

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ТАШКЕНТСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

На правах рукописи

УДК: 615.074:615.453.2:616.921.5-022.6.

ШАДМАНОВА Дилноза Алишеровна

**ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕСТИЦИДА ЦИПЕРМЕТРИНА**

Специальность: 15.00.02. – фармацевтическая химия и фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Ташкент - 2006

Работа выполнена в Ташкентском фармацевтическом институте
Министерства Здравоохранения Республики Узбекистан

Научный руководитель: кандидат фармацевтических наук
З.А. Юлдашев

Официальные оппоненты: доктор химических наук,
профессор У.М. Азизов

кандидат химических наук,
доцент К.А. Убайдуллаев

Ведущая организация: Главное бюро судебно-медицинской экспертизы
МЗ РУз

Защита состоится «__» июля 2006 года в «___» часов на заседании специализированного совета Д. 087.12.01 при Ташкентском фармацевтическом институте по адресу: 700015, г. Ташкент, проспект Айбека, 45.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ташкентского фармацевтического института.

Автореферат разослан «___» июня 2006 г.

Ученый секретарь
специализированного совета Д. 087.12.01,
доктор фармацевтических наук, профессор

М.А. Таджиев.

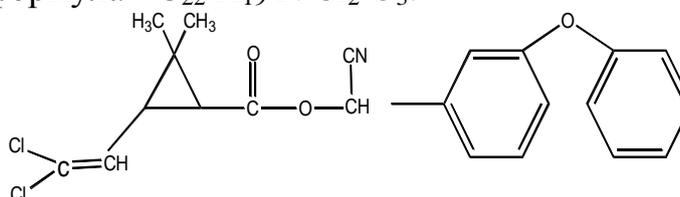
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность темы. В последнее время в сельском хозяйстве для получения высококачественных урожаев широко используются различные химические средства защиты растений. Большую группу химических средств защиты растений представляют пестициды. Наряду с другими химическими средствами защиты растений пестициды из группы синтетических пиретроидов (СП) широко применяются в сельском хозяйстве нашей республики.

СП применяются в более чем в 40 странах мира как высокоэффективные инсектициды и инсекто-акарициды против широкого спектра вредителей растений.

Промышленностью Республики Узбекистан выпускаются некоторые представители этой группы, в том числе и циперметрин. Химическое название циперметрина - (S,R) - α - циано - 3 - феноксibenзил - (1 R, 1 S, цис, транс) - 2, 2 - диметил - 3- (2, 2 - дихлорвинил)-циклопропанкарбоксилат. Он представляет собой желто - бурую, вязкую жидкость со слабым запахом.

Молекулярная формула - $C_{22}H_{19}NCl_2O_3$.



По токсичности циперметрин относится ко второму классу токсических веществ: LD₅₀ для мышей составляет 63 мг/кг, для крыс - 200 – 415 мг/кг.

Высокая токсичность, широкое применение циперметрина, а также нарушение правил техники безопасности могут стать причиной отравления людей и животных. В этих случаях для оказания квалифицированной медицинской помощи пострадавшим людям необходимо установить причину отравления, т.е. идентифицировать отравляющее вещество. Идентификация и количественное определение отравляющих веществ в химико-токсикологическом отношении осуществляются современными, высокочувствительными, селективными и точными методами.

Сведения, представленные в литературе, указывают на то, что циперметрин не был объектом химико-токсикологического исследования. Не разработаны унифицированные и специфичные методы его анализа в биологических объектах. Материалы, отражающие результаты экологического исследования циперметрина в лекарственном растительном сырье и продуктах его переработки, в литературе представлены очень ограниченно, разобщены и не систематизированы.

В приведенных в литературе методиках не учитывается влияние различных факторов на результаты исследований. Отсутствуют данные о распределении, накоплении циперметрина в живом организме при острых отравлениях. Не установлены сроки сохранения его в биологических объектах.

Учитывая вышесказанное, разработка и усовершенствование методик выделения циперметрина из биологических объектов, в том числе из лекарственного растительного сырья, и анализа его в полученных вытяжках

является актуальной проблемой химико-токсикологических и экологических исследований.

Степень изученности проблемы. Диссертационная работа является первым законченным научным исследованием, посвященным анализу циперметрина в химико-токсикологическом и экологическом отношении.

Связь диссертационной работы с тематическими планами НИР. Диссертационная работа выполнена согласно тематическому плану научно-исследовательских работ кафедры токсикологической химии Ташкентского фармацевтического института.

Цель исследований. Целью настоящей работы является химико-токсикологическое и экологическое исследование циперметрина в биологических жидкостях и объектах животного происхождения, лекарственном растительном сырье и продуктах его переработки.

Задачи исследований. Для реализации поставленной цели необходимо решение следующих задач:

- усовершенствование существующих и разработка новых оптимальных условий анализа циперметрина;
- изучение и разработка оптимальных условий экстракции циперметрина из крови, мочи, водных сред, промывных вод желудка и внутренних органов лабораторных животных;
- установление пригодности разработанных методик анализа при определении циперметрина, выделенного из выше названных объектов;
- изучение распределения и накопления циперметрина во внутренних органах лабораторных животных при острых отравлениях;
- изучение сохраняемости циперметрина в биологических объектах животного и растительного происхождения, факторов влияющих на этот процесс;
- разработка методик выделения и определения циперметрина из лекарственного растительного сырья и полученных из него лекарственных форм;
- подготовка методических рекомендаций для внедрения в практику судебно-химических отделов Главного и областных бюро судебно-медицинских экспертиз МЗ РУз, а также лабораторий, занимающихся контролем качества и сертификацией лекарственных средств.

