физико-химических методов, но и теоретические основы данного процесса.

Разработанные учебно-методические рекомендации внедрены в образовательный процесс НАО "Медицинский университет Астана» и КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова в рамках самостоятельной работы по дисциплине «Токсикологическая химия».

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Shin YH, Hwang J, Kwon R, Lee SW, Kim MS; GBD 2019 Allergic Disorders Collaborators; Shin JI, Yon DK. Global, regional, and national burden of allergic disorders and their risk factors in 204 countries and territories, from 1990 to 2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Allergy*. 2023 Aug;78(8):2232-2254. doi: 10.1111/all.15807. Epub 2023 Jul 11. PMID: 37431853; PMCID: PMC10529296.
2. Обзор розничного рынка противоаллергических препаратов и анализ предпочтений на рынке между антигистаминными препаратами I и II поколений за I квартал 2019 года. <https://pharmnewskz.com/ru/analytic/obzor-rozничnogo-rynka-protivoallergicheskikh-preparatov-i-analiz-predpochteniy-na-rynke-mezhdu-antigistaminnymi-preparatami-i-i-ii-pokoleniy-za-i-kvartal-2019-goda> 15329
3. Арзамасцев, А.П. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в анализе лекарственных препаратов / А.П.Арзамасцев, Д.Б.Никуличев, Д.М.Попов // *Химико-фармацевтический журнал*. - 1989. - Т. 23, № 4. - С.486 - 491.
4. Балаболкин, И.И. Стратегия лечения и профилактика бронхиальной астмы у детей / И.И.Балаболкин // *Педиатрия*. - 1998.-№4.-С. 92-96.
5. Балаболкин, И.И. Эффективность задитена при аллергических заболеваниях у детей / И.И.Балаболкин // *Врач*.-1996.-№ 6.-С. 13-14.
6. Задитен в лечении аллергических заболеваний у детей (обзор литературы) // И.И.Балаболкин, Н.В.Башилова, Б.В.Клюев, Ф.Ю.Мамедова // *Педиатрия*. - 1984. - №7. - С. 95-97.
7. Baba A, Tachi M, Ejima Y, Endo Y, Toyama H, Matsubara M, Saito K, Yamauchi M, Miura C, Kazama I. Anti-Allergic Drugs Tranilast and Ketotifen Dose-Dependently Exert Mast Cell-Stabilizing Properties. *Cell Physiol Biochem*. 2016;38(1):15-27. doi: 10.1159/000438605. Epub 2016 Jan 8. PMID: 26741745.
8. Schoch C. In vitro inhibition of human conjunctival mast-cell degranulation by ketotifen. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2003 Feb;19(1):75-81. doi: 10.1089/108076803762718132. PMID: 12648306.
9. Németh A, Magyar P, Herceg R, Huszti Z. Potassium-induced histamine release from mast cells and its inhibition by ketotifen. *Agents Actions*. 1987 Apr;20(3-4):149-52. doi: 10.1007/BF02074654. PMID: 2440257.
10. Nurmatov UB, Rhatigan E, Simons FE, Sheikh A. H1-antihistamines for primary mast cell activation syndromes: a systematic review. *Allergy*. 2015 Sep;70(9):1052-61. doi: 10.1111/all.12672. Epub 2015 Jul 6. PMID: 26095756.
11. Azuma H, Banno K, Yoshimura T. Pharmacological properties of N-(3',4'-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid (N-5'), a new anti-atopic agent. *Br J Pharmacol*. 1976 Dec;58(4):483-8. doi: 10.1111/j.1476-5381.1976.tb08614.x. PMID: 63304; PMCID: PMC1667496.

