

НАО «Медицинский университет Астана»

УДК: 615.07:615.212.7

МПК: G01N33/50, G01N30/86

Исенбаева Анара Муратхановна

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

7М10104 – ФАРМАЦИЯ

Диссертация
на соискание академической степени
магистра медицинских наук

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

Нур-Султан 2022

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ.....	4
ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	5
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	7
СПИСОК ТАБЛИЦ И РИСУНКОВ	8
ВВЕДЕНИЕ	10
1. КЛАССИФИКАЦИЯ И ОБЩАЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРАМАДОЛА (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)	15
1.1. Классификация и общая характеристика опиоидных анальгетиков	15
1.2. Фармакологическая характеристика трамадола.....	18
1.3 Немедицинское применение трамадола	19
1.4 Методы, используемые в химико-токсикологическом исследовании опиоидных анальгетиков	20
1.5 Методы изолирования из биоматериала опиоидных анальгетиков	23
2. ОБЪЕКТЫ И ПРИМЕНЯЕМЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	25
2.1 Объекты исследования	25
2.2 Методы исследования.....	26
2.2.1 Химические методы исследования	26
2.2.2 Хроматографические методы анализа	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 биообъектов	30
3. МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТРАМАДОЛА.....	32
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ).....	32
3.1 Химические методы обнаружения	32
3.1.1 Цветные реакции.....	32
3.1.2 Осадительные реакции	33
3.1.3 Реакции на функциональные группы.	34

3.2	Физико-химические методы, применяемые в качественном анализе	34
3.2.1	Метод тонкослойной хроматографии	34
3.2.2	Метод УФ- спектрофотометрии.....	37
4.	КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРАМАДОЛА.....	42
4.1	Метод УФ - спектрофотометрии.....	42
5.	ИССЛЕДОВАНИЕ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ ТРАМАДОЛА ИЗ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ.....	45
5.1	Экстракция трамадола из водных растворов органическими растворителями в зависимости от рН среды.	45
6.	ВЫДЕЛЕНИЕ ТРАМАДОЛА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА	47
6.1	Выделение трамадола из биоматериала с помощью классических методов изолирования	47
6.1.1	Выделение трамадола по методу Стаса-Отто	47
6.1.2	Выделение трамадола по методу А.А.Васильевой	48
6.1.3	Выделение трамадола по методу В.П.Крамаренко	48
6.2	Обнаружение трамадола в вытяжках из биологического материала	49
6.3	Количественное определение трамадола в вытяжках из биоматериала	51
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	53
	ВЫВОДЫ.....	54
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	55
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	56
	Приложение А	62
	Приложение Б.....	63

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» (с изменениями и дополнениями по состоянию на 03.05.2022 г.);
2. Закон Республики Казахстан от 10 февраля 2017 года №44-IV «О судебно-экспертной деятельности в Республике Казахстан» (с изменениями по состоянию на 01.07.2021).

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертационной работе применяются следующие термины с соответствующими определениями:

Высокоэффективная жидкостная хроматография - один из методов разделения сложных смесей веществ, основанный на разности распределения веществ между двумя не смешивающимися 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.

Опиоидные анальгетики - опиоидные препараты центрального действия, используют при сильном болевом синдроме, оказывают специфическое влияние на ЦНС. Фармакологические эффекты связаны с влиянием на опиоидные рецепторы ЦНС.

Опиоидные рецепторы (опиатные рецепторы) - разновидность рецепторов нервной системы, относящихся к рецепторам, сопряженным с G-белком. Различают основные группы опиоидных рецепторов: μ - (мю), δ - (дельта), κ - (каппа).

Они связываются как с эндогенными (вырабатываемые в организме), так и с экзогенными (поступающими извне) опиоидными лигандами.

Спектрофотометрия - физико-химический метод исследования растворов и твёрдых 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).

Грамадол - опиоидный синтетический анальгетик, обладающий центральным действием и действием на спинной мозг (способствует открытию K^+ и Ca^{2+} каналов, вызывает гиперполяризацию мембран и тормозит проведение болевых импульсов), усиливает действие седативных средств. Активирует опиоидные рецепторы (μ -, δ -, κ -).

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 - газо-жидкостная хроматография

ГФ - Государственная фармакопея

ГФ РК - Государственная фармакопея Республики Казахстан

ИК-спектр- инфракрасный спектр

ЛС- лекарственное средство

НД- нормативный документ

РСО – рабочий стандартный образец

СО – стандартный образец

ТСХ - тонкослойная хроматография

УФ - спектрофотометрия - спектрофотометрия в ультрафиолетовой области

УФ - спектр – ультрафиолетовый спектр

ФС- фармакопейная статья

ХТА- химико-токсикологический анализ

ЦНС- центральная нервная система

СПИСОК ТАБЛИЦ И РИСУНКОВ

Таблица 1	Типы опиоидных рецепторов и эффекты, связанные с активацией центральных и периферических опиоидных рецепторов	16
Таблица 2	Некоторые опиоидные анальгетики и их классификация	17
Таблица 3	Определение и пределы чувствительности цветных реакций трамадола с некоторыми реактивами.....	32
Таблица 4	Определение и пределы чувствительности осадительных реакций трамадола с некоторыми реактивами.....	33
Таблица 5	Значения Rf трамадола полученные при хроматографировании в различных системах растворителей	35
Таблица 6	Предел обнаружения и реактивы, применяемые для детектирования трамадола на хроматограммах.....	36
Таблица 7	Зависимость оптической плотности раствора трамадола от применяемых растворителей	38
Таблица 8	Спектральные характеристики трамадола в различных растворителях	41
Таблица 9	Расчет удельного и молярного показателей поглощения раствора трамадола в воде очищенной (среднее значение 5 измерений).....	42
Таблица 10	Результаты количественного определение раствора трамадола УФ-спектрофотометрическим методом в воде очищенной, рассчитанные с помощью калибровочного графика (среднее значение 5 измерений).....	44
Таблица 11	Результаты экстракции трамадола из водных растворов органическими растворителями	46
Таблица 12	Качественный анализ трамадола в вытяжках из биоматериала при помощи осадочных и цветных реакций	50
Таблица 13	Результаты изолирования трамадола из биоматериала методом УФ-спектрофотометрии и их метрологические характеристики (среднее значение 5 измерений).....	51

Рисунок 1	Детектирование трамадола	36
Рисунок 2	УФ-спектры раствора трамадола (375 мкг/мл)	38
Рисунок 3	УФ спектры раствора трамадола в воде очищенной	39
Рисунок 4	УФ спектры раствора трамадола в 0,1 М растворе HCL	39
Рисунок 5	УФ спектры раствора трамадола в щелочной среде (10 % раствор NaOH)	40
Рисунок 6	Калибровочный график определения раствора трамадола в воде очищенной	43

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Наряду с употреблением наркотических веществ, в последние годы имеются данные об возросшем злоупотреблении лекарственными средствами производных опиоидов приводящие к передозировке и летальным исходам. Так по данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) в большинстве стран мира от последствий злоупотребления анальгезирующими опиоидными лекарственными средствами умирает около полумиллиона человек. Более того, причиной приблизительно 30% смертей явилась передозировка опиоидными препаратами. Злоупотребление отпускаемыми по рецепту опиоидами в настоящее время является ведущей проблемой, приобретает угрожающие масштабы и становится острой социальной проблемой [1].

Следствием общедоступности аптечных сильнодействующих препаратов является их небольшая стоимость, возможность приобретения без рецепта и ограничения покупки нелегальных тяжелых наркотиков ввиду их дороговизны [2].

К числу таких препаратов относят трамадол несмотря на небольшой наркотический эффект при длительном применении, а также в количествах значительно превышающих терапевтические способен вызвать эйфорию и быстрое привыкание, зависимость и синдром отмены вследствие воздействия на ЦНС [2]. В литературе приводятся сведения о немедицинском употреблении у людей с наркотической зависимостью [3, 4].

Трамадол считается одним из наиболее широко известных и применяемых обезболивающих препаратов. Трамадол представляет собой синтетический опиоид средней анальгетической потенции и выступает в качестве агониста–антагониста опиатных рецепторов, что снижает риск возникновения зависимости и привыкания. Эффективность трамадола объясняется частичным сродством к рецептору мю-опиатов и его ингибированием обратного захвата норэпинефрина и серотонина, вследствие чего усиливаются психотропные действия. Достаточно широко применяется в терапии, хирургии и онкологии для купирования болевого синдрома [5, 6, 7].

Анализ результатов исследований, изложенные в доступной литературе свидетельствует о недостаточном изучении трамадола в химико-токсикологическом отношении.

Цель исследования: разработка методик качественного и количественного определения трамадола, выделенного из биологического материала, их валидация.

Объект:

1. Раствор для инъекций 5%, 2 м, трамадола гидрохлорид; производитель: Химфарм (Казахстан), Santo.

2. Модельная смесь, состоящая из препарата трамадол и трупной печени животного происхождения.

Задачи исследования:

1. Разработать чувствительные методики идентификации трамадола с помощью химических и физико – химических методов исследования.
2. Разработать методики количественного определения трамадола с помощью физико – химических методов исследования.
3. Изучить наиболее оптимальные условия изолирования трамадола.
4. Оценить пригодность, достоверность и провести валидацию разработанных методик качественного и количественного анализа трамадола, выделенного из биологического материала при помощи известных методов изолирования (А.А. Васильевой, В.П. Крамаренко, Стас-Отто).

Методы исследования:

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

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

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

Практическая значимость:

Разработанные учебно-методические рекомендации по предмету «Токсикологическая химия» в качестве самостоятельной работы студентов (СРС), фармацевтического факультета внедрены в учебный процесс НАО «Медицинский университет Астана» и КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова, г. Алматы.

База проведения исследования:

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Методики идентификации трамадола, пригодные для целей химико-токсикологического анализа.
2. Методики количественного определения трамадола, выделенного из биоматериала.
3. Оптимальные условия экстракции трамадола из водных растворов.
4. Оценка пригодности разработанных методик идентификации и количественного определения трамадола, выделенного из биоматериала с помощью общепринятых методов изолирования.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из перечня обозначений и сокращений, списка таблиц и рисунков, нормативных ссылок, введения, 6 глав, заключения, выводов, списка литературы, приложения. Работа изложена на 60 страницах машинописного текста, включает 13 таблиц, 6 рисунков и 2 страниц приложения. Список использованной литературы содержит 82 наименований, в том числе иностранной литературы.

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

В 1 разделе диссертационной работы изложен аналитический обзор отечественной и иностранной литературы, в котором рассмотрены классификация и общая характеристика опиоидных анальгетиков, фармакологическая характеристика трамадола, немедицинское применение трамадола, методы, применяемые в химико-токсикологическом исследовании опиоидных анальгетиков, а также методы изолирования из биоматериала опиоидных анальгетиков.

Во 2 разделе рассмотрены используемые объекты и методы применяемые для обработки информации и данных полученных в результате выполнения диссертационной работы. Описаны химические, хроматографические и спектрофотометрические методы исследования, а также методы изолирования органических веществ из объектов биологического происхождения.

В 3 разделе представлена экспериментальная часть работы, результаты собственных исследований, полученных в ходе проведения идентификации трамадола химическими методами (цветные и осадительные реакции, реакции на функциональные группы), физико-химическими методами (ТСХ, УФ-спектрофотометрия).

В 4 разделе приведены результаты экспериментальной части исследования, данные полученные в ходе проведения количественного анализа трамадола методом УФ-спектрофотометрии.

В 5 разделе представлены результаты изучения наиболее оптимальных условий экстракции трамадола из водных растворов органическими растворителями.

В 6 разделе диссертационной работы отражены результаты данных полученных при выделении трамадола из биологического материала при помощи общепринятых методов Стаса-Отто, А.А.Васильевой, В.П. Крамаренко.

В заключении сформулированы основные результаты проведенных исследований.

Апробация работы. Основные материалы работы доложены и опубликованы на:

- Публикация тезиса с устным докладом на тему: «Трамадол как объект химико-токсикологического анализа» в рамках международной научно-практической конференции «Современное состояние фармацевтической отрасли: проблемы и перспективы» 2020 год (Республика Узбекистан, г. Ташкент, Ташкентский фармацевтический институт).

- Публикация тезиса на международной научно-практической конференции «Современная фармация: новые подходы в образовании и актуальные исследования» 2021 год (г. Нур-Султан, НАО «Медицинский университет Астана»).

- Публикация тезиса с устным докладом на тему: «Идентификация трамадола, выделенного из биологического материала» в рамках международной научно-практической конференции «Современное состояние фармацевтической отрасли: проблемы и перспективы» 2021 год (Республика Узбекистан, г. Ташкент, Ташкентский фармацевтический институт).

- Публикация тезиса «Обнаружение трамадола, выделенного из биоматериала» в материалах международной научно-практической конференции «Современные тенденции развития фармацевтической науки и образования» 2021 год (Республика Казахстан, г. Шымкент, Южно-Казахстанская медицинская академия)

- Публикация экспериментальной статьи по теме «Качественный анализ трамадола, выделенного из биоматериала с помощью химических методов» на международной научно-практической конференции «Современная фармация: новые подходы в образовании и актуальные исследования», в рамках «Университетских дней» КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова, приуроченных к 30 - летию Независимости Республики Казахстан, 70 - летию Школы Фармации, 25 летию Ассоциации поддержки и развития фармацевтической деятельности Республики Казахстан

- Участвовала и выступила с устным докладом на международном научно-практическом семинаре «Актуальные вопросы судебно-химической экспертизы острых отравлений» 2022 год (Республика Узбекистан, г. Ташкент, Ташкентский фармацевтический институт).

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

1.1. Классификация и общая характеристика опиоидных анальгетиков

Термин «опиоид» является общим термином для встречающихся в природе, полусинтетических и синтетических наркотиков, которые в сочетании с опиоидными рецепторами производят физиологические эффекты и которые стереоспецифично противостоят налоксону. Для клинических целей опиоиды могут быть классифицированы в соответствии с их рецепторными взаимодействиями (агонист, частичный агонист, агонист-антагонист и антагонист), интенсивностью боли, для которой они обычно используются (умеренные или тяжелые), и их периодом полувыведения (короткий или длительный). Подробно описаны чистые агонисты, традиционно используемые для умеренной боли, чистые агонисты с коротким и длительным периодом полураспада, традиционно используемые для сильной боли, смешанные агонисты-антагонисты и опиоиды с частичным агонистом [8].

На сегодняшний день опиоидные анальгетики представляются нежелательными препаратами. Они являются очень неудобными в применении как в стационарах, так и в амбулатории из-за крайне тяжелых и неоднозначных правил их учета и контроля, а также характерных им побочных эффектов, боязни вызвать лекарственную зависимость, наркоманию пациентов и т. д. Очевидно, что пока без опиоидных анальгетиков никак не обойтись. На протяжении довольно длительного времени опиоиды остаются основными лекарственными препаратами при лечении сильных болевых синдромов [9].