Научная новизна. Усовершенствованы существующие и разработаны новые оптимальные условия анализа остаточных количеств циперметрина методами хроматографии и УФ-спектрофотометрии. Разработанные методики анализа были апробированы при определении остаточных количеств циперметрина, выделенного из химико-токсикологических и экологических объектов.

Впервые изучены условия выделения циперметрина из водных сред, крови, мочи и внутренних органов лабораторных животных, а также из лекарственного растительного сырья. Разработаны методики выделения и определения циперметрина в биологических жидкостях при острых отравлениях людей. Разработанные методики позволяют в кратчайшее время

идентифицировать пестицид и определить его содержания, что способствует оказанию своевременной медицинской помощи отравленным людям.

Впервые изучено, в химико-токсикологическом отношении, распределение, накопление и сохраняемость циперметрина во внутренних органах лабораторных животных, влияние на этот процесс различных факторов. Установлены сроки сохранения остаточных количеств циперметрина в лекарственных растениях.

Усовершенствованы методики определения остаточных количеств пестицида в лекарственных растениях, при выращивании которых был использован циперметрин, и полученных из их сырья лекарственных форм.

Направление исследований. Основным направлением исследований является разработка оптимальных современных и высокочувствительных методик анализа циперметрина, позволяющих определить его в химико-токсикологических и экологических объектах.

Достоверность и обоснованность. Достоверность результатов экспериментальных данных обеспечивается проверкой метрологических характеристик и проведением валидаций разработанных методик анализа. Обоснованность результатов основывается на согласованности данных эксперимента и научных выводов

Положения, выносимые на защиту. На защиту выносятся:

- разработанные условия качественного и количественного определения циперметрина современными высокоэффективными методами анализа;
- результаты исследований по разработке методик экстракции циперметрина из водной среды, биологических объектов, лекарственного растительного сырья и продуктов его переработки;
- результаты изучения распределения, накопления и сохраняемости циперметрина во внутренних органах лабораторных животных;
- результаты исследования сохраняемости остаточных количеств циперметрина в биологических объектах и лекарственных растениях.

Научно и практические значения результатов исследований. Разработаны, практически обоснованы и апробированы методики анализа остаточных количеств циперметрина в различных объектах. Разработаны оптимальные условия экстракции циперметрина из водных сред, биологических жидкостей и объектов, изучены факторы влияющие на этот процесс. Разработаны методики экологического исследования лекарственного растительного сырья и полученных из него лекарственных форм на содержания циперметрина. Установлены сроки сохранения циперметрина в биологических объектах. Разработанные методики легли в основу методических рекомендации по определению циперметрина в водной среде и биологических жидкостях при острых отравлениях. Методики по выделению и определению остаточных количеств циперметрина из лекарственного растительного сырья легли в основу методических рекомендаций.

Реализация результатов. Разработанные методические рекомендации по определению циперметрина в водной среде и биологических жидкостях

внедрены в практику судебно-химических отделов бюро судебно-медицинской экспертизы республики и областей.

Разработанные методики анализа остаточных количеств циперметрина в лекарственном растительном сырье методом ВЭЖХ рекомендованы для внедрения в практику лабораторий, занимающихся контролем качества и стандартизацией лекарственных средств, а также в учебный процесс кафедры токсикологической химии Ташкентского фармацевтического института.

Апробация работы. Основные фрагменты диссертационной работы доложены и обсуждены на научно-практической конференции «Интеграция образования, науки и производства в фармации», посвященной 65-летию Ташкентского фармацевтического института (Ташкент, 23-24 октября 2002 г.); научной конференции «Биоактивные вещества, синтез, изучение и применение», посвященной 90-летию со дня рождения проф. М.А. Азизова (Ташкент, 1-2 мая 2003 г.); Славяно-Балтийской научной конференции «Санкт-Петербург Гастро - 2003» (Санкт-Петербург, 10-12 сентября 2003 г.); I съезде фармацевтов Кыргызской Республики «Актуальные проблемы и перспективы развития фармации» (Бишкек, 12-15 декабря 2003 г.), а также на научных семинарах Ташкентского фармацевтического института (протокол № 1 от 17 мая 2006 г.), Главного Управления по контролю качества лекарственных средств и медицинской техники МЗ РУз (протокол № 1 от 31 мая 2006 г.).

Опубликованность результатов. По теме диссертации опубликовано 9 работ (3 научные статьи, 4 тезиса докладов и 2 методические рекомендации).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 110 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 11 рисунками и 24 таблицами; состоит из введения, обзора литературы, четырех глав экспериментальной части, общих выводов и списка литературы. Библиографический указатель включает 105 источников литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении отражены актуальность, научная новизна, научная и практическая значимость работы, цель и задачи исследований, сведения об апробации работы и положения, выносимые на защиту.

В первой главе приведены сведения о применении пестицидов в народном хозяйстве, отрицательном влиянии на окружающую среду и физико-химических свойствах циперметрина, приведены данные о его широком применении в сельском хозяйстве. Отмечены случаи острых и хронических отравлений людей некоторыми пестицидами. Критически изучены существующие методики выделения и анализа пестицидов из объектов окружающей среды. Показано что, представленные в литературе методики анализа циперметрина в различных объектах не систематизированы и разобщены, в них не учтено влияние некоторых факторов на селективность, чувствительность, воспроизводимость и повторяемость методики. Отмечено отсутствие сведений о методиках определения остаточных количеств циперметрина в таких лекарственных растениях, как стевия ребо и ромашка аптечная. Исходя из изложенного, было сделано заключение о необходимости

разработки чувствительных, селективных и точных методик анализа циперметрина с помощью современных методов в вышеупомянутых объектах.

Во второй главе приведены результаты разработки условий качественного обнаружения и количественного определения циперметрина с помощью методов ТСХ, ГЖХ, ГХ-МС, ВЭЖХ, УФ-спектрофотометрии.

