

ОБГРУНТУВАННЯ МЕТОДІВ ВИДІЛЕННЯ ЛАМОТРИДЖИНУ З ОБ'ЄКТІВ ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНОГО АНАЛІЗУ

*Мерзлікін С.І., Кучер Т.В.**

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

*ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет

імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

Вступ. Епілепсія – одне з найпоширених захворювань нервової системи з кількістю хворих у світі понад 40 млн осіб. Проведені в розвинених країнах популяційні дослідження свідчать, що даний недуг щорічно виявляється у 40-70 осіб на 100 тис. населення, а показники захворюваності з урахуванням усієї тривалості життя досягають 3%. В Україні сьогодні на обліку перебуває близько 100 тис. пацієнтів з діагнозом на епілепсію, а реальна картина - це 500 тис. з її проявами [2, 4].

Для лікування епілепсії застосовують широку групу протисудомних лікарських засобів, зокрема це похідні кислоти барбітурової, гідантоїну, оксазолідиндіону, сукциніміду, бензодіазепіну, кислоти вальпроєвої та фенілтриазину. Серед них ламотриджин є одним з найпоширених препаратів протисудомної дії [1]. Разом з тим, специфіка фармакотерапії епілепсії полягає у довготривалому лікуванні пацієнтів, іноді протягом всього життя, що обумовлює високу ймовірність створення токсикологічної небезпеки при їх застосуванні, у тому числі гострих отруєнь [3, 6].

Проведений аналіз звітів FDA свідчить, що небезпечним наслідком застосування ламотриджину є у два рази вищий ризик суїцидальних думок і дій (0,4%), у порівнянні з пацієнтами, які отримували плацебо (0,2%): 5 на 1000 випадків. Причинами здійснення суїциду у хворих на епілепсію найчастіше є депресивні стани, які виникають внаслідок ускладнення захворювання, тривалого застосування ламотриджину та наявності залежності (алкогольна, наркотична). У цих випадках високі дози препарату викликають лактоацидоз, мозкову ішемію, порушення координації рухів, тривогу, сонливість, судоми, зупинку серця та дихання [7, 8].

На веб-сайті FDA та у зарубіжних наукових джерелах є повідомлення, що у період з 2005 по 2011 рр. зареєстровано 639 випадків отруєнь ламотриджином. Зокрема, у країнах Європи зареєстровано 133 повідомлення, Північної Америки – 447, Південної Америки – 7, Азії – 44, Африки – 3, Австралії – 4. Найбільша кількість зареєстрованих отруєнь препаратом у США пояснюється доступністю до бази даних FDA та поширеним застосуванням ламотриджину. Високий показник отруєнь у країнах Європи пов'язаний зі «старінням нації», яке обумовлене збільшенням кількості хворих на епілепсію серед пацієнтів похилого віку. Загальна кількість зареєстрованих випадків отруєнь ламотриджином під час лікування становить 518, летальних випадків – 33, з них 13 – внаслідок суїциду та 20 – ненавмисного передозування [5]. За умов встановлення причини кількість зареєстрованих випадків отруєнь препаратом може бути значно більшою, що також стосується і України.

Мета досліджень. Метою досліджень є розробка методів ізолювання ламотриджину з біологічних об'єктів для аналітичної діагностики гострих отруень препаратом.

Методи досліджень.

Методика ізолювання ламотриджину з тканин печінки (нирки) підкисленою водою: 20 г подрібненої свинячої печінки (нирки) поміщають у колбу об'ємом 200 мл, додають 3 мл випробовуваного розчину ламотриджину, одержану суміш ретельно перемішують та залишають на 24 год. Ізолювання ламотриджину з одержаної суміші проводять водою, підкисленою кислотою оксалатною. Одержану суміш заливають дистильованою водою (1:2), підкислюють кислотою оксалатною до рН = 2 - 2,5 за універсальним індикатором та двічі настоюють: 2 год та 1 год при періодичному перемішуванні. Водне вилучення проціджують через подвійний шар марлі, до фільтрату додають 30% розчин натрію гідроксиду до рН = 9 за універсальним індикатором, натрію сульфат до насичення та центрифугують при 5000 об / хв. Центрифугат за допомогою ділильної колби та ділильної лійки екстрагують хлороформом по 15, 10 та 10 мл при рН = 9. Одержані хлороформні екстракти об'єднують, упарюють у потоці теплого повітря до сухого залишку, розчиняють в 10 мл етанолу та досліджують.