Морфин, прототип опиоидного агониста, давно известен как препарат, который с замечательной эффективностью способен снять сильную боль. Морфин рекомендован Всемирной организацией здравоохранения в качестве средства выбора при умеренной и сильной боли при раке. Морфин оказывает свое действие через опиоидные рецепторы (μ , δ и κ), локализованные в головном мозге [10].

Помимо сильного обезболивающего действия, морфин вызывает ряд побочных эффектов, в том числе привыкание, толерантность, угнетение дыхания, иммуносупрессию и запор. Седативный эффект и запор являются обычными эффектами, но тошнота и угнетение дыхания возникают нечасто и временно, при условии, что препараты назначают правильно. Отсутствие столь же сильных болеутоляющих средств является причиной того, что, несмотря на упомянутые выше недостатки, морфин по-прежнему является наиболее часто используемым анальгетиком для купирования сильной боли, в том числе онкологической [11].

Опийный мак – это источник сырого опиума. После разреза маковое семя выделяет белое вещество, которое превращается в коричневую смолу, сырой опиум. Опий содержит множество алкалоидов, главный из которых морфин, присутствует в концентрации около 10%. Он остается стандартом, по отношению к

которому сравнивают все препараты, имеющие сильное обезболивающее действие. Эти препараты в совокупности известны как опиоидные анальгетики и включают не только естественные и полусинтетические производные алкалоидов опия, а также синтетические суррогаты, другие опиоидоподобные препараты. При часто повторяющихся терапевтических дозах морфина или его заменителей происходит постепенная потеря эффективности, эта потеря эффективности обозначается как толерантность. Чтобы воспроизвести первоначальный ответ, необходимо ввести большую дозу. Наряду с толерантностью развивается физическая зависимость. Физическая зависимость определяется как характерная абстиненция или абстинентный синдром при прекращении приема препарата [12].

Опиоиды оказывают свое действие преимущественно связываясь со специфическими мембранными рецепторами. Существует три основных класса опиоидных рецепторов (μ , κ , δ), располагающиеся в разных структурах центральной нервной системы (ЦНС), которые участвуют в передаче, модуляции и ощущении боли [13]. На молекулярном уровне опиоидные рецепторы образуют семейство белков, которые соединяются с G-белками и посредством этого взаимодействия влияют на открытие ионных каналов, модулируют внутриклеточный Ca^{2+} и изменяют фосфорилирование белков [13,14].

Опиоидные рецепторы расположены на поверхности клеток иммунной системы, в различных органах, суставах и в периферических тканях. Задействование опиоидных рецепторов генерирует ряд внутриклеточных сигналов, включая ингибирование аденилатциклазы, уменьшение открытия кальциевых каналов, увеличение токов калия и активацию протеинкиназы C. Главным эффектом этих путей является уменьшение возбудимости клеток и нейротрансмиссии. Природными лигандами опиоидных рецепторов являются так называемые эндогенные опиоидные пептиды: энкефалины, эндорфины и эндоморфины [15].

Таблица 1 - Типы опиоидных рецепторов и эффекты, связанные с активацией центральных и периферических опиоидных рецепторов

Тип рецептора	Эффекты
μ (μ ю)	супраспинальная и спинальная анальгезия; седативный эффект; угнетение дыхания; эйфория; более медленный желудочно-кишечный транзит; модуляция высвобождения гормонов и нейромедиаторов, брадикардия.

Продолжение таблицы 1

δ (дельта)	супраспинальная и спинальная анальгезия; угнетение дыхания; модуляция гормонов и высвобождение нейромедиаторов.
κ (каппа)	супраспинальная и спинальная анальгезия; седативный эффект; дисфория; психотомиметические эффекты; замедленный желудочно-кишечный транзит.

Действие опиоидов на μ -, δ -, κ - рецепторы может быть разным. Некоторые препараты оказывают стимулирующее, другие же блокирующее на данные рецепторы. Также есть группа веществ, которые одновременно оказывают оба эффекта на одинаковые рецепторы. Такие опиоиды называют агонистами/антагонистами [8, 15].

Таблица 2 - Некоторые опиоидные анальгетики и их классификация

Полные агонисты опиоидных рецепторов	Преимущественные мю-агонисты	Частичные агонисты мю-рецепторов и антагонисты каппа-рецепторов	Агонисты каппа-рецепторов и антагонисты мю-рецепторов
Налоксон	Морфин	Бупренорфин	Пентазоцин
Налтрексон	Кодеин	Мептазинол	Налбуфин
Налмефин	Фентанил		Буторфанол
Дипренорфин	Суфентанил Метадон		Дезоцин
	Трамадол		
	Гидрокодон		
	Гидроморфон		

1.2. Фармакологическая характеристика трамадола

Трамадола гидрохлорид (трамадол), представляет собой (1RS; 2RS)-2-(диметиламинометил)-1-(3-метоксифенил)-циклогексанол-гидрохлорид, анальгетик центрального действия, состоит из двух энантиомеров, оба проявляют анальгезирующее действие с помощью различных механизмов. (+)-Трамадол и метаболит (+) о- десметилтрамадол являются агонистами μ -опиоидного рецептора. (+)-трамадол ингибирует обратный захват серотонина и (-) -трамадол ингибирует обратный захват норадреналина, усиливая ингибирующее действие на передачу боли в спинном мозге. Трамадол оказывает анальгезирующее действие с помощью мультимодального механизма, взаимодополняющие и синергические действия двух энантиомеров улучшают анальгетическую эффективность [16, 17].

Метаболизм. Трамадол интенсивно метаболизируется в печени цитохромом P450 2D6 (CYP2D6) [18]. Подвергается биотрансформации с образованием N и O-деметилированных соединений (реакции 1 фазы), о-деметилированные метаболиты дополнительно конъюгируются с глюкуронидами и сульфатами (реакции 2 фазы). N-деметилированные соединения образуются только в незначительных количествах [19]. Основными метаболитами являются о-десметилтрамадол и его конъюгаты, о-десметилтрамадол является фармакологически активным и по большей части отвечает за обезболивающую эффективность трамадола [20].

На казахстанском рынке препарат представлен фармацевтическими предприятиями Химфарм (Казахстан), G.L.Pharma GmbH (Австрия), Protech Biopharma Pvt. Ltd. (Индия), Фармак (Украина).

Трамадол выпускается в виде растворов для инъекций, капель, капсул и препаратов с замедленным высвобождением, а также суппозиторий для ректального применения.

Показания к применению. Болевой синдром различной этиологии: послеоперационный период, инфаркт миокарда, при онкологических заболеваниях, невралгиях, различных травмах, а также проведение болезненных диагностических или терапевтических процедур. На сегодняшний день трамадол очень хорошо используется при лечении умеренной и тяжелой, острой и хронической боли у различных групп пациентов, от младенцев (> 1 года) до пожилых людей [21].

Длительность лечения определяется индивидуально лечащим врачом. Максимальная доза применения взрослым и детям старше 14 лет независимо от способа введения составляет 400 мг в сутки. Его высокая распространенность и большое потребление обусловлены относительно высоким соотношением пользы и риска, благоприятными фармакокинетическими свойствами [17].

Фармакологическое действие. После внутривенного (1 мг/ кг), внутримышечного, ректального или перорального введения 100 мг трамадола препарат эффективен для облегчения боли в течение примерно 4-6 часов [15]. Анальгезирующий эффект проявляется в течение 30 минут и пиковые эффекты наблюдаются после 1 до 2 часов [22].

Трамадол в основном выводится почками. При пероральном употреблении трамадола примерно 90% выводится с мочой и 10% - с калом. 25-32% пероральной дозы трамадола выводится из организма в неизменном виде. Период полувыведения составляет около 5-6 часов [17].

Побочные эффекты и основные проявления передозировки. Наиболее распространёнными нежелательными явлениями трамадола являются тошнота, головокружение, сонливость, усталость, потливость, рвота и сухость во рту [23]. Хорошо известно, что опиоидные анальгетики вызывают угнетение дыхания. Трамадол обладает меньшим потенциалом угнетения дыхания, вызывает лишь слабое и клинически не значимое в рекомендуемых дозировках, чем другие опиоиды, такие как морфин и оксикодон [24]. Менее частые побочные эффекты головная боль, постуральная гипотензия и проблемы с пищеварением. При этом частота тошноты и рвоты значительно выше при парентеральном (внутривенном или внутримышечном) введении, чем при пероральном употреблении [25]. Часто встречающимися симптомами передозировки трамадола являются вялость, тошнота, тахикардия, возбуждение, эпилептические судороги, кома, гипертония и угнетение дыхания (вплоть до остановки). Усиливает действие средств, оказывающих угнетающее влияние на ЦНС, и этанола [26]. Судороги можно контролировать внутривенным введением бензодиазепинов [27]. Лечение селективным опиоидным антагонистом налоксоном устраняет седативный эффект и апноэ. В этих ситуациях введение антидотов приводит к быстрому исчезновению признаков токсичности [28].

1.3 Немедицинское применение трамадола

На ранних стадиях изучения трамадол относили к наркотическим препаратам. Последующие исследования и опыт применения в клинической практике показали, что препарат не проявляет морфиноподобный эффект, также имеет низкую наркотическую активность и не может служить заменой морфина при наркомании для лиц с опиатной зависимостью. И по принятой на сегодняшний день классификации трамадол не является наркотиком и отнесен к сильнодействующим средствам [29]. Однако, несмотря на небольшой наркотический эффект, при длительном применении препарат способен вызывать множество побочных эффектов, привыкание, зависимость и синдром отмены [30, 31].

Проведённый анализ показал, что возможный токсический эффект трамадола был рассмотрен с точки зрения его обезболивающих механизмов, побочных эффектов, зависимости и злоупотребления [32].

Его широкое применение в медицине в качестве анестетика, токсический эффект при передозировках и смертельные случаи придают определенное токсикологическое значение [33, 34, 35].

Имеются сведения о немедицинском применении трамадола у людей с опиоидной зависимостью [3, 4].

Также в литературе описаны случаи попыток покончить жизнь самоубийством. Результаты показали, что пероральный прием трамадола был самым распространенным путем интоксикации. Это потому что пероральные лекарственные формы являются наиболее доступными лекарственными формами трамадола в аптеках. К счастью, смертность и частота передозировок только трамадолом является низкой. Доза трамадола у не выживших пациентов составляла от 5000 до 8200 мг. Причиной смерти при отравлении трамадолом являлась сердечно-легочная остановка [36].

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) уделяет большое значение для злоупотребления и зависимости от трамадола, было сделано четыре оценки. С 1992 по 2006 год зависимость четырежды оценивалась Экспертным комитетом по лекарственной зависимости (ECDD). Трамадол обычно считается более-менее безопасным и имеет небольшой потенциал для злоупотребления. Несмотря на ряд исследований, до сих пор нет единого мнения о возможной зависимости трамадолом. Было высказано предположение, что возможность злоупотребления трамадолом может быть больше, чем до сих пор предполагается [37].

1.4 Методы, используемые в химико-токсикологическом исследовании опиоидных анальгетиков

Применяемые в ХТА методы идентификации и количественного определения опиоидных анальгетиков, приведены в нормативных документах (ФС, НД), и в некоторых литературных источниках, в которых описаны методы исследования опиоидных анальгетиков для целей ХТА. В литературных источниках имеется недостаточное количество информации качественного и количественного анализа трамадола, поэтому нами учитывались имеющиеся в литературе данные об идентификации и количественном определении опиоидных анальгетиков, которые продолжительное время имели токсикологическое значение: морфин, кодеин.

Спектральные методы

В литературе [38] для идентификации морфина применяют метод ИК-спектрофотометрии. Авторами используется метод приготовления дисков, в данном методе образец диспергируется в KBr или KCl и прессуется в тонкий диск. Приготовление некачественных дисков может привести к небольшим сдвигам линий поглощения, и по амплитуде, и по длине волны. ИК спектр морфина, полученный с помощью дисков из бромида калия с использованием 1 мг образца приблизительно в 200 мг KBr, имеет следующие полосы поглощения: 802, 1244, 1445, 1117, 941, 1468, 759, 1086.

Авторами [39] предложен метод определения трамадола УФ-спектрофотометрией. УФ-система состояла из ПК Shimadzu UV-3101, модель сканирующего спектрофотометра UV-Vis-NIR. Исходные растворы трамадола для УФ-определения готовили с концентрацией 200 мкг/мл в метаноле и воде. Рабочие стандартные растворы готовили путем разбавления исходных растворов в

диапазоне концентраций от 10 до 100 мкг/мл для обоих растворителей. Пять различных концентраций трамадола выбранные для калибровочной кривой, составляли 10, 35, 65, 85 и 100 мкг/мл. Стандартные растворы готовили путем разбавления исходного раствора до постоянного объема метанолом и воды. УФ-спектры регистрировали и для метанола, и для воды. Спектры поглощения трамадола методом УФ-спектрофотометрии для метанола соответствовал 275 нм, а для воды при 271 нм, измерение проводилось в диапазоне длин волн 200–400 нм.

Тонкослойная хроматография

В литературе [40] для исследования морфина и кодеина применяется метод тонкослойной хроматографии. В работе авторами предложены условия хроматографического анализа: пластинки «Сорбфил ПТСХ-П-А», хроматографическая система 1) – этилацетат - этанол - аммиак (17:2:1), 2) – толуол – ацетон – этанол - аммиак (45:45:7:3); объем наносимой пробы – 100 мкл; для детектирования рекомендована обработка растворами, при которой отмечаются выявленные зоны гашения люминесценции - реактивы Драгендорфа и Марки. При исследовании растворов стандартных образцов морфина и кодеина в диапазоне концентраций 10,0-250,0 мкг/мл проводили по 10 параллельных определений. После окончания хроматографирования, пластины высушивали, затем детектировали хроматограммы с помощью реактива Марки – предел обнаружения составляет 5,0 мкг, а при обработке реактивом Драгендорфа составляет 10,0 мкг.

В работе [41] для целей химико-токсикологического анализа трамадола в моче методом ТСХ, в качестве стандарта использовали водный раствор трамадола гидрохлорида с концентрацией 2 мг/мл. Обнаружение трамадола проводили на пластинах "Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ" и пластинах со слоем силикагеля КСК в 4 системах растворителей: I — толуол-ацетон-этанол-аммиак (45:45:7,5:2,5); II — этилацетат-метанол-аммиак (34:4:2); III — хлороформ-этилацетат-аммиак (60:40:1); IV — этилацетат-гексан-аммиак (50:15:2). Для детектирования применяли: реактив Драгендорфа (в модификации Молдавера), растворы меди сульфата и калия йодида, реактив Фреде, реактив Марки, 1% раствор нингидрина в концентрированной серной кислоте. В качестве подтверждающей реакции авторами предложена реакция трамадола с 1% раствором нингидрина в концентрированной серной кислоте, по окончанию реакции можно наблюдать розово-вишневое окрашивание, затем при добавлении нескольких капель воды окраска становится оранжевой.