Разработаны новые оптимальные условия обнаружения циперметрина методом ТСХ, которые позволяют достоверно идентифицировать пестицид. Хроматографический анализ был проведен на пластинках с закрепленным слоем силикагеля (марки LC 5/40, содержащей 13% гипса). В качестве проявителей зон локализации циперметрина были апробированы различные реактивы. Удовлетворительные результаты были получены при использовании реактивов $ClZnI$ (на коричневом фоне черное пятно) и Драгендорфа, модифицированного по Мунье (на желто – оранжевом фоне красно – оранжевое пятно). При этом определена чувствительность использованных реактивов. Предел обнаружения пестицида с помощью реактивов Драгендорфа, модифицированного по Мунье, и $ClZnI$ составил соответственно 2 и 1,5 мкг в пробе.

Параллельно был проведен выбор систем растворителей для хроматографирования циперметрина в тонком слое сорбента. Наиболее оптимальной системой растворителей для разделения циперметрина являются смеси: гексан - ацетон (5:1), хлороформ - метанол (17,5:2,5), гексан - этилацетат (3:1), при использовании которых значения R_f циперметрина составили 0,44; 0,58 и 0,61 соответственно.

Для определения специфичности разработанных условий хроматографирования был проведен ряд хроматографических определений. В идентичных условиях определены значения R_f и окраска пятен более 20 пестицидов, имеющих химико-токсикологическое значение. Полученные значения R_f , окраска и форма образовавшихся пятен других пестицидов отличались от результатов хроматографирования циперметрина.

ТСХ является одним из наиболее простых, быстрых, доступных и удобных в выполнении аналитических методов. Однако, для определения пестицида в очень малых количествах требуются более чувствительные методы анализа. Исходя из этого, были разработаны методики анализа циперметрина методами ГЖХ, ВЭЖХ и ГХ-МС.

Для определения остаточных количеств циперметрина методом ГЖХ выбраны следующие условия хроматографирования: хроматограф "Chrom 5" (Laboratorni Pstroje Praha), стеклянная колонка размером 130 x 0,2 см, заполненная носителем хроматон N-AW-DMCS (размер зерен 0,160 – 0,200 мм), на поверхность которого нанесена неподвижная жидкая фаза SE-30 в количестве 5%; газ-носитель - азот, скорость расхода - 30 мл/мин; для пламенно-ионизационного детектора использованы водород и воздух, скорость потоков которых составила 30 и 400 мл/мин; температура детектора - 260 °C; инжектора (дозатор) - 250 °C. Температура термостата колонки запрограммирована от 180 до 220 °C со скоростью 10 °C/мин и от 220 до 245 °C со скоростью 3 °C/мин. Чувствительность детектора - 16×10^9 А; чувствительность

самописца - 20mV; скорость диаграммной ленты - 0,3см/мин; объем вводимой пробы - 2,0 мкл; продолжительность анализа - 15 мин. Хроматограмма, полученная в этих условиях представлена на рис 1.

Как видно из хроматограммы, время удерживание циперметрина составило 8,39 мин. На основании хроматограммы определены также число теоретических тарелок (N), высота эквивалентной теоретической тарелки (H), линейно-динамический диапазон, а также чувствительность методики (таблица 1).

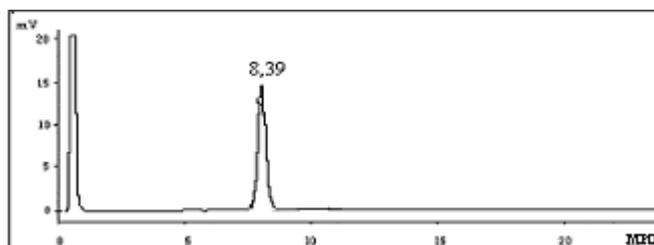


Рис.1. Хроматограмма раствора стандартного образца циперметрина, полученная методом ГЖХ

Таблица 1
Хроматографические параметры циперметрина в разработанных условиях ГЖХ анализа

Время удерживания, мин	N	H, см	Линейно-динамический диапазон, мкг	Чувствительность, мкг
8,39	936	0,16	0,2-1,2	0,2

Результаты, представленные в таблице 1, показывают, что значения N и H, могут служить для идентификации пестицида методом ГЖХ.

Была проведена валидация разработанных условий анализа. В результате определены точность и воспроизводимость методики. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2
Результаты определения точности и воспроизводимости разработанных условий ГЖХ анализа циперметрина*

Определено, мкг	Время удерживание, мин	Статистическая обработка полученных результатов
0,99	8,37	f=4; T(95%,4)=2,78 X _{ср} =1,00; S ² =0,0003; S=0,0158; S _x =0,0071; ΔX=3,108; Δ X _{ср} =1,39 E=4,39%; ε=1,96%
1,02	8,42	
1,01	8,39	
0,98	8,40	
1,00	8,38	

* - концентрация циперметрина 0,5 мкг/мл, содержащие пестицида в каждом образце по 1,0 мкг.

Результаты, представленные в таблице 2, показывают, что разработанная методика воспроизводима, относительная погрешность анализа составляет не более 1,96 %.

Была изучена также селективность разработанных условий анализа путем введения в хроматограф растворов стандартных образцов различных пестицидов, разрешенных к применению в сельском хозяйстве республики.