12. Ben-Eli H, Solomon A. Topical antihistamines, mast cell stabilizers, and dual-action agents in ocular allergy: current trends. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2018 Oct;18(5):411-416. doi: 10.1097/ACI.0000000000000473. PMID: 30020258.
13. Castillo M, Scott NW, Mustafa MZ, Mustafa MS, Azuara-Blanco A. Topical antihistamines and mast cell stabilisers for treating seasonal and perennial allergic conjunctivitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Jun 1;2015(6):CD009566. doi: 10.1002/14651858.CD009566.pub2. PMID: 26028608; PMCID: PMC10616535.
14. Sokol KC, Amar NK, Starkey J, Grant JA. Ketotifen in the management of chronic urticaria: resurrection of an old drug. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013 Dec;111(6):433-6. doi: 10.1016/j.anai.2013.10.003. Epub 2013 Oct 25. PMID: 24267353; PMCID: PMC4309375.
15. Kidd M, McKenzie SH, Steven I, Cooper C, Lanz R; Australian Ketotifen Study Group. Efficacy and safety of ketotifen eye drops in the treatment of seasonal allergic conjunctivitis. *Br J Ophthalmol*. 2003 Oct;87(10):1206-11. doi: 10.1136/bjo.87.10.1206. PMID: 14507747; PMCID: PMC1920791.
16. Simons FE, Luciuik GH, Becker AB, Gillespie CA. Ketotifen: a new drug for prophylaxis of asthma in children. *Ann Allergy*. 1982 Mar;48(3):145-50. PMID: 6121527.
17. Craps LP, Ney UM. Ketotifen: current views on its mechanism of action and their therapeutic implications. *Respiration*. 1984;45(4):411-21. doi: 10.1159/000194648. PMID: 6206536.
18. Katayose Y, Aritake S, Kitamura S, Enomoto M, Hida A, Takahashi K, Mishima K. Carryover effect on next-day sleepiness and psychomotor performance of nighttime administered antihistaminic drugs: a randomized controlled trial. *Hum Psychopharmacol*. 2012 Jul;27(4):428-36. doi: 10.1002/hup.2244. PMID: 22806823.
19. Балткэйс, Я.Я. Взаимодействие лекарственных веществ / Я.Я.Балткэйс, В.А.Фатеев. - М.: Медицина, 1991.-304 с.
20. MacDonald GF. An overview of ketotifen. *Chest*. 1982 Jul;82(1 Suppl):30S-32S. doi: 10.1378/chest.82.1.30s. PMID: 6806019.
21. Verdu, E., Blanc-Brisset, I., Meyer, G., Le Roux, G., Bruneau, C., & Deguigne, M. (2020). Second-generation antihistamines: a study of poisoning in children. *Clinical Toxicology*, 58(4), 275–283. <https://doi.org/10.1080/15563650.2019.1634812>
22. Passalacqua G, Bousquet J, Bachert C, et al. The clinical safety of H1-receptor antagonists: an EAACI position paper. *Allergy* 1996 Oct; 51 (10): 666-75
23. Woodward JK. Pharmacology of antihistamines. *J Allergy Clin Immunol* 1990 Oct; 86 (4 Pt 2): 606-12
24. Marone G. Milestones in the biology and pharmacology of H1- receptor antagonists. *Allergy* 1997; 52 (34 Suppl.): 7-13
25. Slater JW, Zechnich AD, Haxby DG. Second-generation antihistamines: a comparative review. *Drugs*. 1999 Jan;57(1):31-47. doi: 10.2165/00003495-199957010-00004. PMID: 9951950.

26. Index Nominum: International Drug Directory [computer program]. Windows version. Swiss Pharmaceutical Society :medpharm, Sci Pub 1994-1998. Englewood (CO): Micromedex
27. Ince M., Ruether P. Histamine and antihistamines. Intensive Care Med. 2021; 22 (11): 749–755.
28. Linton S., Hossenbaccus L., Ellis A.K. Evidence-based use of antihistamines for treatment of allergic conditions. Ann. Allergy Asthma Immunol. 2023; 131 (4): 412–420.
29. Randall K.L., Hawkins C.A. Antihistamines and allergy. Aust. Prescr. 2018; 41 (2): 41–45.
30. Передельская М.Ю., Ненашева Н.М. Обзор группы антигистаминных препаратов. Астма и аллергия. 2022; 1:21–23
31. Государственный реестр ЛС и МИ. Национальный центр экспертизы лекарственных средств и медицинских изделий. http://register.ndda.kz/category/search_prep
32. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия. Учебное пособие // Москва «МЕДпресс-информ» 2007.
33. Васильева, Н.Л. Смертельное отравление эстималом / Н.Л.Васильева, В.А.Карташов // Судебно-медицинская экспертиза.-1990.-№2.-С.55-56.
34. Карташов, В.А. Выбор экстрагента для изолирования из печени азотсодержащих органических оснований / В.А.Карташов, В.А.Кнауб // Судебно-медицинская экспертиза. - 1988. - № 3. - С. 40 -41.
35. Карташов, В.А. Извлечение азотсодержащих органических оснований из ткани печени / В.А.Карташов, В.А.Кнауб, Л.В.Чернова // Судебно-медицинская экспертиза. - 1988. - № 4. - С. 31 - 33.
36. Карташов, В.А. Изолирование азотсодержащих оснований из ткани печени на примере модельного вещества./ В.А.Карташов, В.А. Кнауб, Л.В.Чернова // Судебно-медицинская экспертиза. - 1988. -№ 1. - С. 33 -35.
37. Николаева, Э.Г. Изолирование амитриптилина из биологических жидкостей /Э.Г.Николаева // Судебно-медицинская экспертиза. - 1980. - № 4 . - С. 39 - 41 .
38. Николаева, Э.Г. Изолирование амитриптилина из трупного материала ацетонитрилом /Э.Г.Николаева // Судебно-медицинская экспертиза. - 1990. - № 1. - С. 39 - 40.
39. Вайнаукас, П.В. Оценка методов выделения некоторых противопаркинсонических препаратов из трупного материала / П.В.Вайнаукас // Судебно-медицинская экспертиза. - 1990. - № 1. -С. 40 -41.
40. Саломатин, Е.М. Судебно-химический анализ трупного материала на наличие лекарственных и наркотических соединений / Е.М.Саломатин, Э.Г.Николаева // Судебно-медицинская экспертиза - 1999.- №3. - С. 21-22.
41. Степанова, Е.Н. Сравнительная оценка методов изолирования эглонила из биологического материала / Е.Н.Степанова, М.С.Алявдина,