Газожидкостная хроматография

Сложность выполнения анализа кодеина и морфина методом ГХ заключается, в том, что необходимо обязательное проведение дериватизации, то есть получение менее полярных производных, которые будут обладать большей летучестью. В литературе [42] авторами проводилось определение морфина и кодеина методом ГХ/МС. Для проведения исследования использовали трупную кровь, готовили стандартные образцы, метанольные растворы морфина и кодеина с концентрацией

1,0 мг/мл. Далее осуществляли дериватизацию и пробоподготовку. Исследование методом ГХ/МС проводили на газовом хроматографе Agilent Technologies 6890 с масс-селективным детектором Agilent Technologies 5973N с использованием кварцевой капиллярной колонки HP5-MS (5% фенил-диметилсилоксан).

В работе [43] для обнаружения метаболитов трамадола в моче авторами была разработана методика скрининга анализа мочи методом ГХ/МСД. Перед проведением анализа осуществляли дериватизацию при помощи уксусного ангидрида. Готовили стандартные растворы и проводили газохроматографический анализ на приборе фирмы Hewlett Packard HP-5890 серии II с масс селективным детектором HP-5972.

В руководстве для национальных лабораторий экспертизы наркотиков разработанном Организацией Объединенных Наций (ООН) [38] говорится, что на сегодняшний день ГХ с капиллярными колонками малого диаметра является самой распространённой, она в свою очередь ближе к уровню микрокапиллярных систем ГХ, по сравнению с наполненными колонками, а также превосходит их по простоте использования. Благодаря имеющимся достоинствам с их помощью можно напрямую определять, как макро-, так и микрокомпоненты образцов опия и морфина без предварительной экстракции.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

В литературе [44] авторы поставили перед собой задачу определить морфин и кодеин в биологических тканях с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Хроматографирование методом ВЭЖХ проводили на обращенно-фазовых сорбентах C-18, в качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил и муравьиную кислоту. При проведении пробоподготовки для получения чистых извлечений применяли двойную очистку: амиловым спиртом и диэтиловым эфиром. Перед началом проведения хроматографированием применяли экстракцию, что также значительно снизило число сопутствующих веществ. В результате проведенных операций авторам удалось понизить предел детектирования морфина и кодеина в биоматериале до терапевтических концентраций, повысить идентификацию веществ и получить воспроизводимые результаты. Концентрацию морфина и кодеина в биологическом материале рассчитывали с использованием калибровочного графика, методом внутреннего стандарта в качестве стандартных растворов применяли морфин, кодеин, а в качестве внутреннего стандарта – налтрексон.

В работе [45] для целей химико-токсикологического анализа методом ВЭЖХ анализа хроматографировали растворы стандартных образцов нефопама, трамадола, парацетамола и морфина при длинах волн 230, 246, 244, 262, 272 и 326 нм. На основании полученных данных выбраны следующие условия: хроматографическая колонка размером 2 × 75 мм, заполненная обращенно-фазовым сорбентом. Подвижная фаза: раствор кислоты трифторуксусной, ацетонитрил, скорость потока — 100 мкл/мин.; аналитические длины волн — 230, 244, 262, 272 и

285 нм; время измерения — 0,18 сек.; температура термостата колонки — комнатная; общее время хроматографирования — 25 минут; объем пробы — 10 мкл. Расчеты количественного содержания изучаемых ЛВ проводили по величинам площадей пиков растворов стандартных образцов при соответствующих длинах волн. Идентификация нефопама, трамадола, парацетамола и морфина проводилась по времени удерживания в найденных оптимальных условиях хроматографирования. При хроматографировании в указанных условиях смеси растворов нефопама, трамадола, парацетамола и морфина обнаружено 4 пика, соответствующих по времени удерживания пикам их стандартных образцов.

1.5 Методы изолирования из биоматериала опиоидных анальгетиков

Для извлечения морфина и кодеина из внутренних органов и биологических жидкостей используют общепринятые методы изолирования, применяемые в химико-токсикологической практике: Стаса-Отто, Васильевой А.А. и Крамаренко В.Ф.

Изолирование морфина из биоматериала производится подкисленным спиртом или подкисленной водой, в обоих случаях это приводит к потерям морфина, достигающим 97—98,5% при извлечении хлороформом. Таким образом, классическими методами изолирования морфин выделяется в количестве 1-2%. Из водных растворов морфин лучше всего экстрагируется изоамиловым спиртом, приблизительно 73—76% при рН 8,5— 9,5; хлороформом при рН 8,6—10,2 экстрагируется 28—30% морфина [38].

Для изолирования морфина из внутренних органов и биологических жидкостей в работе [46] была разработана методика. Авторы описывают трудности выделения морфина при проведении химико-токсикологического анализа на неизвестные наркотические и психотропные вещества, тем самым они поставили перед собой задачу разработать методику, позволяющую определить морфин вместе с другими веществами в одной навеске трупного материала. Согласно данной методике биологический материал смешивали с безводным сульфатом натрия и экстрагировали 95-96° этиловым спиртом 3 раза в течение часа каждый раз. Полученный спиртовой вытяжки подкисляли хлороводородной кислотой до рН 3 и упаривали при температуре 40° градусов. Остатки обрабатывали 0,1 н раствором хлороводородной кислоты. Очистку полученных жидкостей проводили гексаном. Вещества кислого характера экстрагировали эфиром при рН 1-2, а вещества основного характера - хлороформом после добавления аммиака до рН 10. Выделенный из биоматериала морфин идентифицировали методом ГЖХ, ТСХ, реакциями окрашивания.

В работе [47] подготовку пробы образцов мочи проводили по методике, адаптированной к условиям флуориметрического детектирования кодеина. Экстракцию проводили смесью хлороформ - изопропанол (9: 1), затем добавляли

10%-ный раствор аммиака до pH 8,5, экстрагировали дважды диэтиловым эфиром. Полученный экстракт отделяли, фильтровали через безводный сульфат натрия.

В литературе [48] приводится изолирование опиатов из мочи методом твердофазной экстракцией, для опиатов используется преимущественно химически модифицированные сорбенты - микроколоники «картриджи»: Bond Elut Certify, Clean Screen DAU, Isolute HСХ.

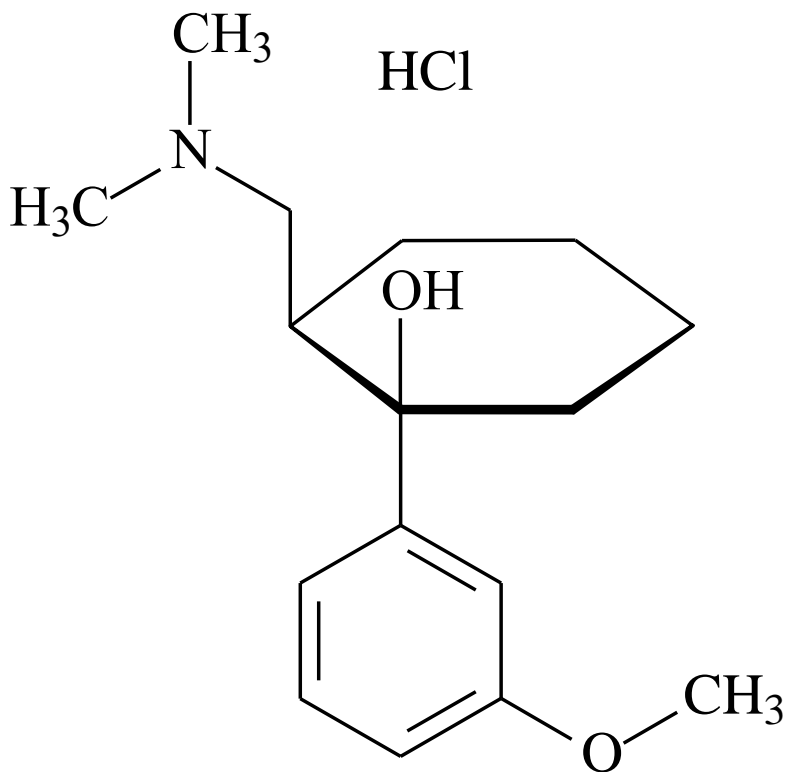
Проделанный поиск литературы показал, что большинство публикаций в отношении химико-токсикологических исследований опиоидных анальгетиков, посвящены анализу в биообъектах морфину и кодеину. В изученной нами литературе присутствует незначительное количество информации о методиках изолирования, идентификации и количественного определения трамадола в биоматериале.

В связи с этим, разработка методик изолирования, идентификации и количественного определения трамадола в биоматериале с применением современных высокочувствительных методов делает данное исследование актуальным.

2. ОБЪЕКТЫ И ПРИМЕНЯЕМЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной главе описаны объекты исследования, а также примененные в работе теоретические основы методов анализа.

2.1 Объекты исследования



rel-(1*R*,2*R*)-2-[(Диметиламино)метил]-1-(3-метоксифенил) циклогексан-1-ола гидрохлорид

Белый или почти белый кристаллический порошок, легко растворим в воде, умеренно растворим в изопропанол, очень мало растворим в ацетоне. Молекулярная масса - 299,84. Температура плавления 171–172 °С.

В качестве стандартного образца нами был использован трамадола гидрохлорид, выделенный из раствора для инъекций 5%, 2 мл (1 мл препарата содержит активное вещество - трамадола гидрохлорид (в пересчете на 100 % вещество) 50.0 мг, производитель Химфарм (Казахстан).

Печень. Перед проведением качественного и количественного анализа трамадола выделенного из биоматериала, нам было необходимо провести анализ чистого препарата. Для выполнения анализа использовали печень животного происхождения.

Печень – самая крупная железа и второй по величине орган в организме человека (уступает только коже). Защита организма от интоксикаций одна из основных функций печени. Печень играет решающую роль в определении токсичности лекарств из-за ее ключевой роли в метаболизме, транспорте и клиренсе чужеродных веществ [49]. Тем самым ввиду вышеперечисленных функций печени, они обуславливают присутствие в вытяжках из биоматериала различных соединений таких как: продукты углеводного обмена, белкового обмена, жирового обмена. Ферменты, расположенные в эндоплазматическом ретикулуле клеток печени, защищают организм от накопления жирорастворимых экзогенных и эндогенных соединений, превращая их в водорастворимые метаболиты, которые легко выводятся почками [50, 51].

2.2 Методы исследования

При проведении исследований качественного анализа трамадола, мы применяли такие методы анализа как: ТСХ, УФ- спектрофотометрия, также нами были применены химические методы (цветные и осадительные реакции, а также реакции на функциональные группы).

При проведении количественного анализа трамадола, применяли методы УФ-спектрофотометрии.

2.2.1 Химические методы исследования

Химические методы исследования включают в себя: цветные и осадительные реакции, а также реакции на функциональные группы. Для качественного анализа, химические методы были использованы нами для определения трамадола как отдельного вещества, а также для определения в вытяжках из биоматериала в качестве предварительных проб. Проведение химических методов производили в соответствии с найденными методиками в литературных источниках [52, 53, 54].

Осадительные реакции. Третичный атом азота придает соединениям слабовыраженные основные свойства, таким образом за счет гетероатома азота (третичного), содержащегося в молекуле, алкалоиды обладают способностью образовывать простые и комплексные соли с кислотами, солями тяжелых металлов - окрашенные осадки нерастворимые в воде. В приведенных литературных данных для проведения осадочных реакциях были использованы следующие общеалкалоидные осадительные реактивы: реактив Драгендорфа, реактив реактив Бушарда-Вагнера, реактив Майера реактив, Зонненштейна, реактив Шейблера, реактив Марме.

Цветные реакции. Также для алкалоидов помимо вышеуказанных осадочных реакций применяют реакции окрашивания, они основаны на окислении, конденсации, дегидратации алкалоидов. Для проведения цветных реакций довольно часто используют концентрированную серную или азотную кислоту, а также реактив Марки, реактив Фреде, реактив Манделина, реактив Эрдмана.

Реакции на функциональные группы. Принадлежность веществ к одному из множества классов соединений определяется качественными реакциями, с их помощью можно исключить или подтвердить наличие функциональных групп. Для проведения качественного анализа на функциональные группы желательно использовать реакции, при которых происходит изменение окраски или выпадение осадка. Также немалое значение имеет специфичность и чувствительность проводимых реакций. Например, для определения наличия спиртового гидроксида в соединениях применяют следующие реакции и реактивы: реакция этерификации (уксусная кислота, концентрированная серная кислота), реакция окисления (калия гексацианоферрат (III), калия дихромат), реакция комплексообразования (раствор сульфата меди, гидроксид натрия).

2.2.2 Хроматографические методы анализа

2.2.2.1 Метод тонкослойной хроматографии

Тонкослойная хроматография (ТСХ) является одной из самых универсальных и широко используемых методов разделения в хроматографии. ТСХ по-прежнему выполняет основную роль в хроматографическом анализе образцов в тех случаях, когда высокоэффективная жидкостная хроматография имеет трудности. Преимущество ТСХ состоит в том, что она не требует сложного и дорогого аналитического оборудования, также несколько образцов можно анализировать одновременно. Поэтому процедуры ТСХ важны, особенно в странах или лабораториях с ограниченными ресурсами [55].

Обнаружение и дальнейший анализ разделенных компонентов можно проводить использованием УФ-излучения, с помощью химических реакций, приводящих к цветным пятнам, либо с применением сложных приборов, таких как масс-спектрометрия или инфракрасная спектроскопия [56].

Данный метод относится к плоскостным видам хроматографии. В основе метода ТСХ разделение компонентов обусловлено переносом подвижной фазы (элюента или системы растворителей) вдоль неподвижной фазы (сорбента) с различными скоростями в соответствии с коэффициентами распределения разделяемых компонентов между двумя фазами [57].

По механизму разделения ТСХ основана на следующих процессах: адсорбция (сорбция исследуемых веществ в сорбенте), распределение (растворение исследуемых веществ в сорбенте), ионный обмен (притяжение ионов к группам противоположного заряд на сорбенте) [58].

Неподвижная фаза. В ТСХ применяют неподвижную фазу, которая обычно представляет собой закрепленный слой на подложке из стекла, алюминия или пластика (алюминиевая фольга или полимерные материалы). Размеры пластин, как правило, стандартизированы: 20*20 см, 10*20 см или 5*20 см. Для закрепления на подложке стандартизированного тонкого слоя применяются гипс, крахмал, агар-

агар [59]. Обычно в практике ХТА применяют готовые пластинки «Силуфол» и «Сорбфил». В качестве сорбентов для ТСХ наиболее распространены: силикагели различного зернения, целлюлоза, окись алюминия, кизельгель, сефадекс, полиамид. Также к сорбентам иногда добавляют флуоресцентный индикатор [60].