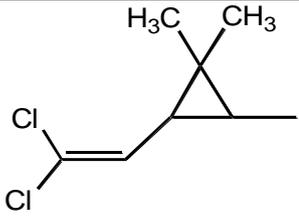
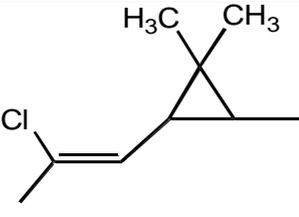
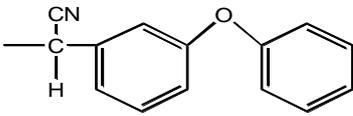
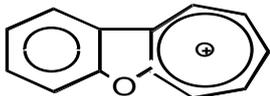
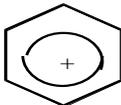
Результаты показали, что в разработанных условиях анализа другие пестициды не мешают определению циперметрина.

Разработана методика определения остаточных количеств циперметрина методом ГХ-МС на приборе HP GC/MS 6890 фирмы Hewlett-Packard. В результате проведенных исследований рекомендованы следующие условия анализа циперметрина: металлическая капиллярная колонка размером 30 м x 0,25 мм, внутренняя поверхность которой покрыта 5% метилфенилсилоксаном. Температура инжектора - 280⁰С; температуру термостата колонки программирована от 150 до 280 ⁰С со скоростью 15⁰С/мин; газ носитель – гелий, скорость его составляла 3,2 мл/мин. Энергия ионизации на масс-спектре - 70 эВ; объем вводимой пробы 1 мкл; продолжительность анализа - 15 мин.

В результате проведенных исследований установлены чувствительность и линейно - динамический диапазон анализа. Также определены основные пути распада молекулы циперметрина, которые позволяют прогнозировать метаболизм пестицида (таблица 3).

Таблица 3

Фрагментные ионы циперметрина и соответствующие им m/z

Структура иона	m/z	Интенсивность, %
	163 ⁺	100,00
	127 ⁺	73,68
	209 ⁺	15,78
	181 ⁺	80,26
	77 ⁺	67,10
C ₄ H ₃	51 ⁺	78,68

Разработана методика определения остаточных количеств циперметрина методом ВЭЖХ.

Хроматографический анализ проведен на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent Technologies 1100 Series с программным обеспечением «Chemstation A.09.03», снабженным четырехканальным градиентным насосом и дегазатором. В работе использован детектор типа UV/VIS с переменной длиной волны 190-600 нм и колонка, наполненная обращенно-фазным сорбентом марки Zorbax Eclipse XDB C-18, размером частиц 3,5 мкм. Размер колонки 150 x 3 мм. Циперметрин детектирован при 279 нм. В качестве подвижной фазы была использована смесь – 10 mM раствора KH_2PO_4 (pH=3) (раствор А) и ацетонитрила (раствор Б). Элюирование проведено в градиентном режиме: 0 мин: А – 80%, Б – 20%; 7-20 мин: А – 25%, Б – 75%; 24 мин А – 80%, Б – 20%, скорость потока подвижной фазы - 0,5 мл/мин. Объем вводимой пробы 20 мкл. Продолжительность анализа – 24 мин.

В этих условиях время удерживания изомеров циперметрина в стандартном образце составляет 18,5; 19,1 и 19,5 мин. Хроматограмма, полученная в этих условиях, представлена на рис.3.

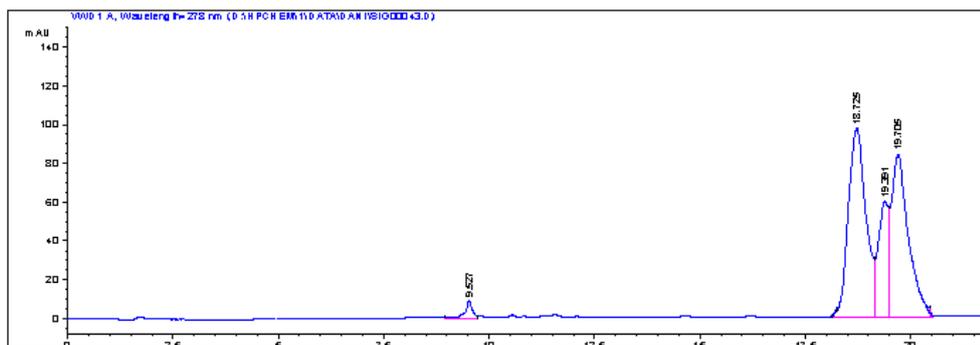


Рис.3. Хроматограмма раствора стандартного образца циперметрина, полученная методом ВЭЖХ

Проведена валидация разработанных условий анализа. В таблице 4 приведены результаты изучения точности и воспроизводимости разработанных условий анализа циперметрина.

Таблица 4

Результаты изучения точности разработанных условий анализа циперметрина*

Определено, мкг	Статистическая обработка полученных результатов
0,98 0,98 1,00 0,99 1,00	$f=4$; $T(95\%, 4)=2,78$ $X_{cp}=0,99$; $S^2=0,0001$; $S=0,0100$; $S_x=0,0045$; $\Delta X=3,076$; $\Delta X_{cp}=1,37$ $E=2,80\%$; $\varepsilon=1,25\%$

* - концентрация раствора 0,05 мкг/мкл, содержание циперметрина в каждом образце 1,0 мкг.

Чувствительность методики составляет 0,1 мкг, линейно-динамический диапазон - 0,1-10 мкг. Разработанные условия являются селективными для определения циперметрина.

УФ – спектрофотометрический анализ проведен на спектрофотометре Beckman DU-65. На основании полученного УФ-спектра установлено, что изомеры циперметрина имеют один максимум поглощения при 279 нм. Были рассчитаны удельные и молярные показатели поглощения гексанового раствора циперметрина в данных условиях, которые составили 82,22 и 3420,35, соответственно. В ходе экспериментов установлено, что предел обнаружения циперметрина методом УФ – спектрофотометрии составляет 10 мкг/мл. Для разработки количественного анализа циперметрина методом УФ–спектрофотометрии был построен калибровочный график зависимости оптических плотностей от концентрации стандартного раствора циперметрина в гексане.