Методика ізолювання ламотриджину з тканин печінки (нирки) підкисленим етанолом: 20 г подрібненої свинячої печінки (нирки) поміщають у колбу об'ємом 200 мл, додають 3 мл випробовуваного розчину ламотриджину, одержану суміш ретельно перемішують та залишають на 24 год. Ізолювання ламотриджину з одержаної суміші проводять етанолом, підкисленим кислотою оксалатною. Одержану суміш настоюють тричі по 24 год з 96 % етиловим спиртом, підкисленим кислотою оксалатною до рН = 2,5-3,0 за універсальним індикатором. Отримані вилучення об'єднують та упарюють при температурі 40 °С до густоти сиропу. Далі по краплях додають абсолютний етанол до припинення випадіння осаду. Надосадову рідину упарюють насухо. Залишок розчиняють у 25 мл гарячої води (60°C) і охолоджують до кімнатної температури. Потім додають 30% розчин натрію гідроксиду до рН = 9 за універсальним індикатором та натрію сульфат до насичення. Екстрагування токсиканту проводять тричі хлороформом по 20 мл протягом 5 хвилин за допомогою ділильної колби та ділильної лійки. Хлороформні вилучення об'єднують та центрифугують при 5000 об / хв. Надосадову рідину зливають, фільтрують через паперовий фільтр з безводним натрію сульфатом та випаровують до сухого залишку в потоці теплого повітря. Далі сухий залишок розчиняють в 10 мл етанолу та досліджують.

Методика ізолювання ламотриджину з тканин печінки (нирки) підкисленим ацетонітрилом: 20 г подрібненої свинячої печінки (нирки) поміщають у колбу об'ємом 200 мл, додають 3 мл випробовуваного розчину ламотриджину, одержану суміш ретельно перемішують, витримують протягом 24 год за кімнатної температури, додають 50 мл ацетонітрилу, підкисленого 6 М розчином кислоти хлоридної до рН 2,0-2,5 за універсальним індикатором, настоюють протягом 30 хв при періодичному контролі рН середовища та

фільтрують через фільтр марки «червона стрічка» у колбу об'ємом 100 мл. Операцію настоювання біологічного матеріалу підкисленим ацетонітрилом проводять тричі. Одержані вилучення об'єднують та переносять в колбу об'ємом 1000 мл, що містить 300 мл 2,5 % розчину натрій сульфату. Вміст колби ретельно перемішують, підлужнюють 30% розчином натрію гідроксиду до рН = 9 за універсальним індикатором, фільтрують через фільтр марки «червона стрічка» у ділильну колбу та двічі по 100 мл екстрагують *n*-гексаном по 10 хв з використанням механічного струшувача. Після розшарування вміст колби переносять у ділильну лійку та відділяють органічний шар, який у подальшому не досліджують. Одержані водно-ацетонітрильні вилучення об'єднують, додають 30% розчин натрію гідроксиду до рН = 9 за універсальним індикатором, поміщають у ділильну колбу та тричі по 100 мл екстрагують хлороформом по 10 хв з використанням механічного струшувача. Після розшарування вміст колби переносять у ділильну лійку, органічний шар відділяють, фільтрують через паперовий фільтр з 5,0 г безводного натрій сульфату. Одержані хлороформні екстракти об'єднують, упарюють в потоці теплого повітря до сухого залишку. Далі сухий залишок розчиняють в 10 мл етанолу та досліджують.

Методика ізолювання ламотриджину з біологічних рідин (крові та сечі): модельні суміші крові (сечі) об'ємом по 20 мл залишають на 24 години при температурі навколишнього середовища 18 °С. Через добу у суміш додають 30% розчин натрію гідроксиду до значення рН середовища 9 по універсальному індикатору. Отриману суміш нагрівають на киплячій водяній бані протягом 15 хв. з повітряним холодильником, охолоджують до кімнатної температури, додають натрію сульфат до насичення і екстрагують трикратно хлороформом (по 20 мл) протягом 5 хв. Отримані органічні вилучення об'єднують, фільтрують через паперовий фільтр з безводним натрію сульфатом та випаровують в потоці теплого повітря до сухого залишку. Сухий залишок розчиняють в 10 мл етанолу та досліджують.

Основні результати. На підставі проведених досліджень за екстракцією ламотриджину з водних розчинів здійснено його ізолювання з біологічних об'єктів: печінки, нирки, крові та сечі, де в якості екстрагента токсиканта з водних вилучень було застосовано хлороформ у присутності натрію сульфату, а для очистки вилучень від співекстрактивних речовин – гексан.

Для розробки оптимального методу ізолювання ламотриджину з біологічних об'єктів готували модельні проби печінки (20 г), нирки (20 г), крові (20 мл) та сечі (20 мл) з вмістом досліджуваного токсиканту 10 мг в пробі.

Враховуючи фізико-хімічні властивості ламотриджину (розчинність в органічних розчинниках та нерозчинність у воді, значення рКа), для його ізолювання з тканин печінки в умовах ненаправленого хіміко-токсикологічного аналізу (ХТА) лікарських речовин застосовували методи: екстракція водою, підкисленою кислотою оксалатною та екстракція етанолом, підкисленим кислотою оксалатною, а для ізолювання в умовах направленого ХТА – екстракцію ацетонітрилом, підкисленим кислотою хлоридною.