Подвижная фаза. Подвижные фазы, используемые для ТСХ должны удовлетворять различным требованиям: растворители должны легко очищаться, быть недорогими, иметь низкую вязкость и быть совместимым со стационарной фазой. Оптимизацию системы растворителей можно проводить методом проб и ошибок. В качестве подвижной фазы могут использоваться разные растворители как индивидуальные, так и их смеси [61].

Методика анализа. На линию старта хроматографической пластинки наносят исследуемые растворы. Растворы наносят с использованием микрошприцов в несколько приемов. При этом одновременно на пластинку наносят эталонные растворы анализируемых веществ. Расстояние между пятнами образцов на линии старта не должно быть меньше 1 см. Важно отметить, что при работе с пластинкой нельзя касаться пальцами слоя сорбента, брать пластинку необходимо за края [62].

Для проведения ТСХ системы растворителей смешивают в требуемых соотношениях. Камеры герметично закрывают крышкой и оставляют на 30-60 минут для насыщения. Для каждой новой пластинки готовят новую систему растворителей. Количество растворителя для проведения хроматографирования должно быть в таком количестве, чтобы при проведении восходящего варианта хроматографирования его уровень соответствовал погружению пластины не более чем на 5 мм. Край пластинки погружают ниже стартовой линии в систему растворителей. По мере продвижения жидкости по пластинке под действием капиллярных сил происходит разделение смеси веществ. Далее вынимают пластинку, сушат и проявляют определенным реагентом. После отмечают положение пятен, которые соответствуют исследуемым веществам [63].

Качественный анализ. Перед проведением детектирования необходимо чтобы растворители были полностью выпарены, пластины можно сушить на воздухе в хорошо проветриваемом помещении или в сушильном шкафу. Существует множество методов обнаружения. Окрашенные соединения видны на пластинке в видимом свете. Флуоресцентные соединения могут обнаруживаются по свечению с помощью длинноволнового УФ-излучения (365нм) или же с помощью коротковолнового (254 нм). Другой метод обнаружения заключается в опрыскивании пластины реагентом, позволяющим обнаружить пятна на пластинке [64].

Основным показателем качественного анализа методом ТСХ является значение R_f (коэффициент хроматографической подвижности).

Расчет данного показателя проводят по формуле:

$$R_f = \frac{L_x}{L_s}; \quad (2.1)$$

где:

L_x – длина пробега от линии старта до центра пятна на хроматограмме исследуемого соединения;

L_s – длина пробега элюента от линии старта до линии фронта хроматограммы.

Величина данного показателя (R_f) зависит от множества факторов, таких как: природа сорбента, толщины слоя, природа системы растворителей, также их соотношения, способа нанесения пробы, выбранного способа детектирования, температуры и др [65].

Величина R_s является более достоверной, поэтому для повышения точности идентификации веществ используют данный показатель. Показатель R_s представляет собой отношение величины R_f исследуемого вещества к величине R_f вещества принятого за стандарт [66].

2.2.3 Спектрофотометрические методы анализа

2.2.3.1 Метод УФ-спектрофотометрии

В ХТА метод УФ-спектрофотометрии используется для идентификации и количественного определения токсических веществ. Метод основан на поглощении электромагнитного излучения определяемым веществом. УФ-спектрофотометрическое измерение проводят в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм. Однако при проведении анализа, необходимо учитывать некоторые особенности, анализируемые вещества должны иметь в своей химической структуре наличие хромофоров [67].

Спектральные характеристики снимали в различных растворителях: воде очищенной, 0,1 М растворе хлороводородной кислоты, 10% спиртовом растворе гидроксида натрия.

Спектрофотометрическое определение основано на законе Бугера-Ламберта-Бера и определяется формулой [68]:

$$I_g \frac{I_0}{I} = \varepsilon * C * b \quad (2.2)$$

где:

I_0 – интенсивность падающего на вещество излучения;

I – интенсивность прошедшего через вещество излучения;

ε – показатель поглощения;

C – концентрация вещества в растворе, %;

b – толщина слоя, см.

Величина $Ig \frac{I_0}{I}$ представляется собой оптическую плотность (A).

Качественный анализ выполняется путем сравнения спектральных характеристик анализируемого вещества (отношение оптических плотностей при определенных длинах волн и т.п.) с аналогичными свойствами стандартного образца [68].

Количественный анализ. Метод основан на прямо-пропорциональной зависимости величины поглощения от концентрации вещества. Существует 2 способа количественного определения методом УФ-спектрофотометрии [69]:

- сравнение со стандартным образцом;
- по удельному показателю поглощения.

Количественный определение способом сравнения со стандартным образцом. Рассчитывают концентрацию испытуемого вещества и измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартного образца.

Для количественного определения по удельному показателю поглощения рассчитывают содержание вещества в процентах на основании предварительно известного значения удельного показателя поглощения, измеряют оптическую плотность испытуемого вещества и рассчитывают концентрацию.

Основным требованием для проведения количественного анализа является подчинение закону Бугера-Ламберта-Бера в интервале выбранных концентраций. Для этого строится градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации, затем определяется область концентраций в пределах которой наблюдается подчинение закону, а именно прямая линия по диагонали, выходящая из начала координат.

Метод УФ-спектрофотометрии является доступным, удобным и простым в использовании и проведении. Данный метод является чувствительным и нуждается в тщательной очистке анализируемых веществ от нежелательных примесей.

Применение метода УФ-спектрофотометрии в ХТА осложняется наличием в извлечении примесей эндогенных соединений, что крайне проявляется при исследовании трупного биоматериала, который подвергся гнилостным изменениям. Эндогенные соединения способствуют искажению спектров поглощения исследуемого вещества [70].

2.2.4 Методы изолирования органических веществ из биообъектов

На сегодняшний день в токсикологической химии присутствует множество современных высокочувствительных методов анализа, при этом идентификация и количественное определение лекарственных средств в биологическом материале вызывает некоторые трудности. ХТА проводят в несколько этапов.

Сначала проводят изолирование из биоматериала. Данный процесс представляет собой перевод токсикологически значимых веществ из биообъекта в жидкую фазу [52, 53].

Далее подвергают очистке полученных вытяжек из биоматериала от сопутствующих примесей, для этого применяют методы экстракции, хроматографии, а также сочетание данных методов.

Завершающим этапом становится обнаружение и количественное определение выделенного вещества [57, 63, 71].

К классическим методам изолирования наркотических и сильнодействующих веществ относятся методы: А.А.Васильевой (изолирование водой, подкисленной щавелевой кислотой), Стаса-Отто (изолирование этиловым спиртом, подкисленным щавелевой кислотой), В.П. Крамаренко (изолирование водой, подкисленной серной кислотой).

3. МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТРАМАДОЛА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ)

3.1 Химические методы обнаружения

Для качественного анализа трамадола нами были использованы осадительные и цветные реакции, а также реакции на функциональные группы.

Для проведения реакций использовали стандартный раствор трамадола с содержанием основного вещества 50 мг/мл.

Реакции проводили на специальных фарфоровых пластинках.

Чувствительность реакций и предельное разведение рассчитывали по формуле:

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

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

3.1.1 Цветные реакции

При проведении цветных реакций были использованы реактивы, указанные в разделе 2.2.1.

Выпаривали стандартный раствор трамадола, затем на сухой остаток наносили необходимые реактивы.

Наиболее специфичная и интенсивная окраска продуктов взаимодействия изученных реагентов с трамадолом возникает после обработки:

- реактивом Марки (1 капля формалина в 1,0 мл концентрированной серной кислоты) - образование буро-коричневого пятна;
- реактивом Манделина (0,01 г ванадата аммония, растворенного в 2,0 мл концентрированной серной кислоты) - серо-зеленое окрашивание;
- с концентрированной серной кислотой наблюдали фиолетовую окраску.

Для данных реагентов были определены значения предела обнаружения трамадола, представленные в табл 3.

Таблица 3 - Определение и пределы чувствительности цветных реакций трамадола с некоторыми реактивами

Продолжение таблицы 3

Реактив	Наблюдения	Чувствительность, мкг
Реактив Марки	Буро-коричневое окрашивание	15
Реактив Манделина	Серо-зеленое окрашивание	2
Конц. серная кислота	Фиолетовое окрашивание	0,1

В ходе выполнения цветных реакций наибольшую чувствительность трамадол проявил с концентрированной серной кислотой (0,1 мкг).

3.1.2 Осадительные реакции

При проведении осадочных реакций был использованы стандартные алкалоидные реактивы, указанные в разделе 2.2.1.

Каплю стандартного раствора трамадола наносили на предметное стекло и выпаривали. Сухой остаток на стекле растворяли в 1-2 каплях C_2H_5OH .

Затем на стекло наносили каплю реактива Драгендорфа (раствор йодида висмута в йодиде калия) и соединяли капли с помощью стеклянной палочки. Появился осадок оранжевого цвета.

При добавлении капли реактива Бушарда – Вагнера (раствор йода в йодиде калия) наблюдался осадок оранжево – коричневого цвета.

Для данных реагентов были определены значения предела обнаружения трамадола, представленные в табл.4

Таблица 4 - Определение и пределы чувствительности осадительных реакций трамадола с некоторыми реактивами

Реактив	Наблюдения	Чувствительность, мкг
Реактив Драгендорфа	осадок оранжевого цвета	2
Реактив Бушарда-Вагнера	осадок оранжево – коричневого цвета	0,007

При проведении осадительных реакций наиболее чувствительным реактивом оказался реактив Бушарда-Вагнера (0,007 мкг).

В результате проведенного исследования трамадола для идентификации определяемого вещества с помощью осадительных и цветных реакций, можно сделать заключение, что данные реакции малочувствительны и неспецифичны и могут быть использованы только в качестве предварительного анализа трамадола.

3.1.3 Реакции на функциональные группы.

Трамадол – является производным циклогексана, имеет в своей химической структуре третичный атом азота и метоксигруппу. Третичный атом азота обуславливает его основные свойства. В ходе исследования мы провели ряд реакций на функциональные группы. За счет третичного атома азота получили вышеуказанные общеалколоидные реакции (осадочные и цветные) (см. 3.1.1 и 3.1.2). Трамадол содержит в своей молекуле хлорид – ион который мы идентифицировали реакцией на хлориды.

Все реакции на функциональные группы являются малочувствительными и неспецифичными. Таким образом, можно сделать заключение, что данные реакции могут использоваться в качестве предварительных проб и требуют обязательного подтверждения физико-химическими методами анализа.

3.2 Физико-химические методы, применяемые в качественном анализе

3.2.1 Метод тонкослойной хроматографии

Тонкослойная хроматография (ТСХ) является одной из самых универсальных и широко используемых методов разделения в хроматографии. В проведении химико-токсикологического анализа довольно широко используется метод ТСХ в качестве предварительного метода идентификации веществ. Также метод хроматографии в тонком слое сорбента применяют для разделения и очистки токсикологически значимых веществ [72]. Учитывая вышеперечисленные достоинства метода нами была поставлена цель провести исследование при помощи метода ТСХ.

Для исследования трамадола методом хроматографии в тонком слое сорбента были подобраны оптимальные хроматографические системы растворителей. Хроматографирование осуществляли восходящим методом в предварительно насыщенных камерах.

Условия хроматографического анализа: пластинки «Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ», хроматографические системы 1) – этилацетат - этанол - аммиак (34:4:2), 2) – этилацетат – гексан - аммиак (50:15:2); 3) – хлороформ–этанол–ледяная уксусная кислота (9:2:0,1); 4) – хлороформ – этилацетат – аммиак (12:8:0,2); 5) – хлороформ–толуол–этанол (9:8:1); 6) – толуол-ацетон-этанол-аммиак (45:45:7,5:2,5); 7) – бензол

– этанол – триэтиламин(9:1:1). Объем наносимой пробы – от 1 до 10 мкл. Время насыщения камеры – 30 минут. На стартовую линию хроматографической пластины наносили 10 мкл, на расстоянии не менее 10 мм от нижнего края и не менее 15 мм от бокового края. Пластины высушивали и поместили в подготовленную хроматографическую камеру.

Таблица 5- Значения Rf трамадола полученные при хроматографировании в различных системах растворителей

Хроматографическая система	Значение Rf трамадола (Хроматографическая пластинка «Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ»)
этилацетат - этанол - аммиак (34:4:2)	0,75
этилацетат – гексан - аммиак (50:15:2)	0,70
хлороформ–этанол–ледяная уксусная кислота (9:2:0,1)	0,83
хлороформ – этилацетат – аммиак (12:8:0,2)	0,65
хлороформ–толуол–этанол (9:8:1)	0,50
толуол-ацетон-этанол-аммиак (45:45:7,5:2,5)	0,68
бензол – этанол – триэтиламин (9:1:1)	0,75

В результате проведенных исследований было установлено что, наиболее эффективное разделение трамадола методом тонкослойной хроматографии достигается при использовании системы растворителей: хлороформ–этанол–ледяная уксусная кислота (9:2:0,1).

Детектирование полученных хроматограмм проводили при помощи реактивов, указанных в табл.6

Таблица 6 – Предел обнаружения и реактивы, применяемые для детектирования трамадола на хроматограммах

Проявители	Окрашивание	Предел обнаружения, мкг
УФ- свет (254,365 нм)	Область поглощения при 254 нм (Фиолетового цвета)	1 мкг
Конц.серная кислота	Фиолетовое	1 мкг
Реактив Манделина	Серо-зеленое	5 мкг
Реактив Драгендорфа	Оранжевое	5 мкг

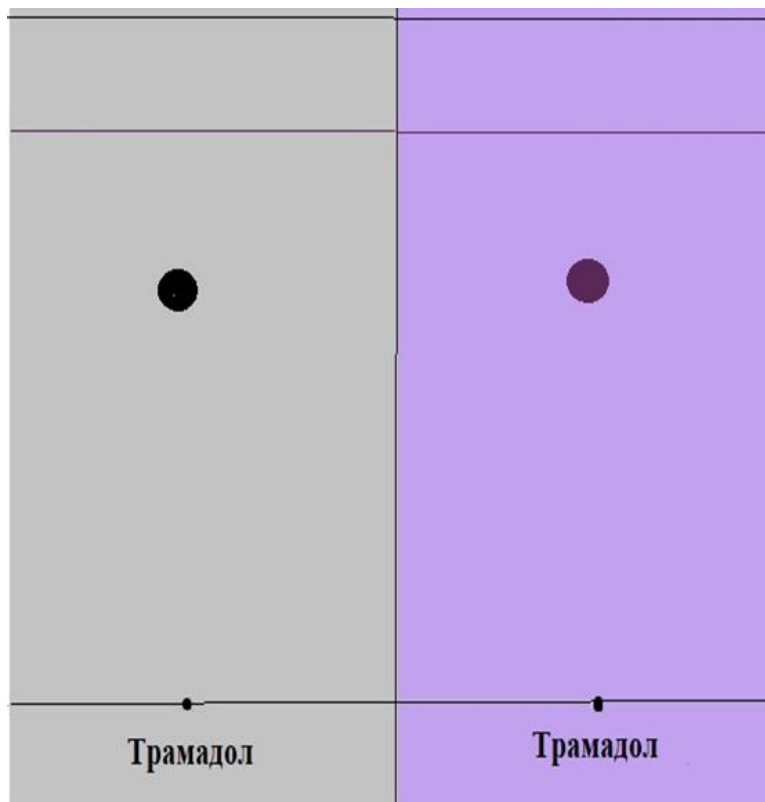


Рисунок 1 - Детектирование трамадола

- 1- При обработке хромаграфической пластины УФ-светом (254 нм)
- 2- При обработке конц.серной кислотой

Дальнейшим этапом в нашей работе стало определение предела чувствительности выбранных детектирующих реагентов относительно трамадола. С этой целью мы наносили на пластинки микрощипцом стандартные растворы исследуемого вещества в хлороформе в количестве, соответствующем 6,0; 5,0; 3,0; 2,5; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5 мкг.

