МЕТОДИ ВИДІЛЕННЯ ЛОПЕРАМІДУ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

В.В.Болотов, В.Г.Ткаченко

Національний фармацевтичний університет

Ключові слова: лоперамід; біологічний матеріал; ізолювання; ТШХ; екстракційна фотометрія

Лоперамід (лопераміду гідрохлорид) — 4-[4-(4-хлорфеніл)-4-гідроксипіперидино]-N,N-диметил-2,2-дифенілбутирамід гідрохлорид є μ,δ-агоністом опіатних рецепторів і застосовується в якості симптоматичного засобу для лікування гострої та хронічної діареї. Зареєстровані випадки летальних та нелетальних отруєнь лоперамідом. Однак у літературі ми не знайшли даних про методи виділення лопераміду з біологічного матеріалу. В роботі вивчене ізолювання лопераміду з біологічного матеріалу за допомогою загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання лікарських отрут: О.О.Васильєвої, В.П.Крамаренка, Стаса-Отто, ацетонітрилом за Е.М.Саломатіним. Встановлено, що перші три методи дозволяють ізолювати 4-8% препарату з модельних сумішей лопераміду з печінкою, а останній — близько 11%. Розроблено часткову ефективну методику ізолювання лопераміду, що дозволяє ізолювати 45,3% препарату. Також розроблені методики ізолювання лопераміду із крові та сечі, які дозволяють виділити 55,38% та 95,01% препарату з відповідних рідин.

Лоперамід (лопераміду гідрохлорид) — 4-[4-(4-хлорфеніл)-4-гідроксипіперидино]-N,N-диметил-2,2-дифенілбутирамід гідрохлорид є μ,δ-агоністом опіатних рецепторів і застосовується в якості симптоматичного засобу для лікування гострої та хронічної діареї [9]. Препарат належить до сильнодіючих засобів. При оральному застосуванні у щурів LD_{50} лопераміду складає 249 мг/кг, у мишей — 149 мг/кг [11]. Описані численні випадки отруєння цим препаратом, особливо у дітей, що пов'язано з механізмом його дії [5, 6, 12]. Зареєстровані випадки летальних та нелетальних отруєнь лоперамідом, здебільшого викликані підвищенням індивідуальної дози або спробою використання препарату з метою суїциду [8, 10]. Однак у літературі ми не знайшли даних про методи виділення лопераміду з біологічного матеріалу.

Метою цієї роботи є вивчення можливості ізолювання лопераміду з біологічного матеріалу за допомогою загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання лікарських отрут: О.О.Васильєвої (ізолювання водою, підкисленою щавлевою кислотою), В.П.Крамаренка (ізолювання водою, підкисленою сірчаною кислотою), Стаса-Отто (ізолювання спиртом, підкисленим щавлевою кислотою) [2] та за методикою ізолювання Е.М.Саломатіна ацетонітрилом [4]. Ми також вивчили виділення лопераміду з біологічних рідин організму (сечі та крові).

У зв'язку з тим, що методики ізолювання органічних отрут пов'язані з екстракцією органічними розчинниками [7], ми попередньо вивчили залежність ступеня екстрагування лопераміду від природи органічного розчинника та pH середовища. Ці дані необхідні для наступної розробки оптимальних умов ізолювання лопераміду з біологічного матеріалу.

Матеріали та методи

При вивченні ступеня екстракції лопераміду з водних розчинів у залежності від їх pH та природи органічних розчинників ми використовували одноразову екстракцію за наступною методикою. В ділильній лійці струшували 9 мл буферної суміші Бріттона-Робінсона [3] з відповідним значенням pH, 1 мл водного розчину лопераміду (500 мкг/мл) та 10 мл відповідного органічного розчинника протягом 5 хвилин. Після розділення шарів органічний шар відділяли і кількість лопераміду в ньому визначали екстракційно-фотометричним методом [1]. Одержані дані представлені на рисунку.

Для дослідження ізолювання препарату з біологічного матеріалу використовували модельні суміші печінки трупа людини, яка загинула від травми та не зазнала гнилісних змін, з лоперамідом. До 10 г подрібненої печінки додавали 2,0 мл розчину лопераміду, що містив 2000 мкг препарату, ретельно перемішували і залишали на 24 години. Паралельно ставили "сліпий" дослід з біологічним матеріалом.

Ізолювання лопераміду з біологічного матеріалу проводили за допомогою модифікованих методів О.О.Васильєвої, В.П.Крамаренка, Стаса-Отто [2]. Модифі-

В.В.Болотов — доктор хім. наук, професор, завідувач кафедри аналітичної хімії Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