Л.П.Кирпичева // Матер. III Всерос. съезда судебных медиков. - Саратов, 1992. - С. 359 - 360.

42. Титова, А.В. Методы выделения токсических органических соединений из биологического материала, используемые в судебно-химическом анализе / А.В.Титова // Фармация. - 1989. - № 1. - С. 80 - 83.

43. Хомов, Ю.А. Исследования в области химико-токсикологического анализа азотсодержащих соединений основного характера: Автореф. дис. ... доктора фарм. наук / Ю.А.Хомов. - Пермь, 1996. - 50 с.

44. Николаева, Э.Г. Изолирование амитриптилина из трупного материала ацетонитрилом /Э.Г.Николаева // Судебно-медицинская экспертиза. - 1990. - № 1. - С. 39 - 40.

45. Саломатин, Е.М. Судебно-химический анализ трупного материала на наличие лекарственных и наркотических соединений / Е.М.Саломатин, Э.Г.Николаева // Судебно-медицинская экспертиза - 1999.- №3. - С. 21-22.

46. Еремин, С.К. Анализ наркотических средств / С.К.Еремин, Б.Н.Изотов, Н.В.Веселовская - М.: Мысль, 1993. - 272 с.

47. Изотов, Б.Н. Методология химико-токсикологического анализа органических ядов. Выделение и концентрирование. I. Жидкость жидкостная экстракция / Б.Н.Изотов, С.К.Еремин // Современные методы химико-токсикологического анализа.: Науч. тр. - М., 1986. - С. 7 - 39.

48. Мелентьев, А.Б. Моделирование извлечения лекарственных, наркотических веществ и их метаболитов из мочи с целью их скрининга при судебно-химическом анализе / А.Б.Мелентьев, Л.А.Долгова, А.С.Котенко // Судебно-медицинская экспертиза отравлений наркотическими веществами, психотропными средствами и алкоголем: Сб. науч. тр. - Казань, 2001. - С. 37-43.

49. Родовниченко, М.С. Обнаружение и количественное определение лидокаина и новокаинамида в биологических жидкостях // М.С.Родовниченко, Т.Х.Вергейчик, М.Г.Цыбулина, С.В.Клочков // Судебно-медицинская экспертиза . - 1998. - №1. - С. 24-27.

50. Badcock, N.R. The Liquid-liquid extraction in systematic toxicological analysis / N.R.Badcock, G.D.Zoanetti // Ann. Clin. Biochem. - 1996. - Vol. 33. - P. 75 - 77.

51. Traqui A. Sample preparations for HPLC screening / A. Traqui, P.Kintz, P.Mangin // J. Forensic Science. - 1994. - Vol. 50. - P. 254 -262.

52. Turcant, F. The Liquid-liquid extractions for HPLC screening methods / F.Turcant, M.Bogusz, V.Wu // J. Anal. Toxicol. - 1991. - Vol. 15 . - P. 188- 197.

53. Альберт, А. Константы ионизации кислот и оснований / А.Альберт, Е.Сергент - М.: Химия, 1964. - 179 с.

54. Выбор и построение факторных планов эксперимента при оптимизации анализа лекарственных и токсических веществ в биологических средах // В.З. Бродский, М.А. Векслер, Л.М. Власенко и др.// Фармация. - 1986. - № 6. - С. 41 - 48.