После завершения процесса хроматографирования пластины высушивали при комнатной температуре до полного испарения растворителей и определяли в УФ – свете (254 нм) отмечая при этом выявленные зоны гашения люминесценции 1 мкг и более. При дальнейшей обработке конц.серной кислотой наблюдали пятна трамадола, соответствующие 1 мкг и более.

Установлено, что предел обнаружения трамадола при УФ-свете составляет 1 мкг, также наиболее специфичная и интенсивная окраска трамадола возникает после обработки хроматографической пластинки реактивом конц. серной кислотой - 1 мкг (фиолетовое окрашивание).

3.2.2 Метод УФ- спектрофотометрии

УФ-спектрофотометрия имеет огромное значение в фармацевтическом и химико-токсикологическом анализах, применяется для определения подлинности, посторонних примесей и количественного определения [68].

Применение УФ- спектрофотометрии зависит от структуры анализируемого вещества, обязательным является присутствие в структуре хромофорных групп (сопряженные связи др.), именно их наличие обуславливает поглощение электромагнитного излучения [69].

Идентификация токсических веществ методом УФ- спектрофотометрии осуществляется на сравнении спектра поглощения исследуемого вещества со спектром стандартного образца приведенного в соответствующей литературе [73, 74].

Для изучения спектров поглощения трамадола, готовили растворы в соответствующих растворителях (см. раздел 2.2.3.) с таким расчетом, чтобы концентрация составляла 375 мкг/мл. При помощи спектрофотометра СФ- 2000 с использованием кварцевых кювет толщиной слоя 1 см, в диапазоне длин волн 220 – 400 нм проводили измерение оптической плотности приготовленных растворов.

Результаты выполненных нами исследований приведены на рисунке 2 и в таблице 7.

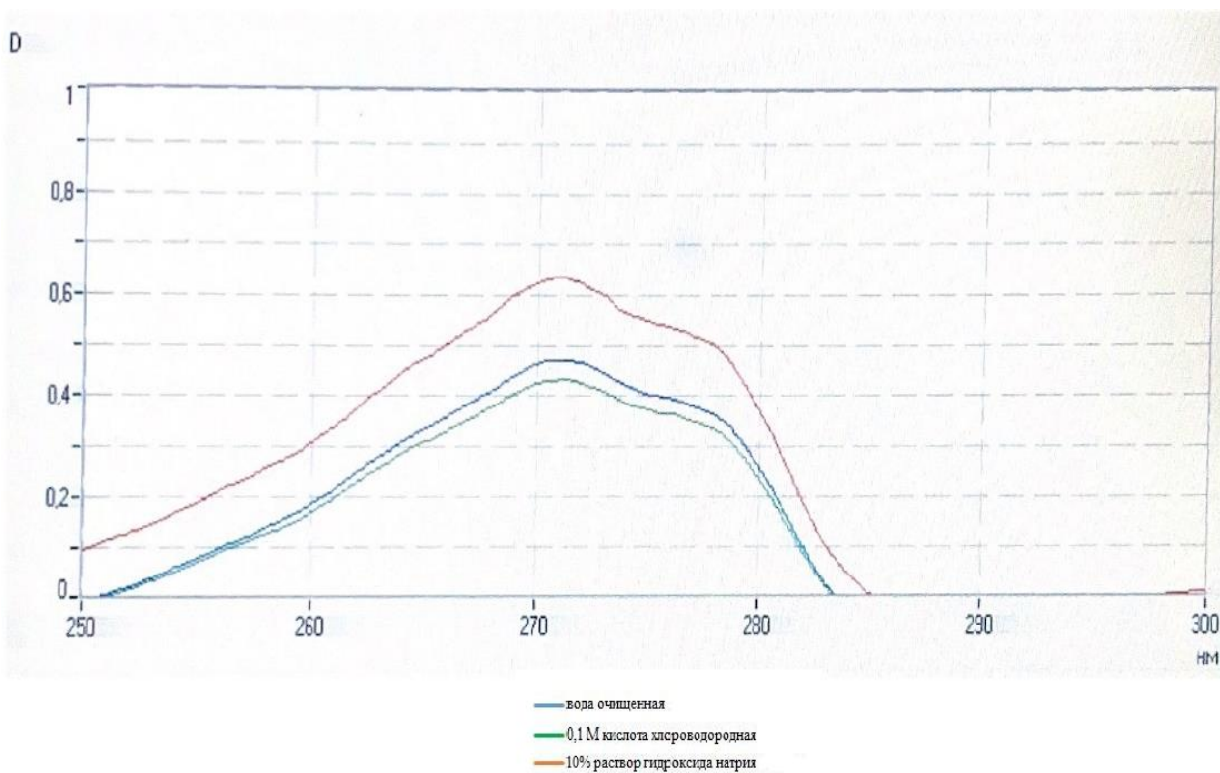


Рисунок 2– УФ-спектры раствора трамадола (375 мкг/мл) в различных растворителях

Таблица 7 – Зависимость оптической плотности раствора трамадола от применяемых растворителей

№	Длина волны, нм	Оптическая плотность		
		10 % раствор NaOH	0,1 М раствор HCL	Вода очищенная
1	250	0,0997	0	0
2	255	0,1821	0,0869	0,0870
3	260	0,3069	0,1876	0,1968
4	265	0,4788	0,3087	0,3296
5	270	0,6208	0,4189	0,4452
6	271	0,6376	0,4261	0,4665
7	275	0,5664	0,3867	0,4021
8	277	0,5293	0,3409	0,3758
9	278	0,5135	0,3278	0,3591
10	280	0,3882	0,2442	0,2673

УФ- спектрофотометрическое определение в нейтральной среде (вода очищенная) при длине волны 271 нм наблюдали один максимум поглощения и плечо при 277 нм (Рисунок 3).

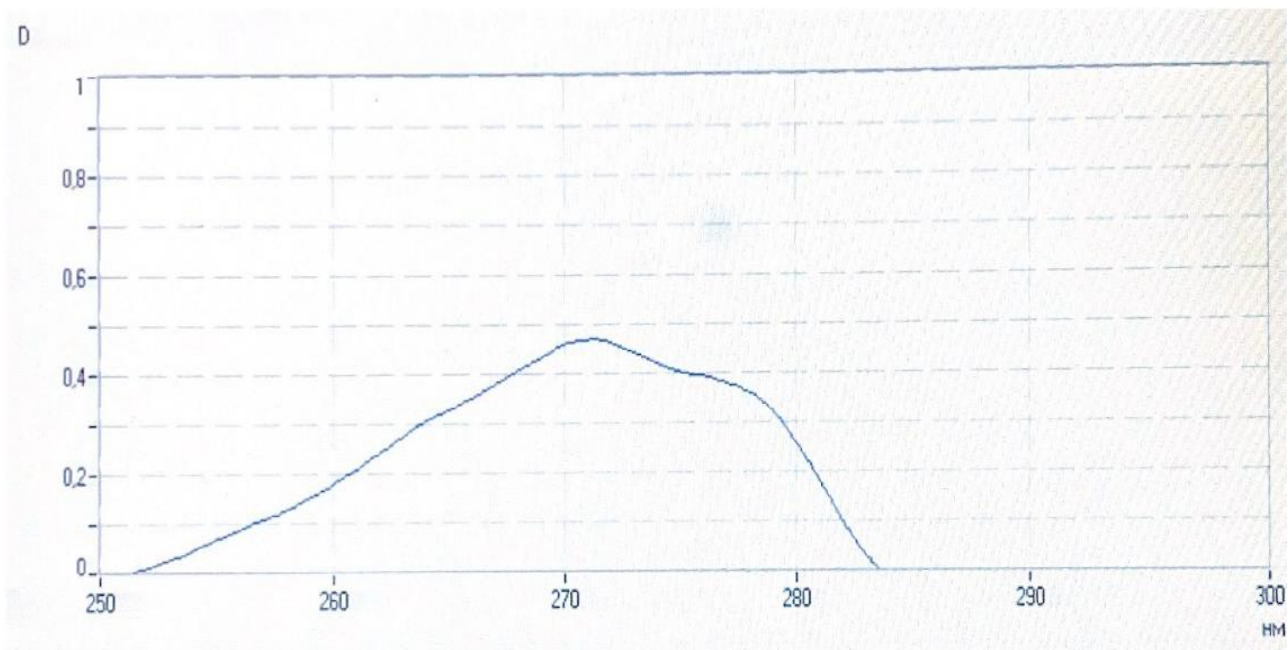


Рисунок 3– УФ спектры раствора трамадола в воде очищенной

УФ - спектрофотометрическое определение в 0,1 М растворе HCL при длине волны 271 нм наблюдали один максимум поглощения и плечо при 278 нм (Рисунок 4).

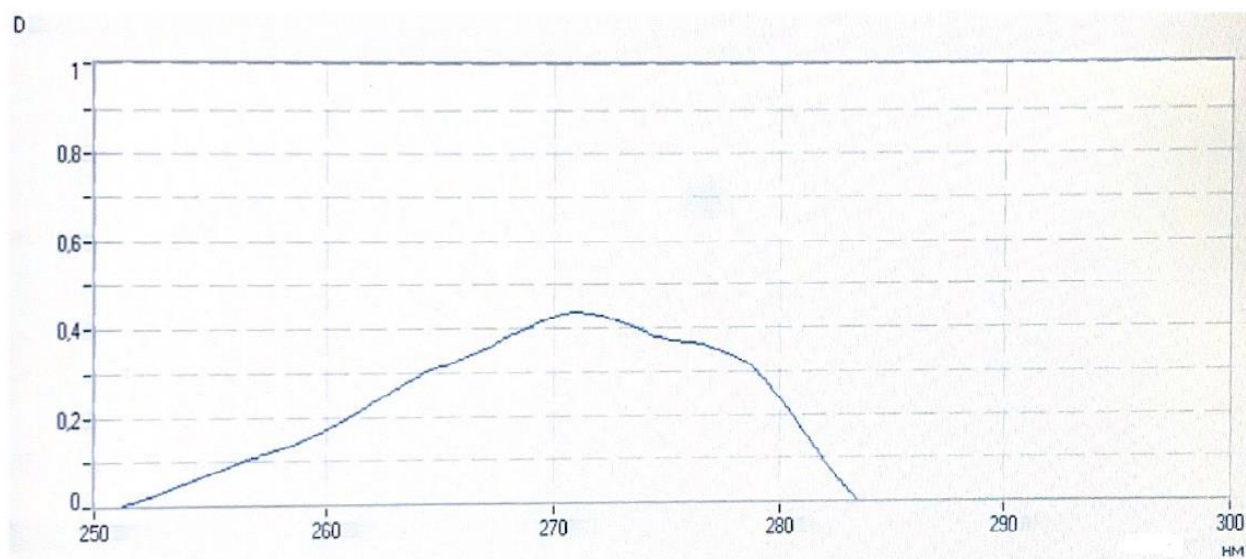


Рисунок 4- УФ спектры раствора трамадола в 0,1 М растворе HCL

УФ- спектрофотометрическое определение в щелочной среде (10 % раствор NaOH) при длине волны 271 нм наблюдали один максимум поглощения и плечо при 278 нм (Рисунок 5).

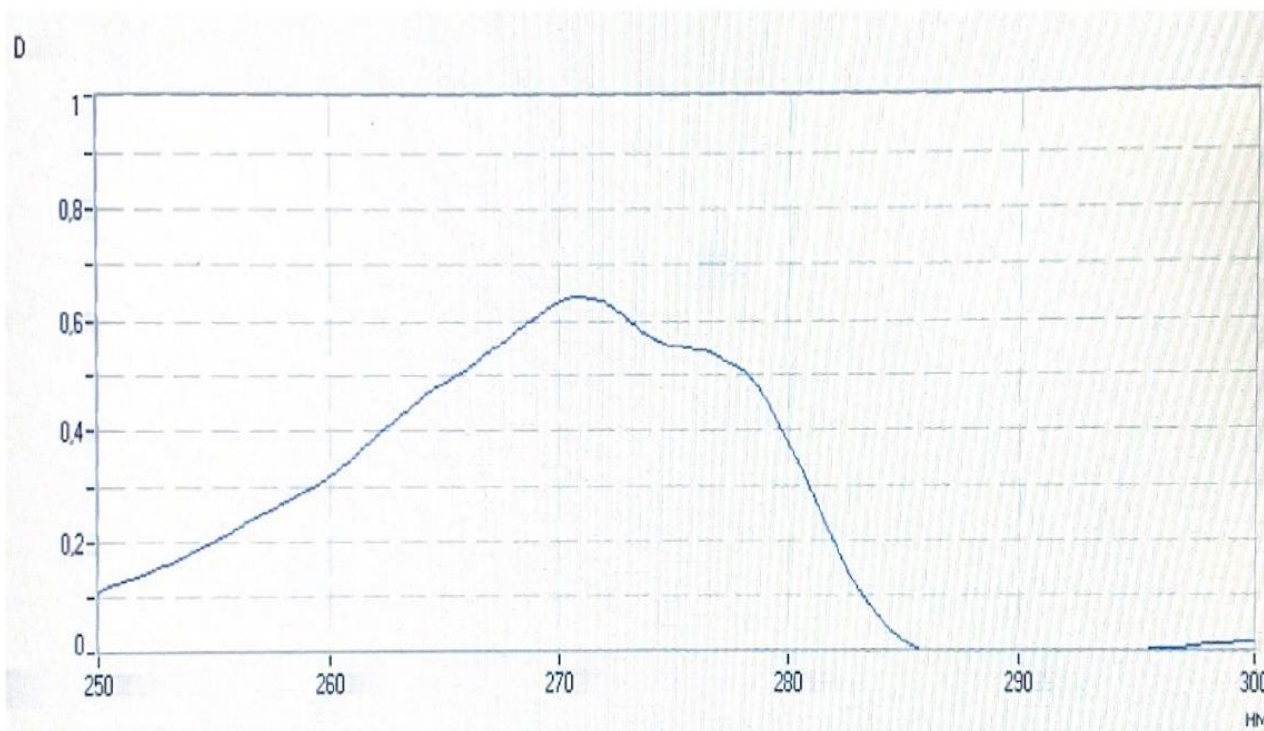


Рисунок 5 - УФ спектры раствора трамадола в щелочной среде (10 % раствор NaOH)

Таким образом, в ходе исследования нами было установлено, что наиболее интенсивный максимум поглощения наблюдался при длине волны 271 нм и плечо при 277 нм в нейтральной среде (вода очищенная). Исходя из полученных результатов для последующих исследований, мы использовали раствор стандартного образца трамадола в воде очищенной.