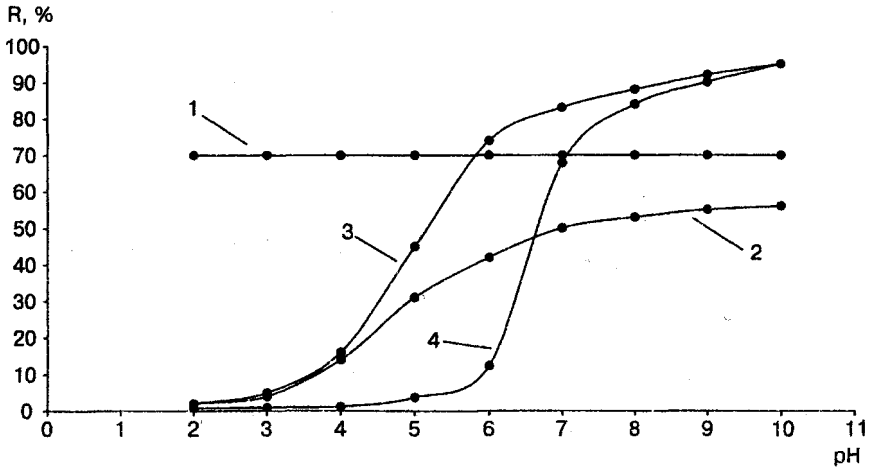

Рис. Залежність ступеня екстракції (R, %) лопераміду від pH та природи органічного розчинника: 1 — хлороформ, 2 — етилацетат, 3 — діетиловий ефір, 4 — гексан

кація методів полягала у зменшенні наважок біологічного матеріалу до 10 г. Відповідно були зменшені й об'єми органічних розчинників.

З огляду на дані екстракції лопераміду хлороформом та ефіром (див. рис.) у залежності від pH середовища екстракційну очистку отриманих кислих водних витяжок здійснювали трикратною екстракцією ефіром по 5 мл. Ефірні витяжки відкидали, а кислі водні екстрагували 4 рази хлороформом по 5 мл або 3 рази по 10 мл за методом В.П.Крамаренка. В отриманих хлороформних витяжках препарат визначали екстракційно-фотометричним методом [1]. В лужних хлороформних витяжках препарат не був знайдений. Отримані результати ізолювання наведені в табл. 1.

У зв'язку з низькою ефективністю цих методів ізолювання ми також вивчили методику ізолювання лопераміду за Е.М.Саломатіним [4], яка виявилась також малоефективною (табл. 1).

Нами була запропонована більш ефективна часткова методика ізолювання лопераміду за допомогою ацетонітрилу.

Методика ізолювання лопераміду з біологічного матеріалу за допомогою ацетонітрилу. 10 г модельної суміші печінки з лоперамідом розтирають у ступці з 30 г безводного натрію сульфату. Залишають на 2 год до повного висихання суміші. Отриману масу обережно подрібнюють за допомогою товкачика до сипучості і переносять у хімічний стакан. Суміш тричі настоюють з 50,0 мл ацетонітрилу по 1 годині при частому перемішуванні. Ацетонітрильні витяжки об'єднують, фільтрують через паперовий фільтр у випарювальну чашку та випаровують до сухого залишку на водяній бані (температура 45-50°С). До залишку додають 30 мл гексану і ретельно перемішують скляною паличкою. Гексанову витяжку фільтрують крізь фільтр, змочений гексаном. Залишок на фільтрі промивають 5 мл гексану.

Відфільтровану гексанову витяжку тричі збовтують по 5 хв з 10 мл 0,1 М розчину кислоти хлороводневої. Гексанову витяжку відокремлюють і далі не досліджують. Об'єднані кислі водні витяжки тричі збовтують на протязі 5 хв з новими порціями хлороформу по 10 мл. Паралельно проводять "сліпий" дослід. Хлороформні витяжки об'єднують, фільтрують крізь фільтр, змочений хлороформом з 0,5 г сульфату натрію безводного та аналізують.

Для виявлення лопераміду у витяжках з біологічного матеріалу використовували метод хроматографії в тонких шарах сорбенту (ТШХ). В якості тонкого шару використовували пластинки для високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) виробництва Естонії (сорбент КСКГ, фракція — 5÷20 мкм, товщина шару — 130±25 мкм, розмір пластинок — 10х10 см).

Хроматографічні пластинки попередньо обприскували 0,1 М розчином калію гідроксиду в метанолі, висушували та активували в сушильній шафі при 110°С протягом 30 хв. Скляними капілярами на лінію старту наносили три проби: 10 мкл стандартного 0,05% розчину лопераміду в метанолі

Таблиця 1

Результати ізолювання лопераміду з біологічного матеріалу (модельні суміші з печінкою) та їхні метрологічні характеристики (середнє з 5 визначень, α =0,95)

Метод ізолювання	Метод аналізу екстракційно-фотометричний	
	виділено лопераміду, %	метрологічні характеристики
О.О.Васильєвої	8,22	X=8,22; S=0,26; S_x=0,11; ΔX=0,26 ε=3,14%; X±ΔX=8,22±0,26
В.П.Крамаренка	4,07	X=4,07; S=0,16; S_x=0,07; ΔX=0,15 ε=3,9%; X±ΔX=4,07±0,15
Стаса-Отто	8,50	X=8,54; S=0,23; S_x=0,09; ΔX=0,23 ε=2,73%; X±ΔX=8,54±0,23
Е.М.Саломатіна (ізолювання підкисленим ацетонітрилом)	11,26	X=11,26; S=0,23; S_x=0,09; ΔX=0,23 ε=2,04%; X±ΔX=11,26±0,23
Ізолювання ацетонітрилом (за нашою методикою)	45,3	X=45,3; S=1,7; S_x=0,7; ΔX=1,7 ε=3,75%; X±ΔX=45,3±1,7