В третьей главе представлены экспериментальные данные по разработке методики экстракции циперметрина из водной среды и биологических жидкостей.

Разработана методика экстракции циперметрина из водной среды и изучено влияние на этот процесс природы растворителя, рН среды, электролита и степени экстракции.

В результате исследований было установлено, что циперметрин максимально экстрагируется из водной среды хлороформом в слабощелочной среде при значении рН 9 (таблица 5).

Таблица 5

Влияние природы растворителя и значений рН среды на экстракцию циперметрина из водной среды*

Значения рН среды	Органический растворитель							
	хлороформ		этилацетат		толуол		гексан	
	экстрагировано							
	мкг	%	мкг	%	мкг	%	мкг	%
1,68	39,8	39,8	28,3	28,3	36,8	36,8	14,7	14,7
3,56	52,5	52,5	45,6	45,6	37,7	37,7	23,6	23,6
4,01	62,7	62,7	56,6	56,6	40,6	40,6	25,9	25,9
6,86	66,8	66,8	62,1	62,1	48,6	48,6	28,3	28,3
9,18	80,4	80,4	72,4	72,4	63,9	63,9	47,3	47,3
12,45	68,1	68,1	54,3	54,3	72,9	72,9	42,7	42,7

*- В каждую пробу бкло добавлено по 100,0 мкг циперметрина

Данные, представленные в таблице 5, свидетельствуют, о том, что циперметрин из водной среды при однократной экстракции хлороформом выделяется до 80,4%.

Проведены исследования по изучению влияния электролита и кратности экстракции на выделение циперметрина из водной среды. В присутствии

насыщенного раствора натрия хлорида и при трехкратной экстракции циперметрин экстрагируется из водной среды в количестве 87,6 %.

Разработанные условия экстрагирования циперметрина из водной среды были использованы для выделения пестицида из биологических жидкостей (таблица 6).

Таблица 6

Результаты экстрагирования циперметрина из крови и мочи*

Выделено		Метрологические характеристики
мкг	%	
кровь		
80,3	80,3	f=4; T(95%,4)=2,78 X _{ср} =79,50; S ² =0,4250; S=0,6519; S _x =0,2915; ΔX=1,8123; Δ X _{ср} =0,8105 E=2,27%; ε=1,01%
79,4	79,4	
78,7	78,7	
80,0	80,0	
79,1	79,1	
моча		
74,8	74,8	f=4; T(95%,4)=2,78 X _{ср} =75,66; S ² =0,353; S=0,5941; S _x =0,2657; ΔX=1,6515; ΔX _{ср} =0,7386 E=2,18%; ε=0,97%
75,7	75,7	
76,3	76,3	
76,1	76,1	
75,4	75,4	

*- В каждую пробу было добавлено по 100,0 мкг циперметрина

Представленные в таблице 6 результаты показывают, что циперметрин экстрагируется из крови и мочи в количестве 79,50 и 75,66% соответственно.

В четвертой главе представлены результаты изучения условий выделения циперметрина из различных объектов (лекарственное растительное сырье, продукты его переработки, биологические объекты).

Разработка методов выделения циперметрина из биологических объектов проведена на модельных смесях. Для этого поступали следующим образом: к навеске мелко измельченного объекта (10 г) добавляли 400 мкг циперметрина и оставляли при комнатной температуре до следующего дня. Затем добавили очищенную воду до получения кашицеобразной массы и доводили рН смеси 0,1 М раствором натрия гидроксида до 9,0-9,5. Затем к этой смеси добавляли 15 мл хлороформа и 5 мл насыщенного раствора натрия хлорида, смесь встряхивали в течение часа. Органический слой отделяли, объект еще два раза настаивали хлороформом по 15 мл. Отделенные хлороформные фракции объединяли и фильтровали через фильтр, содержащий безводный натрий сульфат, в круглодонную колбу. Из фильтрата органический растворитель отгоняли до 0,5 мл на роторно-вакуумном испарителе при 40⁰С. Оставшийся после отгона растворителя экстракт переносили в фарфоровую чашку, колбу промывали два раза 1-2 мл хлороформа и присоединяли к первому экстракту. Объединенные экстракты упаривали досуха в потоке воздуха. Полученный при этом сухой остаток растворяли в 1,0 мл гексана. Количество изолированного циперметрина определяли методом ГЖХ. Результаты эксперимента представлены в таблице 7.

Приведенные в таблице 7 результаты показывают, что циперметрин из биологического объекта изолируется в количестве 50,54 %.

Таблица 7

Результаты изолирования циперметрина из биологического объекта*

найдено		Статистическая обработка результатов
мкг	%	
198,0	49,50	$f=4$; $T(95\%, 4)=2,78$; $X_{cp}=50,54$; $S^2=1,2527$; $S=1,1193$; $S_x=0,5005$; $\Delta X=3,1115$; $X_{cp}=1,3915$; $E=6,15\%$; $\varepsilon=2,75\%$
197,1	49,25	
206,0	51,50	
203,0	50,75	
206,7	51,68	

* - к каждой навеске объекта добавлено по 400,0 мкг циперметрина

Экспериментальные работы по изучению распределения и накопления циперметрина в организме лабораторных животных проводили следующим образом: кроликам массой 2,7 и 3,3 г с помощью зонда вводили в желудок раствор препарата в растительном масле в дозе 600 мг/кг. Через 20-30 мин у животных появлялась симптомы отравления, описанные в литературе. Через 3 часа кролики погибали. Из трупов лабораторных животных были взяты внутренние органы для исследования. При этом каждый орган исследовали по отдельности на содержание циперметрина. Выделение и анализ циперметрина проводили по разработанной методике. В результате проведенных исследований установлено, что наибольшее количество пестицида определяется в желудочно-кишечном тракте, крови и относительно небольшом количестве - печени. Полученные данные указывают на то, что при острых отравлениях циперметрином для исследования в судебно-медицинскую экспертизу необходимо направлять отдельные фрагменты желудочно-кишечного тракта с содержимым, кровь и печень.