Определение удельного $A_{1\text{ см}}^{1\%}$ и молярного (ϵ) коэффициента светопоглощения. Расчет проводили по следующим формулам:

$$A_{1\text{ см}}^{1\%} = \frac{A}{b \cdot c} ; \quad (3.2)$$

где:

A - оптическая плотность;

b - толщина слоя, см (1 см);

c- концентрация раствора трамадола, %.

$$\varepsilon = \frac{A}{b \cdot c}; \quad (3.3)$$

где:

C – концентрация раствора трамадола, моль/л.

Рассчитать молярный коэффициент светопоглощения можно также по формуле:

$$\varepsilon = (A_{1\text{ см}}^{1\%}) * \frac{M}{10}; \quad (3.4)$$

где:

M - молярная масса препарата.

Таблица 8 - Спектральные характеристики трамадола в различных растворителях

Растворители	Трамадол	
	$(A_{1\text{ см}}^{1\%})$	ε
Вода очищенная	12,44	373
10 % раствор гидроксида натрия	17	509,7
0,1 М раствор хлористоводородной кислоты	11,3	338,8

4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРАМАДОЛА

4.1 Метод УФ - спектрофотометрии

При разработке методики количественного анализа трамадола методом УФ-спектрофотометрии нами были использованы полученные результаты качественного анализа, УФ-спектры раствора трамадола в нейтральной среде (вода очищенная) (разд.3.2.2)

Построение калибровочного графика. Для этого в мерную колбу емкостью 5 мл помещали по 0,0025; 0,005; 0,0075; 0,01; 0,0125; 0,015 мл РСО трамадола в воде очищенной (в 1 мл раствора 50 мг трамадола), затем доводили до метки с помощью раствора воды очищенной и определяли оптическую плотность. УФ-спектры регистрировали с помощью спектрофотометра СФ-2000 с использованием кварцевых кювет толщиной слоя 1 см при длине волны 271нм. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную. По результатам полученных значений оптической плотности рассчитывали удельные и молярные показатели коэффициенты светопоглощения. Полученные результаты анализа изложены в таблице 9.

Таблица 9 - Расчет удельного и молярного показателей поглощения раствора трамадола в воде очищенной (среднее значение 5 измерений)

Концентрация трамадола мкг/мл	Оптическая плотность	$A_{1\text{ см}}^{1\%}$	Метрологически е характеристики	ϵ	Метрологически е характеристики
125	0,15	12	$\bar{x} = 12,04$	359,8	$\bar{x} = 361$
250	0,31	12,4	$S = 0,52$	371,8	$S = 2,94$
375	0,46	12,2	$S^2 = 0,28$	365,8	$S^2 = 8,65$
500	0,61	12,2	$S_{\bar{x}} = 0,23$	365,8	$S_{\bar{x}} = 1,6$
625	0,74	11,84	$\Delta \bar{x} = \pm 0,63$	355	$\Delta \bar{x} = \pm 4,448$
750	0,87	11,6	$\epsilon = 5,23$	347,8	$\epsilon = 1,23$
			$\bar{x} \pm \Delta \bar{x} = 12,04 \pm 0,63$		$\bar{x} \pm \Delta \bar{x} = 361 \pm 4,448$

На основании результатов анализа, приведенных в таблице было установлено, что трамадол подчиняется основному закону светопоглощения Бугера-Ламберта-Бера в пределах 125 – 750 мкг/мл препарата в 1 мл раствора.

Расчет удельного и молярного показателей поглощения проводили по формуле:

$$A_{1\text{ см}}^{1\%} = \frac{A}{C \cdot 1}; \quad (4.1)$$

где: $A_{1\text{ см}}^{1\%}$ - удельный показатель поглощения;
A - оптическая плотность;
C – концентрация, %;
l – толщина слоя жидкости, см;

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

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

Разработанную нами методику применили для количественного анализа трамадола методом УФ- спектрофотометрии в растворах различной концентрации. Для этого построили калибровочный график (рисунок 6).

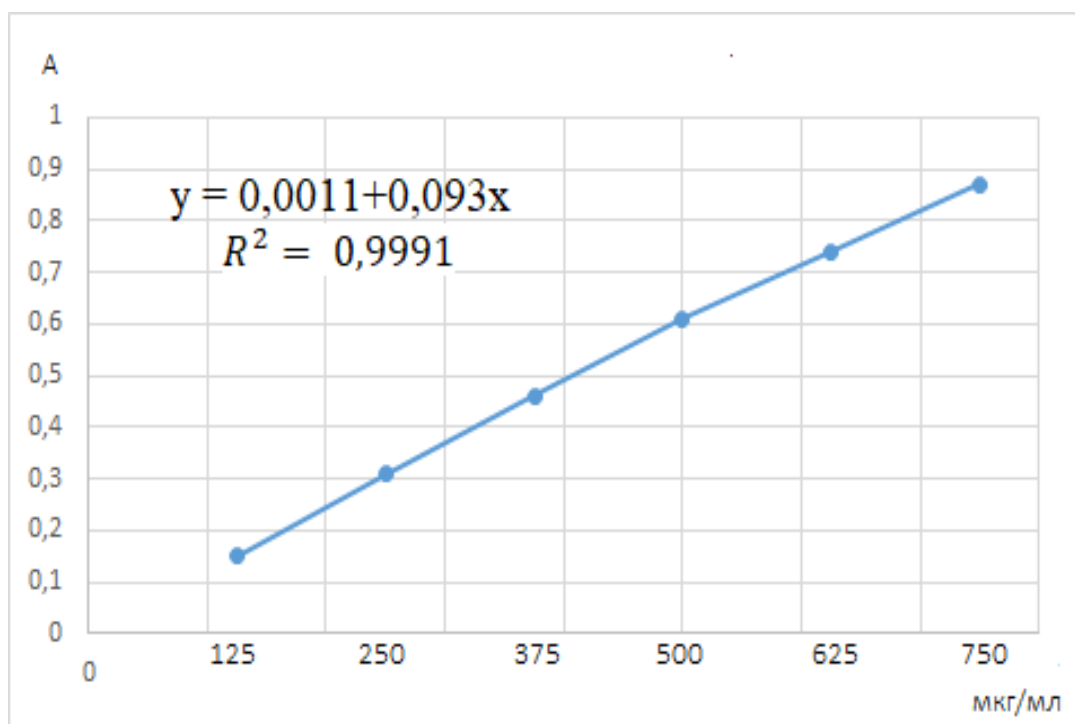


Рисунок 6 -Калибровочный график определения раствора трамадола в воде очищенной

Уравнение линейной зависимости $y = 0,0011 + 0,093x$, коэффициент корреляции составляет 0,9991.

Полученные результаты количественного определения трамадола УФ-спектрофотометрическим методом при помощи, разработанной нами методики

изложены в таблице 10. Систематизирование и обработку полученных результатов производили при помощи программы Excel.

Таблица 10 - Результаты количественного определение раствора трамадола УФ-спектрофотометрическим методом в воде очищенной, рассчитанные с помощью калибровочного графика (среднее значение 5 измерений)

Трамадол, мкг	Оптическая плотность	Обнаружено		Метрологические характеристики
		мкг	%	
125	0,15	119	95,2%	$\bar{x} = 97,6\%$ $S = 0,118$ $S^2 = 0,014$ $S_{\bar{x}} = 0,05$ $\Delta \bar{x} = \pm 0,139$ $\varepsilon = 0,14$ $\bar{x} \pm \Delta \bar{x} = 97,6 \pm 0,139$
250	0,31	244	97,6%	
375	0,46	369	98,4%	
500	0,61	491	98,2%	
625	0,74	617	98,72%	

Исходя из данных, изложенных в таблице, можно сделать заключение, что относительная погрешность метода составляет 0,14%. Таким образом, полученные результаты являются достоверными и надежными, поскольку входят в пределы диапазона доверительного интервала.

5. ИССЛЕДОВАНИЕ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ ТРАМАДОЛА ИЗ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ

5.1 Экстракция трамадола из водных растворов органическими растворителями в зависимости от pH среды.

В химико-токсикологическом анализе довольно часто применяется метод экстракции органическими растворителями для изолирования токсикологически значимых веществ, при очистке вытяжек из биоматериала от посторонних примесей [75,76].

Данный метод основывается на переходе извлекаемого вещества из жидкой фазы в другую жидкую фазу содержащую органический растворитель (экстрагент) при их взаимном соприкосновении [52].

Применение метода экстракции способствует повышению концентрации токсических веществ что позволяет в дальнейшем провести разделения и очистку.

Требования, предъявляемые к экстрагенту [77, 78]:

- высокая избирательность к определяемому веществу;
- плотность экстрагента должна отличаться от плотности воды;
- отсутствие необратимых реакций между экстрагентом и извлекаемым веществом;

Для разработки наиболее оптимального метода изолирования исследуемого вещества из биоматериала нами были изучены условия экстракции трамадола органическими растворителями из водных растворов [79].

В качестве экстрагентов использовали органические растворители: четыреххлористый углерод, хлороформ, диэтиловый эфир.

Для создания определенного значения pH в растворе использовали универсальные буферные смеси Бриттона-Робинсона [80].

Изучения экстракции органическими растворителями проводили по методике [81]: в делительную воронку вносили 9 мл универсального буферного раствора Бриттона Робинсона с определенным значением pH, затем добавляли 1 мл раствора трамадола в воде (1000 мкг препарата) и 10 мл соответствующего органического растворителя (хлороформ, диэтиловый эфир, четыреххлористый углерод). После чего, отстаивали 10 минут для разделения слоев. Слой органического растворителя отделяли, затем 5 мл органического слоя растворителя упаривали досуха в чашке на водяной бане при температуре 40°C градусов. К сухому остатку прибавляли 5 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты и тщательно перемешивали стеклянной палочкой. Далее исследовали методом УФ - спектрофотометрии на спектрофотометре СФ-2000. Результаты полученных данных изложены в таблице 11.

Таблица 11 - Результаты экстракции трамадола из водных растворов органическими растворителями

рН водного раствора	Экстракция трамадола из водных растворов, %		
	Хлороформ	Диэтиловый эфир	Четыреххлористый углерод
2	5,69	2,19	2,07
3	15,37	5,04	4,89
4	38,69	10,57	9,88
5	59,17	17,03	16,79
6	66,39	27,12	26,09
7	71,62	35,67	33,48
8	76,26	42,53	40,04
9	83,74	45,87	43,91
10	88,05	47,59	46,22
11	93,15	50,64	49,95
12	56,13	52,07	51,33
13	40,09	30,65	29,06

Таким образом, исходя из данных изложенных в таблице, нами было установлено, что для изолирования трамадола наиболее подходящим растворителем является хлороформ, почти не экстрагирует его из кислых растворов (рН 2-3). В диапазоне рН среды от 5 до 11 (59,17-93,15) наблюдается наибольший процент экстракции трамадола из водных растворов, при этом максимальный выход трамадола от 88,05 до 93,15% достигается при рН 9 - 11.

6. ВЫДЕЛЕНИЕ ТРАМАДОЛА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

6.1 Выделение трамадола из биоматериала с помощью классических методов изолирования

Одним из важнейших этапов химико-токсикологического анализа является изолирование ядовитых и сильнодействующих веществ из биологического материала.

В процессе исследования нами была проанализирована эффективность изолирования исследуемого вещества из биоматериала с помощью классических методов.

К классическим методам изолирования наркотических и сильнодействующих веществ относятся методы: А.А.Васильевой (изолирование водой, подкисленной щавелевой кислотой), Стаса-Отто (изолирование этиловым спиртом, подкисленным щавелевой кислотой), В.П. Крамаренко (изолирование водой, подкисленной серной кислотой). Данные методы в ХТА применяют при исследовании веществ кислотного, слабоосновного и основного характера.

Для изолирования трамадола с помощью общепринятых методов изолирования нами была использована модельная смесь, состоящая из исследуемого препарата – трамадола и трупной печени животного происхождения.

6.1.1 Выделение трамадола по методу Стаса-Отто

При изолировании трамадола из биоматериала нами был рассмотрен метод Стаса-Отто приведенный в литературе [82] со следующими модификациями: в процессе работы была уменьшена масса навески биоматериала до 10,0 г за счет использования высокочувствительных методов анализа, таким образом были уменьшены объемы извлекающих жидкостей, которые были применены для изолирования трамадола из биоматериала. К 10,0 г измельченного биоматериала (трупной печени животного происхождения) добавляли 1,0 мл водного раствора трамадола, содержавшего 1000 мкг препарата, затем перемешивали и оставляли на сутки. Готовили также контрольную смесь печени с растворителем (вода очищенная), исследования которой проводили параллельно.

К модельной смеси через сутки добавляли 10 мл 96% этанолом, затем подкисляли 10 %-м спиртовым раствором щавелевой кислоты до рН 2-3. После чего оставляли на 24 часа при комнатной температуре постоянно перемешивая.

Через сутки полученное кислое спиртовое извлечение сливали и затем дважды повторяли проведенную до этого операцию.

Полученные кислые спиртовые извлечения объединяли (3 порции), переносили на фильтр, также на этот фильтр помещали биологический материал промывали 10 мл 96 % этанола. Фильтровали в фарфоровую чашку и упаривали на водяной бане (при температуре не выше 40°C градусов) до густоты сиропа. К сиропобразной жидкости по каплям добавляли абсолютный этиловый спирт до

прекращения выпадения в осадок посторонних примесей. Упаривание спиртовых фильтратов и осаждение примесей этиловым спиртом из сиропообразной жидкости проводили многократно (до прекращения выпадения примесей в осадок от абсолютного этилового спирта).

После очистки сиропообразную жидкость доводили дистиллированной водой до 10 мл. Если в процессе образовывался осадок, также отфильтровывали.