55. Изотов, Б.Н. Экстракция органических соединений в модельных системах ткань печени — водные растворы / Б.Н.Изотов, Э.Г.Николаева, И.А.Козлова // Судебно-медицинская экспертиза. - 1996. - №4. - С. 35-38.
56. Casas, M. Combination variety phases for extractions drugs / M.Casas, L.Berrueta, V.Gallo // J. Pharm. Biochem. Anal. - 1993. - Vol. 11.-P. 277-284.
57. Elliot, S.P. The extraction power the chloroform / S.P.Elliot, K.A.Hale // J. Anal. Toxicol. - 1998. - Vol. 22. - P. 279 - 289.
58. Онегова, Н.С. Фармацевтический и химико-токсикологический анализ лекарственных смесей, содержащих пропифеназон: Автореф. дис.канд. фарм. наук / Н.С.Онегова. - Пятигорск, 2002. - 24 с.
59. Ethyl acetate for the extractions of the drugs // D.Lo, T.Chao, S.Ng-Ong, Y.Yao // J. Forensic science. - 1997. - Vol. 90. - P. 205 - 214.
60. Ojanpera, J. The Liquid-liquid extractions of the Ethyl acetate for the drugs / J.Ojanpera, I.Rasanen, E.Vuori // J. Anal. Toxicol. - 1996. - Vol. 20. - P. 204 - 208.
61. Еремин, С.К. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в химико-токсикологическом анализе лекарственных соединений / С.К.Еремин, Б.Н.Изотов // Журнал аналитической химии. - 1988. - Т.XLIV. - С. 5-19.
62. Залесова, В.А. К обнаружению трамадола в моче методом тонкослойной хроматографии / В.А.Залесова, С.С.Катаев, Л.Н.Курдина // Вопросы наркологии. - 1998. - №2. - С. 53-56.
63. Методические указания по химико-токсикологическому анализу веществ, вызывающих одурманивание. - М.: МЗ СССР, - 1989. - 122 с.
64. Березенцева, О.М. Определение метадона методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии // О.М.Березенцева, Ю.А.Ключко, С.И.Никуличева и др.// Судебно-медицинская экспертиза. 1995. - № 4. - С. 24 - 26.
65. Веселовская, Н.В. Хроматографический анализ фенцеклидина, его метаболитов и аналогов в биологической жидкости / Н.В.Веселовская, С.А.Савчук, Б.Н.Изотов // Судебно-медицинская экспертиза. - 1999. - №2. - С. 20-25.
66. Комплексный химико-токсикологический анализ просидола // С.С.Катаев, Л.Н.Курдина, В.А.Залесова и др. // Судебно-медицинская экспертиза. - 2001. - №4. - С. 34-37.
67. Обнаружение трамадола и его метаболитов в моче хроматографическими методами // Н.В.Веселовская, Ю.В.Кислун, С.В.Еремин и др. // Судебно-медицинская экспертиза. - 1996. - №4. - С. 38-42.
68. Высокоэффективная тонкослойная хроматография. Пер. с англ. / Под ред. А.Златкиса, Р.Кайзера. - М., 1979. - 348 с.
69. Кирхнер, Ю. Тонкослойная хроматография / Ю.Кирхнер; Пер. с англ. - М.: Мир, 1981. - Т. 2. - 616 с.

70. Беляев, А.В. Исследование наркотических средств с предварительной пробоподготовкой методом твердофазной экстракции // А.В.Беляев, Т.В.Понкратов, В.И.Сорокин, Е.П.Семкин // Новые лекарственные препараты. - 2001. - №7. - С. 23-25.
71. Dawling, S. The use solid-phase extractions for analytical screening basic drugs / S. Dawling, N.Ward, E.Essex // Ann. Clin. Biochem. - 1990. - Vol. 27. - P. 472 - 477.
72. Крамаренко В.Ф. Токсикологическая химия. – М.: Просвящение,1995. 423 с.
73. Токсикологическая химия: учебник / Т. Байзолданов.- Алматы: Эверо, 2021, -240 с.
74. Машковский, М.Д. Лекарственные средства / М.Д.Машковский М: ООО «Издательство Новая Волна», 2000. -Т. 1. изд. 14. - С. 289.
75. Энциклопедия лекарств./Под ред. Ю.Ф.Крылова. - М.: изд. «РЛС - 2000». 2000. - изд. 7. - С. 426.
76. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post - mortem material. Second Edition./ Ed. A.C.Moffat. - London: The pharmaceutical prese. - 1986. - Vol. 1, 2. - 1173 p.
77. Grant SM, Goa KL, Fitton A, Sorkin EM (September 1990). "Ketotifen. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in asthma and allergic disorders". *Drugs*. 40 (3): 412–448. doi:10.2165/00003495-199040030-00006. PMID 2226222. S2CID 242916740.
78. Ono J, Toshida H (July 2022). "Use of Ketotifen Fumarate-Eluting Daily Disposable Soft Contact Lens in Management of Ocular Allergy: Literature Review and Report of Two Cases". *Cureus*. 14 (7): e27093. doi:10.7759/cureus.27093. PMC 9391663. PMID 36000122.
79. García-Martín E, Canto G, Agúndez JA (November 2013). "Metabolic considerations of drugs in the treatment of allergic diseases". *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 9 (11): 1437–52. doi:10.1517/17425255.2013.823400. PMID 23902458. S2CID 30634949.
80. "Acuvue Theravision with ketotifen". *DailyMed*. 11 March 2022. Archived from the original on 3 December 2023.
81. Zuberbier T, Asero R, Bindslev-Jensen C, Walter Canonica G, Church MK, Giménez-Arnau AM, et al. (October 2009). "EAACI/GA(2)LEN/EDF/WAO guideline: management of urticaria". *Allergy*. 64 (10): 1427–1443. doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02178.x. PMID 19772513. S2CID 14587946.
82. Li Z, Celestin J (23 February 2015). Ketotifen: A Role in the Treatment of Idiopathic Anaphylaxis. American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Annual Meeting. Houston.
83. Sokol KC, Amar NK, Starkey J, Grant JA (December 2013). "Ketotifen in the management of chronic urticaria: resurrection of an old drug". *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 111 (6): 433–436. doi:10.1016/j.anai.2013.10.003. PMC 4309375. PMID 24267353.