Также были изучены условия выделения циперметрина из лекарственных растений – стевии ребо и ромашки аптечной. По 10 г растительного сырья помещали в коническую колбу вместимостью 250 мл, добавляли 50 мкг пестицида и оставляли при комнатной температуре в течение 3-4 час. Затем в колбу вносили 50 мл ацетонитрила и взбалтывали в аппарате для встряхивания жидкостей в течение 30 мин. Органический слой отделяли и переносили в делительную воронку вместимостью 500 мл. Навеску сырья ещё дважды обрабатывали 30 мл ацетонитрила в течение 10 мин. Полученные экстракты объединяли. Для удаления балластных веществ из экстракта его обрабатывали 3 раза петролейным эфиром (30, 20, 20 мл). Ацетонитрил отделяли от петролейного эфира и последний отбрасывали. К ацетонитрильной вытяжке добавляли 50 мл воды и 10 мл насыщенного раствора натрия хлорида. К этой смеси добавляли 50 мл гексана, энергично взбалтывали в течение 10 мин и оставляли для разделения фаз. Верхний гексановый слой фильтровали через бумажный фильтр, содержащий 5 г безводного натрия сульфата. Фильтрат переносили в круглодонную колбу вместимостью 250 мл. Экстрагирование ацетонитрильного раствора гексаном повторяли еще 2 раза. Гексановые

экстракты объединяли, органический растворитель отгоняли на роторно-вакуумном испарителе при 40⁰С до объема 1-2 мл. Оставшийся после отгона растворителя экстракт количественно переносили в фарфоровую чашку, колбу промывали два раза 1-2 мл гексана и присоединяли к первоначальному экстракту. Объединенные экстракты упаривали досуха в потоке воздуха. Полученный сухой остаток растворяли в 1 мл ацетонитрила. Перед введением аликвоты в хроматограф раствор фильтровали через фильтр «Миллипор» с размером пор 0,45 мкм. Количественное содержание циперметрина определяли методом ВЭЖХ. Полученные результаты приведены в таблицах 8 и 9.

Результаты, представленные в таблицах 8 и 9, показывают, что с помощью разработанной методики, циперметрин экстрагируется из сырья стевии ребо и ромашки аптечной в количестве 61,99 и 81,45% соответственно.

Таблица 8

Результаты экстрагирования циперметрина из стевии ребо*

найдено		Статистическая обработка результатов
мкг	%	
29,03	58,06	f=4; T (95%, 4)=2,78; X _{ср} =61,99%; S ² =6,3032; S=2,513; S _x =1,112; ΔX=6,979; ΔX _{ср} =1,959 E=12,88%; ε=5,76%
29,45	58,90	
29,93	59,86	
31,38	62,76	
35,20	70,40	

* - к каждой навеска объекта добавлено по 50,0 мкг циперметрина

Таблица 9

Результаты экстрагирования циперметрина из ромашки аптечной*

найдено		Статистическая обработка результатов
мкг	%	
40,05	80,10	f=4; T (95%, 4)=2,78; X _{ср} =81,45%; S ² =4,4001; S=2,0976; S _x =0,9381; ΔX=5,8315; ΔX _{ср} =2,6079 E=7,15%; ε=3,20%
40,48	80,96	
42,41	84,82	
40,96	81,92	
39,73	79,46	

* - к каждой навеска объекта добавлено по 50,0 мкг циперметрина

На следующем этапе были изучены условия изолирования циперметрина из продуктов переработки лекарственного растительного сырья. Для этого из сырья стевии ребо и ромашки аптечной, содержащего известное количество циперметрина, были приготовлены настои по ГФ XI. Из этих настоев циперметрин экстрагировали по методике, представленной в третьей главе. Количественное содержание циперметрина определяли с помощью УФ-спектрофотометрии после предварительной очистки в тонком слое сорбента. В результате проведенных исследований установлено, что циперметрин определяется в настоях из сырья стевии ребо и ромашки аптечной в количестве 39,85 и 62,44% соответственно.

В пятой главе приведены результаты исследования сохраняемости циперметрина в биологических объектах и лекарственных растениях.

Для изучения сохраняемости циперметрина в биологическом объекте поступали следующим образом. В ряд конических колб вносили по 10 г биологического материала, к ним добавляли по 400 мкг циперметрина. Объекты разделили на две группы. В колбы первой группы добавляли 95 % этиловый спирт до покрытия твердых частиц и плотно закрывали крышками. Колбы второй группы также плотно закрывали крышками без внесения этилового спирта. Обе группы оставляли при комнатной температуре. Через 1, 3, 5, 7, 10, 20 и 60 дней из образцов изолировали циперметрин и анализировали по разработанной методике. Полученные результаты показали, что при обычных условиях в биологических объектах сохраняется циперметрин до 25 дней, а при консервации 95% этиловым спиртом - в течение 60 дней.