Кислое водно-спиртовое извлечение помещали в делительную воронку, затем трижды экстрагировали с новыми порциями эфира по 10 мл. Полученные кислые эфирные слои отделяли, в последующем не исследовали.

Далее оставшееся кислое водно-спиртовое извлечение подщелачивали 25-процентным раствором аммиака до $pH=11$ и трижды экстрагировали хлороформом по 5 мл. Затем щелочные хлороформные извлечения отделяли и объединяли. При образовании стойких эмульсий применяли центрифугирование (в течение 5 мин. при 5000 об./мин) для их разрушения.

Качественный и количественный анализ трамадола в дальнейшем проводили в щелочных хлороформных извлечениях.

6.1.2 Выделение трамадола по методу А.А.Васильевой

В методе А.А.Васильевой при изолировании трамадола из биоматериала приведенной в работе [82], использовали указанные выше модификации. Готовили модельные смеси препарата с печенью в соответствии с указаниями в разд.6.1.2. Модельную смесь через сутки заливали двойным объемом дистиллированной воды, затем подкисляли 10% раствором щавелевой кислоты до кислой реакции на лакмус и оставляют на 2 часа при частом взбалтывании. Полученную кислые извлечения сливали и повторяли ту же самую операцию в течении часа. Кислые водные извлечения объединяли и процеживали через марлю, после центрифугировали в течении 10 минут (при 5000 об./мин). Затем полученную надосадочную жидкость каждой пробы переносили в делительную воронку и трижды экстрагировали хлороформом по 5 мл. Хлороформные извлечения отделяли, в последующем не исследовали.

Далее оставшееся кислое водное извлечение подщелачивали 25-процентным раствором аммиака до $pH=11$ и трижды экстрагировали хлороформом по 5 мл. Затем щелочные хлороформные извлечения отделяли и объединяли.

Качественный и количественный анализ трамадола в дальнейшем проводили в щелочных хлороформных извлечениях.

6.1.3 Выделение трамадола по методу В.П.Крамаренко

Для выделения трамадола по методу В.П.Крамаренко который описан в работе [82], использовался нами с некоторыми модификациями, указанными ранее. Готовили модельные смеси препарата с печенью в соответствии с указаниями в разд.6.1.2. К каждому модельному образцу через сутки добавляли около 10 мл 0,01

М раствора серной кислоты, затем перемешивали и контролировали значения рН с помощью индикатора (рН 2-3). Добавляли при необходимости 20-процентный раствор серной кислоты (если значение рН больше). Далее оставляли на 2 часа при частом взбалтывании. После полученный раствор из биоматериала сливали и вносили новые порции 10 мл 0,01 М раствора серной кислоты, при этом также перемешивали, контролировали значения рН среды и оставляли на один час при частом взбалтывании.

После чего объединяли полученные 3 порции кислых водных извлечений, процеживали сквозь марли и проводили центрифугирование в течение 5 мин. при 5000 об. /мин. Затем полученную надосадочную жидкость переносили в делительную воронку, а к осадку прибавляли 10 мл 0,01 М раствор серной кислоты. Затем еще раз проводили центрифугирование и добавляли ранее полученный центрифугат. После к кислому водному извлечению прибавляли сульфат аммония и оставляли на несколько часов.

Кислые водные извлечение 3 раза экстрагировали диэтиловым эфиром по 10 мл. Полученные эфирные слои отделяли, в последующем не исследовали. Далее кислое водное извлечение подщелачивали 20-процентным раствором гидроксида натрия до рН=11 и трижды экстрагировали хлороформом по 10 мл. Затем щелочные хлороформные извлечения отделяли и объединяли. При образовании стойких эмульсий применяли центрифугирование (в течение 5 мин. при 5000 об. /мин) для их разрушения.

Качественный и количественный анализ трамадола в дальнейшем проводили в щелочных хлороформных извлечениях.

6.2 Обнаружение трамадола в вытяжках из биологического материала

Для качественного анализа трамадола, выделенного из биологического материала нами были применены следующие методы анализа: цветные и осадочные реакции, ТСХ и УФ- спектрофотометрия.

Осадочные и цветные реакции. При выполнении качественного анализа трамадола выделенного из биоматериала с использованием осадочных и цветных реакций, проводили следующее: 5 мл хлороформной вытяжки упаривали на водяной бане, далее наносили на фарфоровые пластинки с углублениями и затем выпаривали остатки хлороформа. С полученными сухими остатками проводили осадочные и цветные реакции. В результате исследования со стандартным раствором получали данные, как указано в разделе 3.1.

Параллельно проведенные реакции осаждения и цветные реакции в вытяжках из биоматериала, полученные в холостых пробах показали, что экстрактивные вещества с данными реакциями эффекта не проявляют.

Таблица 12 - Качественный анализ трамадола в вытяжках из биоматериала при помощи осадочных и цветных реакций

№	Тип реакции	Используемые реактивы	Наблюдения
1	Осадочные реакции	Реактив Драгендорфа	Осадок оранжевого цвета
2		Реактив Бушарда-Вагнера	Осадок оранжево – коричневого цвета
3	Цветные реакции	Реактив Марки	Буро-коричневое окрашивание
4		Реактив Манделина	Серо-зеленое окрашивание
5		Конц. серная кислота	Фиолетовое окрашивание

Тонкослойная хроматография (ТСХ). Для проведения исследования предварительно высушивали и активировали хроматографические пластинки (см. раздел 3.2.1) в сушильном шкафу при температуре 110°C в течении получаса. При помощи стеклянных капилляров наносили 3 пробы на линию старта: стандартный раствор трамадола в хлороформе; хлороформную вытяжку из биоматериала с трамадолом; хлороформную вытяжку из биоматериала полученную в контрольном опыте.

В процессе исследования использовали систему растворителей: хлороформ–этанол–ледяная уксусная кислота (9:2:0,1). Детектирование полученных хроматограмм проводили при помощи УФ-света и конц.серной кислоты. Время насыщение камеры – 30 минут. Длина пробега растворителя – 10 см.

Значение показателя хроматографической подвижности (Rf) трамалола (n=6) составляло 0,73-0,75. При обработке полученных хроматограмм конц.серной кислотой трамадол проявлялся в виде фиолетового пятна.

УФ - спектрофотометрия. С хроматографической пластинки снимали слой сорбента скальпелем, пятно которое соответствует исследуемому веществу из биоматериала. Затем трамадол трижды элюировали с участка слоя сорбента, для этого использовали 10 мл хлороформа, далее проводили детектирование методом УФ- спектрофотометрии, как указано в разделе 3.2.2.

Хлороформный элюат отфильтровывали и выпаривали на водяной бане. Полученный УФ- спектр выделенного трамадола, имел те же полосы поглощения, что и стандартный хлороформный раствор трамадола. Для раствора сравнения нами использовался элюат, полученный из сорбента в холостом опыте.

6.3 Количественное определение трамадола в вытяжках из биоматериала

Методика УФ- спектрофотометрического определения трамадола. Половину вытяжки из хлороформа, которую получили в результате одного из проведенного методов изолирования (см.6.1.1-6.1.3), помещали в фарфоровую чашу и упаривали на водяной бане (при температуре не выше 40°C градусов), затем сухой остаток растворяли в 10 мл 0,1 М раствора соляной кислоты. УФ- спектры полученных вытяжек из биоматериала регистрировали с помощью спектрофотометра СФ- 2000 в кюветах толщиной слоя 1 см при длине волны 271нм (разд.4.1).

Таблица 13 - Результаты изолирования трамадола из биоматериала методом УФ- спектрофотометрии и их метрологические характеристики (среднее значение 5 измерений)

№	Метод изолирования	Выделено трамадола, %	Метрологические характеристики
1	Стас-Отто	47,5	$\bar{x} = 47,50; S = 0,8; S^2 = 0,656;$ $S_{\bar{x}} = 0,37; \Delta \bar{x} = \pm 0,99; \varepsilon = 2,19;$ $\bar{x} \pm \Delta \bar{x} = 47,5 \pm \pm 0,99$
2	А.А Васильева	20,55	$\bar{x} = 20,55; S = 1,08; S^2 = 1,18;$ $S_{\bar{x}} = 0,49; \Delta \bar{x} = \pm 1,36; \varepsilon = 6,7;$ $\bar{x} \pm \Delta \bar{x} = 20,5 \pm 1,36$
3	В.П.Крамаренко	26,5	$\bar{x} = 26,5; S = 0,6; S^2 = 0,36;$ $S_{\bar{x}} = 0,28; \Delta \bar{x} = \pm 0,77; \varepsilon = 2,95$ $\bar{x} \pm \Delta \bar{x} = 26,5 \pm 0,77$

Оценка пригодности разработанных нами методик количественного анализа трамадола, выделенного из биоматериала с помощью общепринятых в ХТА методов изолирования показала, что при определении методом УФ-спектрофотометрии наиболее эффективным методом изолирование трамадола является метод Стаса-Отто, позволяющий изолировать 47,5 % препарата

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований впервые разработаны методики качественного и количественного определения трамадола, имеющие большое токсикологическое значение.

Для обнаружения трамадола рекомендованы химические методы идентификации (цветные и осадительные реакции). Данные реакции малочувствительны, неспецифичны и могут использоваться в качестве предварительных проб, а также должны быть подтверждены физико-химическими методами анализа.

Для идентификации трамадола, выделенного из биоматериала, рекомендована методика тонкослойной хроматографии. В результате проведенных исследований было установлено, что наиболее эффективное разделение трамадола методом тонкослойной хроматографии достигается при использовании системы растворителей: хлороформ–этанол–ледяная уксусная кислота (9:2:0,1). Оптимальный способ детектирования наблюдали в УФ – свете при длине 254 нм, с последующей обработкой конц.серной.

Также для идентификации трамадола выделенного из биоматериала применяли метод УФ-спектрофотометрии. Трамадол детектируется при длине волны 271 нм.

Количественное определение трамадола, выделенного из биоматериала проводили при помощи метода УФ-спектрофотометрии.

Были изучены наиболее оптимальные условия экстракции трамадола из водной среды. Было установлено, что для изолирования трамадола наиболее подходящим растворителем является хлороформ, максимальный выход 93,15% достигается при рН 11.

Выполнена сравнительная оценка эффективности классических методов изолирования трамадола из биоматериала. С помощью данных методов от 20,55% до 47,5% трамадола из биоматериала. Установлено, что наибольшее количество препарата выделяется методом Стас-Отто (47,5%).

ВЫВОДЫ

1. Разработаны чувствительные методики идентификации трамадола с помощью химических и физико – химических методов исследования:

а) проведенные осадительные и цветные реакции могут использоваться в качестве предварительных проб и должны быть подтверждены с помощью физико-химических методов анализа.

б) при обнаружении трамадола с помощью метода ТСХ было установлено, что наиболее эффективное разделение трамадола достигается при использовании системы растворителей: хлороформ–этанол–ледяная уксусная кислота (9:2:0,1). Оптимальный способ детектирования - облучение пластинки УФ – свете при длине 254 нм, с последующей обработкой конц.серной.

в) при проведении идентификации трамадола методом УФ-спектрофотометрии наиболее интенсивный максимум поглощения наблюдался при длине волны 271 нм и плечо при 277 нм в нейтральной среде (вода очищенная).

2. Разработаны методики количественного определения трамадола с помощью физико – химических методов исследования:

При исследовании количественного определения трамадола методом УФ-спектрофотометрии, использовали трамадол в растворах с различной концентрацией (125-750 мкг/мл). Уравнение линейной зависимости $y = 0,0011 + 0,093x$, коэффициент корреляции составляет 0,9991.

3. Изучены наиболее оптимальные условия изолирования трамадола: при изучении условий экстракции для изолирования трамадола наиболее подходящим растворителем является хлороформ, почти не экстрагирует его из кислых растворов (рН 2 -3). В диапазоне рН среды от 5 до 11 (59,17-93,15) наблюдается наибольший процент экстракции трамадола из водных растворов, при этом максимальный выход трамадола от 88,05 до 93,15% достигается при рН 9 - 11.

4. Сравнительная оценка общепринятых методов изолирования (А.А. Васильевой, В.П. Крамаренко, Стас-Отто) трамадола из биоматериала показала, что наибольшее количество выделяется методом Стас-Отто (47,5%).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Исходя из полученных результатов исследования экспериментальные данные качественного и количественного определения трамадола, выделенного из биоматериала, были разработаны методические рекомендации. В методические рекомендации включены теоретические основы качественного и количественного определения трамадола с применением физико-химических методов анализа.

Разработанные учебно-методические рекомендации по предмету «Токсикологическая химия» в качестве самостоятельной работы студентов (СРС), фармацевтического факультета внедрены в учебный процесс НАО «Медицинский университет Астана» и КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова, г.Алматы.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/opioid-overdose> - официальный сайт ВОЗ, передозировка опиоидов.
2. Научный компонент «аптечная» наркомания: причины и меры противодействия «pharmacy» drug addiction: causes and counteraction measures № 3(7) 2020. – С. 1-23.
3. Муравьев Ю. В., Евсикова М. М. // Клин. фармакология и терапия. 2005. № 14. С. 83.
4. Radbruch L, Grond S, Lehmann KA. A risk-benefit assessment of tramadol in the management of pain. Drug Saf 1996; 15 (1): 8-29.
5. Мамедов П.П., Асадов Б.М. «Особенности зависимости при злоупотреблении трамadolом» // медицинские новости №4, 2019. – С. 46-48.
6. Ананьева Л.П. Анальгетик центрального действия трамadol гидрохлорид (Трамал) / Информационное письмо, Москва 2003
7. Karen Miotto, MD, Arthur K. Cho, PhD, Mohamed A. Khalil, MD, Kirsten Blanco, BS, Jun D. Sasaki, MD and Richard Rawson, PhD. Trends in Tramadol: Pharmacology, Metabolism, and Misuse // International Anesthesia Research Society, - 2016.- 124(1), 44–51.
8. Арбух Д. М., Абузарова Г. Р., Алексеева Г. С. Опиоидные анальгетики в терапии болевых синдромов (часть 1) // Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2017. – Т. 14, № 3. – С. 58-67.
9. Веселовская Н.В. Наркотики. Свойства, действие. Фармакокинетика. Метаболизм / Н.В. Веселовская [и др.]. – М., 2002.
10. Garg RK, Fulton-Kehoe D, Franklin G. Patterns of opioid use and risk of opioid overdose death among medicaid patients. Med Care. 2017;55(7):661–8.
11. G. Katzung, Basic & Clinical Pharmacology // - С.1229.
12. Mohammed Ilyas Ahmed Khan, MD, Declan Walsh, MSc, FACP, FRCP (Edin), and Norman Brito-Dellan, MD. Opioid and Adjuvant Analgesics: Compared and Contrasted // American Journal of Hospice & Palliative Medicine, 28(5) -2011. – С. 378-383.
13. Robert B. Raffa. Commentary On subclasses of ‘opioid’ analgesics // Current Medical Research & Opinion, 2014. – С.1-18.
14. Abel SR. Tramadol: alternative analgesic to traditional opioids and NSAIDs. Journal of Pharmaceutical Care in Pain and Symptom Control 1995; 3: 5.
15. Dr. Margarete. Tramadol – the Impact of its Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties on the Clinical Management of Pain. Fischer-Bosch Institute of Clinical Pharmacology, Stuttgart (Germany) //Arzneim.-Forsch./Drug Res. 53, No. 10, 681–687 (2003).