84. Shawky RM, Seifeldin NS (2015). "The relation between antihistamine medication during early pregnancy & birth defects". *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 16 (4): 287–90. doi:10.1016/j.ejmhg.2015.04.003.
85. Zuberbier T (January 2012). "A Summary of the New International EAACI/GA(2)LEN/EDF/WAO Guidelines in Urticaria". *The World Allergy Organization Journal*. 5 (Suppl 1): S1–S5. doi:10.1186/1939-4551-5-S1-S1. PMC 3488932. PMID 23282889.
86. El-Alali EA, Abukhiran IM, Alhmoud TZ (July 2021). "Successful use of montelukast in eosinophilic gastroenteritis: a case report and a literature review". *BMC Gastroenterology*. 21 (1): 279. doi:10.1186/s12876-021-01854-x. PMC 8265096. PMID 34238222.
87. Frieri M (June 2018). "Mast Cell Activation Syndrome". *Clin Rev Allergy Immunol*. 54 (3): 353–365. doi:10.1007/s12016-015-8487-6. PMID 25944644. S2CID 5723622.
88. Kakiuchi M, Ohashi T, Musoh K, Kawamura K, Morikawa K, Kato H (April 1997). "Studies on the novel antiallergic agent HSR-609: its penetration into the central nervous system in mice and guinea pigs and its selectivity for the histamine H1-receptor". *Japanese Journal of Pharmacology*. 73 (4): 291–298. doi:10.1254/jjp.73.291. PMID 9165365.
89. Ma C, Li H, Lu S, Li X, Wang S, Wang W (2023). "Tryptase and Exogenous Trypsin: Mechanisms and Ophthalmic Applications". *J Inflamm Res*. 16: 927–939. doi:10.2147/JIR.S402900. PMC 9987324. PMID 36891173.
90. Nelson WL (2008). "Antihistamines and Related Antiallergic and Antiulcer Agents". In Lemke TL, Williams DA (eds.). *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins. pp. 1019–. ISBN 978-0-7817-6879-5.
91. Ang DC, Hilligoss J, Stump T (September 2015). "Mast Cell Stabilizer (Ketotifen) in Fibromyalgia: Phase 1 Randomized Controlled Clinical Trial". *The Clinical Journal of Pain*. 31 (9): 836–842. doi:10.1097/AJP.000000000000169. PMC 4417653. PMID 25370135
92. Alagarsamy V (16 June 2012). "Antihistamines". *Textbook of Medicinal Chemistry Vol II - E-Book*. Elsevier Health Sciences. pp. 38–. ISBN 978-81-312-3259-0.
93. Drews J (6 December 2012). "Substances with an Antiallergic Effect". *Immunopharmacology: Principles and Perspectives*. Springer Science & Business Media. pp. 282–. ISBN 978-3-642-75561-3.
94. Muñoz-Cano RM, Casas-Saucedo R, Valero Santiago A, Bobolea I, Ribó P, Mullol J (August 2019). "Platelet-Activating Factor (PAF) in Allergic Rhinitis: Clinical and Therapeutic Implications". *J Clin Med*. 8 (9): 1338. doi:10.3390/jcm8091338. PMC 6780525. PMID 31470575.
95. Kahhak L, Roche A, Dubray C, Arnoux C, Benveniste J (May 1996). "Decrease of ciliary beat frequency by platelet activating factor: protective effect of ketotifen". *Inflamm Res*. 45 (5): 234–8. doi:10.1007/BF02259609. PMID 8737746.