Экспериментальные работы по изучению сохраняемости циперметрина в лекарственных растениях проводили в естественных и закрытых условиях культивирования. В полевых условиях открытого и закрытого грунта посеvy стевии ребо и ромашки аптечной были обработаны рабочим раствором 25 % к.э. циперметрина. Рабочие растворы из концентрата эмульсии были приготовлены в дозах, соответствующим нормам применения в сельском хозяйстве. После внесения пестицида в различные сроки были получены образцы сырья, которые подвергали анализу по разработанной методике. В результате проведенных исследований установлено, что циперметрин сохраняется в лекарственных растениях в течение 15 дней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Усовершенствованы существующие и разработаны новые методики обнаружения и количественного определения циперметрина методами тонкослойной, газожидкостной, высокоэффективной жидкостной хроматографии, УФ-спектрофотометрии и газ-хромато-масс-спектрофотометрии. Определены чувствительность и специфичность разработанных методик анализа. Установлена пригодность разработанных методик анализа для определения циперметрина, выделенного из различных объектов.
2. Разработаны условия выделения циперметрина из водных растворов и изучено влияние на него различных факторов. Разработаны методики экстрагирования циперметрина из крови и мочи при острых отравлениях пестицидом.
3. Усовершенствованы существующие и разработаны новые методики выделения циперметрина из биологических объектов. Изучены распределение и накопление циперметрина во внутренних органах отравленных лабораторных животных. На основании полученных данных рекомендовано направлять на химико-токсикологическое исследование при острых отравлениях циперметрином отдельные фрагменты желудочно-кишечного тракта с содержимым, печень и кровь.
4. Разработаны условия экстрагирования циперметрина из лекарственного растительного сырья и продуктов его переработки.

5. Изучены сохраняемость циперметрина при гнилостном разложении биологического объекта и влияние этилового спирта, как консерванта, а на этот процесс.

6. На основании результатов изучения сохраняемости циперметрина в ромашке аптечной и стевии ребо рекомендованы оптимальные сроки сбора лекарственного растительного сырья

7. На основании полученных данных были разработаны и внедрены в практику судебно-химических отделов Бюро судебно-медицинской экспертизы МЗ РУз и лабораторий, занимающимся контролем качества и стандартизации лекарственных средств методические рекомендации по определению циперметрина в водной среде и биологических жидкостях, а также определению остаточных количеств пестицида в лекарственном растительном сырье стевии ребо.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. Шодмонова Д.А., Юлдашев З.А. Циперметрин пестицидини такомиллаштирилган ЮҚХ таҳлил усулини яратиш //Тошкент фармацевтика институтининг 65 йиллигига бағишланган «Фармацияда таълим, фан ва ишлаб чиқариш интеграцияси» мавзуидаги илмий амалий анжуман маърузалар тўплами (Тошкент, 23-24 октябрь 2002 й.). – Т., 2002. – Б.146.

2. Шодмонова Д.А., Юлдашев З.О., Бекчанов Х.Н. Доривор ўсимлик хом ашёсидан циперметрин пестицидини ажратиб олиш // Проф. М.А. Азизов таваллудининг 90 йиллигига бағишланган «Биофаол моддалар олиниши, таҳлили ва қўлланилиши» мавзусидаги илмий анжуман маърузалар тўплами. (Тошкент, 1-2 май 2003 й.) – Т., 2003. –Б. 83-84.

3. Шадманова Д.А., Бекчанов Х.Н., Юлдашев З.О. Выделение пестицида циперметрина из промывных вод желудка // Гастроэнтрология Санкт-Петербурга: Науч. Практ. Журн. - 2003. - № 2-3. –С.191.

4. Шадманова Д.А., Юлдашев З.А. Определение циперметрина в биологических жидкостях //Актуальные проблемы и перспективы развития фармации: I съезд фармацевтов Кыргызской Республики.– Бишкек, 2003. – С. 116-118.

5. Шадманова Д.А., Юлдашев З.О., Бекчанов Х.Н. Анализ синтетических пиретроидов в лекарственном растительном сырье стевии методом ВЭЖХ // Farmatsevtika jurnali.-2004.- №2. – С. 41-43.

6. Шадманова Д.А, Бекчанов Х.Н., Юлдашев З.О. Разработка условий анализа пестицида циперметрин методами тонкослойной хроматографии и УФ-спектрофотометрии // Farmatsevtika jurnali.- 2004. - №3.- С.40-42.

7. Шадманова Д.А., Юлдашев З.О., Бекчанов Х.Н. Определение циперметрина и данитола в лекарственном растительном сырье мяты перечной, календулы лекарственной, стевии ребо методом ВЭЖХ: Методические рекомендации. –Т., 2004.-9 с.

8. Шадманова Д.А., Юлдашев З.А., Бекчанов Х.Н. Определение циперметрина в водных средах и биологических жидкостях методами УФ – спектрофотометрии и тонкослойной хроматографии.: Методические рекомендации. –Т., 2004. 8 с.

9. Циперметрин пестицидини газ-суюқлик хроматографияси усулида таҳлил қилиш /Шадманова Д.А., Бекчанов Х.Н., Юлдашев З.А. и др. // Farmatsevtika jurnali.- 2005. - №1. – Б. 18-19.

Фармацевтика фанлари номзоди илмий даражасига талабгор Д.А. Шодмонованинг 15.00.02 – фармацевтик кимё ва фармакогнозия ихтисослиги бўйича “Циперметрин пестицидини кимё-токсикологик ва экологик жиҳатдан тадқиқ қилиш” мавзусидаги диссертациясининг

РЕЗЮМЕ СИ

Калитли сўзлар: циперметрин, пестициднинг қолдиқ миқдорлари, сунъий пиретроид, объектлардан ажратиб олиш, ЮҚХ, ГСХ, ЮССХ, ГХ-МС, УБ-спектрофотометрия, пестицид, биологик объект ва суюқликлар.

Тадқиқот объектлари: Навоий электрокимё ХЖ-ҚҚда ишлаб чиқарилаётган циперметрин сунъий пиретроиди.

Ишнинг мақсади: турли биологик объектлардан, шу жумладан, доривор ўсимлик хом ашёси таркибидан циперметрин пестицидини ажратиб олиш ва таҳлил қилишнинг хусусий ва сезгир услубларини ишлаб чиқиш.