16. Muna Subedi, Shalini Bajaj, Maushmi S. Kumar, Mayur YC. An overview of tramadol and its usage in pain management and future perspective // *Biomedicine & Pharmacotherapy* 111 (2019) 443–451.
17. Stefan Grond and Armin Sablotzki. Clinical Pharmacology of Tramadol. Department of Anesthesia, Martin-Luther-University, Halle-Wittenberg, Germany // *Clin Pharmacokinet* 2004; 43 (13): 879-923.
18. Dayer P, Desmeules J, Collart L. Pharmacology of tramadol. *Drugs* 1997; 53 (Suppl 2):18-24.
19. Robert Smyj, Xiao-Ping Wang, Feixue Han Apotex Tramadol Hydrochloride. Apotex Inc., Toronto, Ontario, Canada // *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology*, Volume 38. – С.463-494.
20. Costa I, Oliveira A, Guedes de Pinho P, Teixeira H, Moreira R, Carvalho F, et al. Postmortem redistribution of tramadol and O-desmethyltramadol. *J Anal Toxicol*. 2013;37(9):670–5.
21. Lehmann KA. Tramadol in the management of acute pain. *Drugs* 1994; 47 (Suppl 1):19-32.
22. Харкевич Д.А., Фармакология: Учебник. — 9-е изд., перераб., доп. и испр. — М.: ГЭОТАР Медиа, 2006. — 736 с.
23. Аляутдин Р.Н., Фармакология: Учебник - 2-ое издание., испр. - М.: ГЭОТАР Медиа, 2004. — 736 с. – 592 с.
24. Vamigbade TA, Langford RM. The clinical use of tramadol hydrochloride. *Pain Reviews* 1998; 5:155-182.
25. Arbuck D. Management of Opioid Tolerability and Adverse Effects // *J. Med.* –2010. – Vol. 3, № 1. – P. 1–10.
26. С.М. Дроговоз. Фармакология на ладонях. 110 с.
27. О.А. Пылаева, К.В. Воронкова. Наркомания и эпилепсия (обзор литературы)// *Вестник эпилептологии* № 2, 2008 г. – С. 11-22.
28. Иракова М.Е., Павлова З.Б., Брюзгин ВВ. Опиоидный анальгетик центрального действия трамадола гидрохлорид (трамадол) при лечении хронической боли у онкологических больных. // *Современная онкология. Клиническая онкология.* - 2005. - №7. - С. 12-19.
29. E. A. Shipton. Tramadol—Present and Future // *Anaesth Intensive Care* 2000; 28: 363-374.
30. T. Matthiesen , T. Wo'hrmann , T.P. Coogan , H. Uragg .The experimental toxicology of tramadol: an overview // *Toxicology Letters* 95 (1998). - С. 63–71.
31. Fatal intoxication due to tramadol alone Case report and review of the literature Koen De Decker, Jan Cordonnier, Werner Jacobs, Vera Coucke, Paul Schepens, Philippe G. Jorens // *Forensic Science International* 175 (2008). – С. 79–82.

32. Margareeta Ha`kkinen, Terhi Launiainen, Erkki Vuori, Ilkka Ojanpera. Comparison of fatal poisonings by prescription opioids // Volume 222, Issues 1–3, 2012. – С. 327-331.
33. Micaela Tjäderborn, Anna K Jönsson, Staffan Hägg, Johan Ahlner. Fatal unintentional intoxications with tramadol during 1995–2005 // Forensic Science International 173 (2007). – С.107–111.
34. Sohyun Jeong, Ha Jin Tchoe, Junqing Li, Ju Young Shin. All-Cause Mortality Associated with Tramadol Use: A Case Crossover Study// Drug Safet, 2019.
35. Сиволап Ю.П., Савченко В.А. Злоупотребление опиоидами и опиоидная зависимость. – М.: Медицина ,2005. - 304 с.
36. S Shadnia, K Soltaninejad, K Heydari, G Sasanian and M Abdollahi Tramadol intoxication: a review of 114 cases. // Human & Experimental Toxicology (2008) 27: 201–205.
37. Haoran Zhang and Zhimin Liu. The Investigation of Tramadol Dependence with No History of Substance Abuse: A Cross-Sectional Survey of Spontaneously Reported Cases in Guangzhou City, China // Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume 2013, 6 pages.
38. Рекомендуемые методы анализа опия, морфина и героина. Руководство для национальных лабораторий экспертизы наркотиков // ООН, Нью-Йорк, 1998.
39. Aysel Küçük, Yücel Kadiog`lu. Determination of tramadol hydrochloride in ampoule dosage forms by using UV spectrophotometric and HPLC-DAD methods in methanol and water media. // II Farmaco 60 (2005) 163–169.
40. Кормишин В.А., Воронин А.В., Воронина Т.В., Шаталаев И.Ф. Денситометрический анализ опиатов в судебно-химической экспертизе. // Сорбционные и хроматографические процессы. 2013. Т. 13. Вып. 1. – С.32-3
41. В. А. Залесова, С. С. Катаев, Л. И. Курдина. К обнаружению трамадола в моче методом тонкослойной хроматографии. // Вопросы наркологии, 1998, №2, С. 53-56.
42. А.В. Воронин, И.Ф.Шаталаев, Т.В. Воеводина, П.П. Пурыгин.Идентификация морфина и кодеина методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии в химико-токсикологических исследованиях. // Вестник СамГУ — Естественнонаучная серия. 2007. №6(56). – С.385-391.
43. А. Б. Мелентьев, Д.Г. Ким. Идентификация метаболитов трамадола в виде их ацетилированных производных методом газовой хроматографии с масс селективным детектором // Известия Челябинского научного центра, вып. 1 (18), 2003. – С 98-103.
44. С.С. Барсегян, Е.А. Пурвина, д.фарм.н., Проф. Е.М. Саломатин , эксп. Т.А. Свиридова, эксп. Т.Н. Федорова. Определение морфина и кодеина при судебно-химических исследованиях с применением одноквадрупольного масс-

селективного детектора, сопряженного с ВЭЖХ-системой. // Судебно-медицинская экспертиза, 6, 2012. - С.33-37.

45. М.С. Саркисян, Д.С. Лазарян. Разработка методики идентификации и количественного определения нефопама и трамадола с помощью вэжх и ее валидация // Вестник РУДН, серия Медицина, 2009, № 4. – С. 205-208.

46. В.В. Зимнухов, И.Д. Донская. К вопросу изолирования морфина из трупного материала // Проблемы судебной медицины, экспертизы и права, выпуск 2. – С.41-43.

47. Зимнухов В.В., Кисвянцева Н.М., Никитенко В.Ф., Шандыба О.А. Определение кодеина в биологическом материале // Судебно-медицинская экспертиза. — М., 1976 — №4. — С. 34-36.

48. К. С. Заикин, Галина Владиславовна Раменская, А. П. Арзамасцев. Фармакокинетика, фармакодинамика и анализ морфина и трамадола // Химико-фармацевтический журнал, том 44, № 2 (2010). – С. 3-7.

49. Elijah Trefts, Maureen Gannon, David H. Wasserman. The liver // Current Biology 27, R1141–R1155, 2017.

50. Еремин С.К. Анализ наркотических средств: руководство по химико-токсикологическому анализу наркотических и других одурманивающих веществ / С.К. Еремин, Б.Н. Изотов, Н.В. Веселовская. – М.: Мысль, 1993.

51. Химико-токсикологический анализ веществ, вызывающих одурманивание: методические указания. – М.: МЗ СССР, 1989.

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

53. Р.У. Хабриев, Н.И. Каледина. Токсикологическая химия. Аналитическая токсикология: учебник / М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 752 с.

54. Швайкова М.Д. Токсикологическая химия. - М.: Медицина, 1975. - 376 с.

55. Huba Kalász, Mária Báthori, Klára L. Valkó. Basis and pharmaceutical applications of thin-layer chromatography. // Separation Methods in Drug Synthesis and Purification, 2020.- С.523-583.

56. Шаршунова М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии/М.Шаршунова, В.Шварц, Ч.Михалец. – М.:Мир, 1980.-295 с.

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

58. С. Н. Борисевич. Методы лабораторной диагностики острых отравлений: учеб. -метод. пособие / Минск: БГМУ, 2010. – 64 с.

59. Дегтерев, Е.В. Применение ТСХ в анализе наркотических и сильнодействующих веществ / Е.В, Дегтерев, А.В. Гаевский, Е.А. Зенкова // Химико-фармацевтический журнал. - 1998. — №8. —С. 48-54.

60. Евстигнеева В.П., Шкутина И.В., Брежнева Т.А., Сливкин А.И., Селеменев В.Ф. Химико -токсикологический анализ на группу веществ, изолируемых экстракцией и сорбцией. Наркотические и другие одурманивающие средства. Учебно-методическое пособие. 2004. – С. 26-27.
61. Colin F. Poole. Thin-layer chromatography: challenges and opportunities // Journal of Chromatography A, 1000 (2003) 963–984.
62. Scott Strobel. Thin Layer Chromatography Marina Santiago // Methods in Enzymology, Volume 533(2013). -С.303-324.
63. Т.В. Плетенева. Токсикологическая химия: Учебник для вузов /М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. — 512 с.
64. Арыстанова Т.А. Фармацевтическая химия/Учебное пособие. - Алматы: Эверо. -2013. -238с.
65. Кирхнер Ю.Т. Тонкослойная хроматография. -М. Химия, 1981-215с.
66. Государственная фармакопея Республики Казахстан. -Алматы: Издательский дом «Жибек жолы». -2008. -Том 1. - 592с
67. Болотов В.В., Стадниченко Э.И., Бондарь В.С. Методические разработки по теме «Применение УФ- и ИК- спектроскопии, иммунохимических методов анализа при химико-токсикологических исследованиях». - Харьков; УкрФ,1992. -24 с.
68. Арзамасцев А.П. Фармацевтическая химия, 2004 -660 с.
69. Общая фармацевтическая химия, учебное пособие / Т. А. Арыстанова. - Алматы: Эверо, 2021. - 296 с.
70. Байерман К. Определение следовых количеств лекарственных веществ. – М.:Мир, 1987.-429 с.
71. Безуглый П.А., Грудько В.О., Леонова С.Г. Фармацевтический анализ: учеб. пособие для студ. высш. фарм. учеб. завед. 3-4 уровней аккредитации/ Под ред. П.О. Безуглового. -М.: Издательство НФАУ; Золотые страницы. - 2001. - 240 с.
72. Горбачева Н.А., Орлова А.М. применение ТСХ-анализа при судебно-химическом исследовании мочи на опиаты // Судебно-медицинская экспертиза. 2003. № 3. С. 34-38.
73. Беликов химия. В 2-х ч: учебное пособие, 4-е изд., перераб. и доп.-М.: МЕДпресс-информ. -2007. - 624с.
74. Раменская химия: учебник – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний,2015. - 467с.
75. Калетина Н.И. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов: учебное пособие. М.: ГЭОТАР - Медиа;2008. С. 556-634.
76. Карташов В.А. Изучение вопросов экстракции лекарственных веществ из биологического материала: Автореферат дис.д.фарм.н. Барнаул, 1990,25 с.
77. Коренман И.М. Экстракция в анализе органических соединений. М., Химия,1977, 200 с.

78. Изотов Б.Н. Ненаправленный анализ на вещества, изолируемые экстракцией полярными растворителями / Б.Н. Изотов. – М.: Медицина, 1996.
79. Мелентьев А.Б. Влияние рН среды водной фазы на экстракцию веществ с различными кислотно-основными свойствами // Судебно-медицинская экспертиза. -2003. -№2. - С.40-43.
80. Изотов Б.Н., С.К.Еремин. Методы концентрирования и выделения ялов из биологических объектов. // концентрировании следов органических соединений: Сб.научн.тр.-М.,1990. -Т.10. – С. 244-265.
81. Изотов Б.Н., Николаева Э.Г., Козлова И.А. Экстракция органических соединений в модельных системах ткань печени – водные растворы // Суд. мед. эксп. – 1996. – №4 - Р.35-38.
82. Информационное письмо главного судебно-медицинского эксперта по количественному определению органических соединений, выделенных из внутренних органов человека методом Стаса-Отто, Васильевой А.А. и Крамаренко В.Ф.-М.,1991. -16 с.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

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

Учебно-методические рекомендации включены в перечень дополнительной учебной литературы для изучения предмета «Токсикологическая химия».

Авторы: Исенбаева А.М., Шукирбекова А.Б.

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

Эффективность внедрения: Совершенствование знаний студентов по вопросам, касающихся методов обнаружения и определения наркотических веществ в объектах исследования. Разработанные методики обнаружения и количественного определения трамадола, выделенного из биоматериала просты в выполнении, доступны, позволяют правильно диагностировать случаи острого отравления.

Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрение: Внедрить методические рекомендации в учебный процесс по предмету «Токсикологическая химия» для самостоятельной работы студентов Школы фармации НАО КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова, г.Алматы.

Ответственный за внедрение и исполнитель: Исенбаева А.М.

Сроки внедрения: 31 марта 2022 г.

**И.о. зав. кафедры фармацевтической и токсикологической химии,
фармакогнозии и ботаники:**

Жуманова Е.Т.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

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

Учебно-методические рекомендации включены в перечень дополнительной учебной литературы для изучения предмета «Токсикологическая химия».

Авторы: Исенбаева А.М., Шукирбекова А.Б.

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

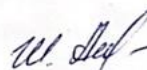
Эффективность внедрения: Совершенствование знаний студентов по вопросам, касающихся методов обнаружения и определения наркотических веществ в объектах исследования. Разработанные методики обнаружения и количественного определения трамадола, выделенного из биоматериала просты в выполнении, доступны, позволяют правильно диагностировать случаи острого отравления.

Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрение: Внедрить методические рекомендации в учебный процесс по предмету «Токсикологическая химия» для самостоятельной работы студентов фармацевтического факультета НАО «Медицинский университет Астана», г.Нур-Султан.

Ответственный за внедрение и исполнитель: Исенбаева А.М.

Сроки внедрения: 28 марта 2022 года

Председатель Комитета по обеспечению качества образовательных программ специальности «Фармация» НАО «Медицинский университет Астана», PhD



Ахелова Ш.Л.