Результати досліджень наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Результати ізолювання ламотриджину з тканин печінки

Біологічний об'єкт	Метод ізолювання	Визначено методом, %	
		ВЕРХ	Спектрофотометр.
Печінка	Підкисленою водою	21,54±2,16	19,39±1,82
	Підкисленим етанолом	81,37±2,22	79,68±1,74
	Підкисленим ацетонітрилом	84,28±1,09	81,44±1,12
Нирка	Підкисленою водою	19,58±2,51	19,37±2,02
	Підкисленим етанолом	80,58±2,22	78,98±1,23
	Підкисленим ацетонітрилом	83,31±1,28	79,29±1,53

Дані таблиці свідчать, що при ізолюванні ламотриджину з тканин печінки та нирки найбільш вагомих результатів було одержано в умовах застосування ацетонітрильного методу (до 84%) при кількісному визначенні токсиканту методом ВЕРХ. До 80% ламотриджину можна віділити із зазначених біологічних об'єктів підкисленим етанолом. При цьому, спектрофотометричне визначення кількісного вмісту ламотриджину в пробі біологічного матеріалу є також цілком прийнятним.

В умовах застосування підкисленої води було одержано значно нижчих результатів. Виділити ламотриджин з тканин біологічних об'єктів вдалося тільки на рівні 20%. Останні результати можна пояснити більш низьким ступенем екстракції ламотриджину підкисленою водою у порівнянні з екстракцією підкисленими етанолом або ацетонітрилом, що обумовлено особливостями фізико-хімічних властивостей досліджуваної речовини. Що стосується застосованих методів кількісного визначення ламотриджину в одержаних вилученнях (ВЕРХ та спектрофотометрія), то вони, виходячи з одержаних результатів, задовільно корелюють між собою.

Одержані за ступенем екстракції ламотриджину з водних розчинів результати, також були використані при розробці умов його ізолювання з біологічних рідин – крові та сечі. Для цього модельні суміші крові або сечі витримували 24 години при кімнатній температурі. Через добу у відповідну модельну суміш додавали 30% розчин натрію гідроксиду до рН 9 за універсальним індикатором і суміш нагрівали на киплячій водяній бані протягом 15 хв. Після охолодження до суміші додавали натрію сульфат до насичення і тричі екстрагували хлороформом. Отримані органічні вилучення об'єднували, фільтрували через паперовий фільтр з безводним натрію сульфатом та випаровували в потоці теплого повітря до сухого залишку. Сухий залишок розчиняли в 10 мл етанолу та досліджували.

Результати досліджень наведено в табл. 2.

Результати ізолювання ламотриджину з біологічних рідин

Біологічна рідина	Визначено речовини (у %) методом	
	ВЕРХ	Спектрофотометр.
Кров	87,84±1,42	85,46±1,64
Сеча	91,55±1,05	90,37±1,86

Дані таблиці свідчать, що при ізолюванні ламотриджину з крові та сечі хлороформом його можна виділити до 91%. Що стосується застосованих методів кількісного визначення ламотриджину в одержаних вилученнях (ВЕРХ та спектрофотометрія), то вони, виходячи з одержаних результатів, задовільно корелюють між собою.

Висновки. Досліджено умови ізолювання ламотриджину з тканин органів (печінка та нирка) та біологічних рідин (кров та сеча). Встановлено, що при ізолюванні ламотриджину з тканин печінки та нирки найбільш вагомих результатів було одержано в умовах застосування ацетонітрильного методу (до 84%). До 80% ламотриджину можна віділити із зазначених біологічних об'єктів підкисленим етанолом. При ізолюванні ламотриджину з крові та сечі хлороформом його можна виділити до 91%.

Список літератури

1. Броди, М. Течение и рациональная терапия эпилепсии / М. Броди // *Международ. неврол. журн.* – 2005. – № 4. – С. 72-83.
2. Бурчинский, С.Г. Выбор антиконвульсанта в стратегии монотерапии эпилепсии // *Международный неврологический журнал.* – 2011. – № 2. – С. 78-82.
3. Марценковский, И.А. Лечение эпилепсии / И.А. Марценковский // *Здоров'я України.* – 2004. – № 8. – С. 38-39.
4. Мерзлікін С.І. Інформаційний огляд небезпечних наслідків застосування ламотриджину / С.І. Мерзлікін, Т.В. Кучер, І.О. Журавель // *Фармакологія та лікарська токсикологія.* – 2012. – № 3 (28). – С. 3-9.
5. Харчук, С.М. Епілепсія: лікування в Україні / С.М. Харчук, О.Л. Компанієць // *Укр. мед. газета.* – 2006. – № 2. – С. 16.
6. Lamotrigine-induced aseptic meningitis: a case report / [MA Green, MN Abraham, AJ Horn, et al.] // *Int. Clin. Psychopharmacol.* – 2009. – Vol. 24. – P. 159-61.
7. Monotherapy of lamotrigine versus carbamazepine in patients with poststroke seizure / R Gilad, M Sadeh, A Rapoport, R Dabby, M Boaz, Y Lampl // *Clin. Neuropharmacol.* – 2007. – Vol.30(4):189–95.
8. Vengeliene Valentina. The effects of lamotrigine on alcohol seeking and relapse / Valentina Vengeliene, Christian A. Heidbreder, Rainer Spanagel // *Neuropharmacology.* – 2007.– Vol. 53, № 8. – P. 951-957.