96. Zhu TH, Zou G, Ding SJ, Li TT, Zhu LB, Wang JZ, et al. (2019). "Mast cell stabilizer ketotifen reduces hyperalgesia in a rodent model of surgically induced endometriosis". *J Pain Res.* 12: 1359–1369. doi:10.2147/JPR.S195909. PMC 6500880. PMID 31118754.
97. Luna-Gomes T, Bozza PT, Bandeira-Melo C (2013). "Eosinophil recruitment and activation: the role of lipid mediators". *Front Pharmacol.* 4: 27. doi:10.3389/fphar.2013.00027. PMC 3605515. PMID 23525348.
98. Castillo JG, Gamboa PM, García BE, Oehling A (1990). "Effect of ketotifen on phosphodiesterase activity from asthmatic individuals". *Allergologia et Immunopathologia.* 18 (4): 197–201. PMID 1702263.
99. Martín AP, Urrets-Zavalía J, Berra A, Mariani AL, Gallino N, Gomez Demel E, et al. (January 2003). "The effect of ketotifen on inflammatory markers in allergic conjunctivitis: an open, uncontrolled study". *BMC Ophthalmol.* 3: 2. doi:10.1186/1471-2415-3-2. PMC 140320. PMID 12515585.
100. Dou XY, Zhang W (2023). "Topical ketotifen treatment for allergic conjunctivitis: a systematic review and Meta-analysis". *Int J Ophthalmol.* 16 (2): 286–292. doi:10.18240/ijo.2023.02.17. PMC 9922628. PMID 36816214.
101. Stone M, Francisco JC, Kumar NN, Barboza J (1 January 2014). "Oral Mast Cell Stabilizers". *Encyclopedia of Medical Immunology.* pp. 551–555. doi:10.1007/978-1-4614-9194-1_242. ISBN 978-1-4614-9193-4.
102. Fahmy RH, Badr-Eldin SM (August 2014). "Novel delivery approach for ketotifen fumarate: dissofilms formulation using 3² experimental design: in vitro/in vivo evaluation". *Pharm Dev Technol.* 19 (5): 521–30. doi:10.3109/10837450.2013.800108. PMID 23713715. S2CID 45012360.
103. Li L, Liu R, Peng C, Chen X, Li J (July 2022). "Pharmacogenomics for the efficacy and side effects of antihistamines". *Exp Dermatol.* 31 (7): 993–1004. doi:10.1111/exd.14602. PMID 35538735.
104. Merk HF (November 2001). "Standard treatment: the role of antihistamines". *J Investig Dermatol Symp Proc.* 6 (2): 153–6. doi:10.1046/j.0022-202x.2001.00032.x. PMID 11764306.
105. El-Kommos ME, El-Gizawy SM, Atia NN, Hosny NM (2015). "Analysis for commonly prescribed non-sedating antihistamines". *Analytical Chemistry Research.* 3: 1–12. doi:10.1016/j.ancr.2014.11.003.
106. Jáuregui I, Mullol J, Bartra J, del Cuvillo A, Dávila I, Montoro J, et al. (2006). "H1 antihistamines: psychomotor performance and driving". *J Investig Allergol Clin Immunol.* 16 (Suppl 1): 37–44. PMID 17357376.
107. Lieberman P, Hernandez-Trujillo V, Lieberman J, Frew AJ (2008). "Antihistamines". *Clinical Immunology.* pp. 1317–1329. doi:10.1016/B978-0-323-04404-2.10089-2. ISBN 978-0-323-04404-2. Archived from the original on 24 February 2024. Retrieved 14 February 2024.
108. "Center for drug evaluation and research. Application no. 21-066" (PDF). Archived (PDF) from the original on 14 February 2024. Retrieved 14 February 2024.