Тадқиқот усули: циперметринни турли объектлардан ажратиб олиш, ЮЎХ, ГСХ, ГХ-МС, ЮССХ, УБ –спектрофотометрия.

Олинган натижалар ва уларнинг янгилиги: пестицидни таҳлил қилишнинг мўътадил хроматографик усуллари ишлаб чиқилди. Олиб борилган тажрибалар асосида таҳлилнинг сезгир ва хусусий услублари ишлаб чиқилди.

Амалий аҳамияти: ишлаб чиқилган услублар биологик суюқликлардан циперметринни ажратиб олиш ва таҳлил қилиш, ҳамда доривор ўсимлик хом ашёсидаги пестицидни қолдиқ миқдорларини аниқлаш бўйича тузилган иккита услубий қўлланмага асос қилиб олинди. Ушбу ишлаб чиқилган услублар Тошкент фармацевтика институти токсикологик кимё кафедраси ўқув жараёнига тадбиқ этилди.

Тадбиқ этиш даражаси ва иқтисодий самарадорлиги: ишлаб чиқилган услубий қўлланмалар ЎзР ССВ суд-тиббиёт экспертизаси Бош Бюроси суд-кимё бўлими, Тошкент вилояти ва шаҳри суд-тиббиёт экспертизасининг суд-кимё бўлимлари, ҳамда “Dori vositalarini standartlash Ilmiy Markazi” МЧЖ лабораторияси амалиётларига тадбиқ этилди. Ишлаб чиқилган услубларни қўллаш циперметрин пестицидини таҳлили бўйича ўтказиладиган изланишларга сарф бўладиган вақт ва бошқа ҳаражатларни қисқартиришга имкон беради.

Қўлланиш соҳаси: фармацевтика саноати, доривор ўсимлик хом ашёси ва унинг қайта ишлаш маҳсулотларини сифатини назорат қилиш, кимё-токсикологик таҳлил ва циперметрин учун назорат қилиш.

РЕЗЮМЕ

диссертации Шадмановой Д.А. на тему: “Химико-токсикологическое и экологическое исследование пестицида циперметрина” на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия

Ключевые слова: циперметрин, остаточные количества пестицидов, синтетический пиретроид, выделение из объектов, ТСХ, ГЖХ, ГХ-МС, ВЭЖХ, УФ- спектрофотометрия, пестицид, биологические жидкости.

Объекты исследования: синтетический пиретроид циперметрин, выпускаемый Навоийским электрохимическим АО-СП.

Цель работы: усовершенствование существующих и разработка новых селективных и чувствительных методик выделения и анализа пестицида циперметрин из различных биологических объектов, в том числе из лекарственного растительного сырья.

Методы исследования: изолирование циперметрина из различных объектов, ТСХ, ГЖХ, ГХ-МС, ВЭЖХ, УФ-спектрофотометрия.

Полученные результаты и их новизна: подобраны оптимальные хроматографические условия для анализа пестицида, выделенного из различных объектов. На основании проведенных экспериментов разработаны чувствительные, селективные методики анализа. Разработанные методики апробированы в опытах на лабораторных животных и в полевых условиях.

Практическая значимость: разработанные методики легли в основу двух методических рекомендации по выделению и анализу циперметрина из биологических жидкостей, а также определению остаточных количеств пестицида в лекарственном растительном сырье. Эти методики внедрены в учебный процесс кафедры токсикологической химии Ташкентского фармацевтического института.

Степень внедрения и экономическая эффективность: разработанные методические рекомендации внедрены в практику судебно-химического отделов Бюро судебно-медицинской экспертизы РУз, Ташкентской области и г. Ташкента, а также ООО “DVSIM”. Применение разработанных методик позволяет сократить рабочее время и затраты для проведения исследований по анализу циперметрина.

Область применения: фармацевтическая промышленность, контроль качества лекарственного растительного сырья, химико-токсикологические исследования, контроль остаточных количеств циперметрина в лекарственных растениях и продуктах их переработки.

RESUME

Thesis of Shadmanova D.A. to subjects: "Chemico-toxicological and ecological study of cypermethrin pesticide " on competition degree candidate of the pharmaceutical sciences on professions 15.00.02 - a Pharmaceutical chemistry and Pharmacognosy.

Key words: cypermethrin, remaining amount pesticides, synthetic pyrethroid, separation from object, TLC, GLC, HPLC, GC-MS, UV-spectrophotometry, biological liquids.

Objects of the study: synthetic pyrethroid cypermethrin, produced in Navoi electrochemical JC-JV ".

Purpose of the work: Development and improvement sensitive methods of the separation and analysis of the pesticides cypermethrin from different objects, including from medicinal vegetable raw material. The Methods study: isolation cypermethrin from different object, TLC, GLC, HPLC, UV-spectrophotometry.

Got results and their novelty: is selected optimum chromatography of the condition for analysis of the pesticides, chosen from different objects. On base called on experiment is designed sensitive methods of the analysis. The Designed methods are approved in experience on laboratory animal and in field condition.

Practical value: Designed methods allow in base two methodical recommendations: methods of the separation and analysis cypermethrin from biological liquids, as well as determination remaining amount pesticides in medicinal vegetable raw material. These methods are enclosed in scholastic process of the study the toxicological chemistry the Tashkent pharmaceutical institute.

Degree of the introduction and cost-performance: designed methodical recommendations are introduced in practical person judicial-chemical division Agency judicial-medical expert operation RUz, Tashkents area and Tashkent, as well as OOO "DVSIM". Using the designed methods allows the reduction of the uptime and expenses for undertaking the study on analysis of the pesticides cypermethrin.

Application: pharmaceutical industry, checking quality medicinal vegetable cheese, chemist-toxicological analysis and checking cypermethrin in medicinal plants and product of its conversion.