109. Георгиевский, В.П. 50 лет тонкослойной хроматографии / В.П.Георгиевский, Ю.В.Шестенко // Фармация. - 1989. - № 3. - С. 86 - 87.
110. Дегтерев, Е.В. Применение тонкослойной хроматографии в анализе наркотических и сильнодействующих веществ (обзор). / Е.В.Дегтерев, А.В.Гаевский, Е.А.Зенкова // Хим.-фарм. журнал. - 1998. - № 8. - С. 48-54.
111. Карташов, В.А. Вариант ТСХ - скрининга ядовитых и сильнодействующих органических оснований / В.А.Карташов, В.М.Овсянникова, Л.Е.Кудрикова // Судебно-медицинская экспертиза. - 1982. - № 3. - С. 39 - 41.
112. Combined use of normal and reversed phase thin layer chromatography in the screening for basic and quaternary drugs // I.Ojanpera, J.Vartiovaara, A.Ruohonen, E.Vuori // J. Liquid Chromatogr. - 1991. - Vol. 14. - P. 1435 - 1446.
113. De Zeeuw, R. Potential and pitfalls of chromatographic techniques and detection modes in substance identification for systematic toxicological analysis / R.De Zeeuw, J.Hartstra, J.Franke // J. Chromatogr. - 1994. -Vol. 674. - P. 3 - 13.
114. Березенцева, О.М. Определение метадона методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии // О.М.Березенцева, Ю.А.Ключко, С.И.Никуличева и др.// Судебно-медицинская экспертиза. 1995. - № 4. - С. 24 - 26.
115. Аналитическая хроматография / К.И.Сакодынский, В.В.Бражников, С.А.Волков и др. - М.: Химия, 1993. - 464 с.
116. Байерман, К. Определение следовых количеств органических веществ / К. Байерман. - М.: Мир, 1987.-429 с
117. Жуков, О.И. Метод определения аминазина в биологическом материале с помощью ВЭЖХ / О.И.Жуков, В.В.Купчиков // Химико-фармацевтический журнал. - 1998. - №10. - С. 53-54.
118. Стыскин, Е.Л. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография / Е.Л.Стыскин, Л.Б.Ициксон, Е.В.Брауде. - М.: Химия, 1986. -288 с.
119. Кокорина, Н.О. Опыт применения высокоэффективной микроколоночной жидкостной хроматографии в химическом отделении СМЭ г. Новосибирска / Н.О.Кокорина, Г.Г.Шамовский // Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики. - 1999. - №4. - С. 138-143
120. Новые возможности высокоэффективной жидкостной хроматографии в анализе лекарственных средств // Г.И.Барам, Д.В.Рейхарт, Е.Д.Гольдберг и др. // Фарматека. - 2002. - №11. - С. 71-74
121. Boguzs, M. UF-detections in the HPLC screening / M. Boguzs, E.Erkens // J. Anal. Toxicol. - 1993. - Vol. 14. - P. 165 - 170.
122. Elsayed MM. Development and validation of a rapid HPLC method for the determination of ketotifen in pharmaceuticals. Drug Dev Ind Pharm. 2006 Apr;32(4):457-61. doi: 10.1080/03639040500529135. PMID: 16638684.

123. Leis, H. J., & Malle, E. (1991). Deuterium-labelling and quantitative measurement of ketotifen in human plasma by gas chromatography/ negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Biol. Mass. Spectrom.*, 20, 467–470.

124. Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 2. - Алматы: Издательский дом “Жибек жолы”, 2009. - 804 с. <https://labtorg.kz/downloads/Methods/Gosudarstvennaya-farmakopeya-Respubliki-Kazahstan-tom-II.pdf>

125. Новиков О. О., Жилякова Е. Т., Сабельникова Н. Н., Васильев Г. В., Полухина Т. С., Новикова М. Ю. Разработка методов контроля качества лоратадина // *Актуальные проблемы медицины*. 2010. №22 (93). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/razrabotka-metodov-kontrolya-kachestva-loratadina> (дата обращения: 17.04.2024).

126. Moffat A.C. Clarke`s analysis of drugs and Poisons. 4th Edition // Ed. By A.C. Moffat, M.D.Osselton and B.Widdop. London: Pharmaceutical Press, 2011; 1632.

127. М. Ф. Правдюк, Д. В. Хуриева. Возможности идентификации и анализа препаратов группы м-холинолитиков методом тонкослойной хроматографии. // *Актуальные проблемы фармацевтической науки и практики*. - 2014. - с.308-314.

128. Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 1. - Алматы: Издательский дом “Жибек жолы”, 2008. - 592 с. <https://labtorg.kz/downloads/Methods/Gosudarstvennaya-farmakopeya-Respubliki-Kazahstan-tom-I.pdf>

129. Хабриев Р.У., Калетина Н.И. Токсикологическая химия. Аналитическая токсикология: учебник / Под ред. Р.У. Хабриева, Н.И. Калетиной. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 752 с.: ил.

130. Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Угланова В.З., Кулакова Н.В. Тонкослойная хроматография. Теоретические основы и практическое применение // Учебное пособие, 2012. —128 с.

131. Климов А.В., Белобородов В.Л. Хроматография в биологии и медицине. - М.: Медицина, 1986.- 143 с.

132. Арыстанова Т.А. Фармацевтическая химия: Учебник. Том I/ Т.А Арыстанова. - Алматы, Эверо, 2020. - 640 с.

133. Байерман К. Определение следовых количеств лекарственных веществ. - М.: Мир, 1987. - 429 с.

134. Плетенева Т. В., Сыроешкин А. В., Максимова Т. В. Токсикологическая химия: учебник для вузов/ Под ред. Т.В. Плетеневой. –М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 512с.

135. Крамаренко В.Ф. Токсикологическая химия. – М.: Просвещение, 1995. 423 с.

136. Токсикологическая химия: учебник / Т. Байзолданов.- Алматы: Эверо, 2021, -240 с.

137. Жебентяев, А.И. Токсикологическая химия (в 2 частях). Ч.1: учебное пособие / А.И. Жебентяев. – Витебск: ВГМУ, 2014 – 402 с.

138. Говорова Е.Г., Хомов Ю.А., Кокшарова Н.В. Аналитическое изучение кетотифена с применением методов ВЭЖХ, ИК- и УФ-спектроскопии // Актуальные проблемы медицины и фармации. - Курск: КГМУ, 1999. - С. 289-291.

139. Вергейчик Т.Х. Токсикологическая химия: учебник /Под ред. Е.Н. Вергейчика. — М.: МЕД пресс-информ, 2009. – 400 с.

140. Коренман, И.М. Экстракция в анализе органических веществ / И.М.Коренман. М.: Химия, 1977. - 196 с.

141. Информационное письмо главного судебно-медицинского эксперта по количественному определению органических соединений, выделенных из внутренних органов человека методом Стаса-Отто. Васильевой А.А., Крамаренко В.Ф.-М., 1991. - 16с.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Наименование предложения для внедрения: Учебно-методические рекомендации «Разработка методик качественного и количественного определения кетотифена, выделенного из биоматериала».

Авторы: Мирзакир К.М., Шукирбекова А.Б., Хамметова А.Е.

Форма внедрения: в качестве самостоятельной работы студентов (СРС) по дисциплине «Токсикологическая химия».

Эффективность внедрения: Совершенствование знаний студентов по вопросам обнаружения и определения производных пиперидинилиденциклопентана, таких как кетотифен, имеют решающее значение для правильной диагностики случаев острого отравления. Разработанные методики обнаружения и определения кетотифена оптимизированы для обеспечения простоты и доступности. Они могут выполняться в различных лабораторных условиях с использованием стандартного оборудования и реагентов. Быстрая и надежная диагностика позволяет обеспечить своевременное и эффективное лечение.

Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрение: Внедрить методические рекомендации «Разработка методик качественного и количественного определения кетотифена, выделенного из биоматериала» в учебный процесс по дисциплине «Токсикологическая химия» для самостоятельной работы студентов фармацевтического факультета НАО «Медицинский университет Астана», г. Астана.


Ответственный за внедрение и исполнитель: Мирзакир К.М.

Сроки внедрения: 03.05.2024 г.

Зав.кафедры фармацевтических дисциплин
 НАО «Медицинский университет Астана»
 д.фарм.н., профессор


 Шукирбекова А.Б.
 НАО «Медицинский университет Астана»
 кафедра коллоидной химии
 д.фарм.н., профессор



	«С.Ж. АСФЕНДИЯРОВ АТЫНДАҒЫ ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ МЕДИЦИНА УНИВЕРСИТЕТІ» КЕАҚ НАО «КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ С.Д. АСФЕНДИЯРОВА»	
	Кафедра фармацевтической и токсикологической химии, фармакогнозии и ботаники	Акт внедрения

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Наименование предложения для внедрения: Учебно-методические рекомендации «Разработка методик качественного и количественного определения кетотифена, выделенного из биоматериала».

Авторы: Мирзакир К.М., Шукирбекова А.Б., Хамметова А.Е.

Форма внедрения: в качестве самостоятельной работы студентов (СРС) по дисциплине «Токсикологическая химия».

Эффективность внедрения: Совершенствование знаний студентов по вопросам, обнаружения и определения производных пиперидинилиденциклопентана, таких как кетотифен, имеют решающее значение для правильной диагностики случаев острого отравления. Разработанные методики обнаружения и определения кетотифена оптимизированы для обеспечения простоты и доступности. Они могут выполняться в различных лабораторных условиях с использованием стандартного оборудования и реагентов. Быстрая и надежная диагностика позволяет обеспечить своевременное и эффективное лечение.

Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрение: внедрить методические рекомендации «Разработка методик качественного и количественного определения кетотифена, выделенного из биоматериала» в учебный процесс по дисциплине «Токсикологическая химия» для самостоятельной работы студентов ОП «Фармация» Школы фармации КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова, г.Алматы.

Ответственный за внедрение и исполнитель: Мирзакир К.М.

Сроки внедрения: 13.05.2024г.

Рассмотрено и утверждено на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии, фармакогнозии и ботаники №9/2 от 13.05.2024г.

И.о. зав. кафедры фармацевтической
и токсикологической химии,
фармакогнозии и ботаники, к.х.н., доцент


 Ахелова А.Л.