Таблиця 2

Результати виділення лопераміду з біологічних рідин організму (крові та сечі) та їхні метрологічні характеристики (середнє з 5 визначень, α=0,95)

Біологічна рідина організму	Метод аналізу екстракційно-фотометричний	
	виділено лопераміду, %	метрологічні характеристики
Кров	55,38	X=55,38; S=2,14; S_x=0,88; ΔX=2,14 ε=3,87%; X±ΔX=55,38±2,14
Сеча	95,01	X=95,01; S=1,95; S_x=0,8; ΔX=1,95 ε=2,06%; X±ΔX=95,01±1,95

(50 мкг), упарену до 10 мкл хлороформну витяжку з біологічного матеріалу з препаратом, хлороформну витяжку з біологічного матеріалу, отриману в "сліпому" досліді. Об'єм нанесених проб відповідав 1,0 г біологічного матеріалу при ізолюванні методами О.О.Васильєвої, В.П.Крамаренка, Е.М.Саломатіна або Стаса-Отто і 0,5 г при ізолюванні ацетонітрилом.

В якості системи розчинників використовували суміш метанол — 25% розчин аміаку (100:1,5). Пластинки піддавали елююванню в камері об'ємом 1000 $см^3$, лінія фронту складала 8 см, а потім висушували на повітрі. Для проявлення плям використовували УФ-світло, пари йоду, а також реактив Драгендорфа модифікований за Муньє.

Значення R_f плям лопераміду для всіх методів ізолювання складали 0,75-0,78. Пари йоду та реактив Драгендорфа модифікований за Муньє забарвлювали плями лопераміду у коричневий колір. УФ-світло виявляє плями коекстрактивних речовин, які мають рожеве або голубе світіння.

При дослідженні витяжок, отриманих даними методами, плями деяких коекстрактивних речовин мали значення R_f, близькі до значень R_f препарату.

У зв'язку з цим пластинки з нанесеними пробами попередньо двічі піддавали елююванню до верхнього кінця пластинки в камері з хлороформом. Після висушування пластинки спостерігали в УФ-променях. Плями лопераміду при цьому залишалися на лінії старту, а плями коекстрактивних речовин переміщувалися вище. Потім пластинки піддавали елююванню у вказаній вище системі розчинників, висушували і проявляли за допомогою вищезазначених проявників. В цих умовах спостерігається задовільний розподіл плям лопераміду і коекстрактивних речовин.

Методика екстракційно-фотометричного визначення лопераміду у витяжках. 1/5 або 1/10 об'єму хлороформної витяжки, отриманої одним із зазначених методів, поміщають у ділильну лійку, додають хлороформ до загального об'єму органічної фази 10 мл, 5 мл 0,1% водного розчину метилового оранжевого та 5 мл ацетатного буферного розчину з pH 4,6. Суміш у ділильній лійці струшують протягом 10 хв за допомогою механічного струшувача і залишають на 10 хв для розділення шарів. Збирають по 9 мл хлороформних екстрактів, відкидаючи їх перші порції (близько 0,7 мл), додають до них по 2 мл 1% розчину кислоти сірчаної в абсолютному етанолі. Одержану суміш ретельно перемішують і визначають її оптичну густину за допомогою фотоелектроколориметра КФК-2, (світлофільтр з $\lambda_{еф}$=540±10 нм, кювета з товщиною шару 10 мм); в якості розчину порівняння використовують "сліпий" дослід. Вміст лопераміду визначають за допомогою градуювального графіка [1].

Для дослідження ізолювання лопераміду з біологічних рідин організму використовували модельні суміші препарату з донорською кров'ю і сечею.

Методика ізолювання лопераміду з крові. До 5,00 мл донорської крові додавали 2,00 мл розчину лопераміду в 0,01 М розчині кислоти хлороводневої, в якому містилося 200 мкг препарату, перемішували і залишали на добу. Паралельно ставили "сліпий" дослід.

Через добу до суміші додавали 5,00 мл 0,1 М розчину кислоти хлороводневої і залишали на 2 год, періодично перемішуючи. Потім суміш центрифугували протягом 5 хв (6000 об/хв). Центрифугат зливали, а до осаду в центрифужній склянці додавали 5,00 мл 0,1 М розчину кислоти хлороводневої і ретельно перемішували. Суміш знову центрифугували протягом 5 хв (6000 об/хв). Центрифугати об'єднували, переносили в ділильну лійку та тричі екстрагували новими порціями хлороформу по 5 мл. Хлороформні витяжки об'єднували. Виявлення лопераміду в них проводили методом ТШХ, а кількісне визначення — екстракційно-фотометричним методом, як зазначено вище.

Методика ізолювання лопераміду із сечі. До 10 мл сечі додавали 2,00 мл розчину лопераміду в 0,01 М розчині кислоти хлороводневої, в якому містилося 200 мкг препарату, перемішували і залишали на добу. Паралельно ставили "сліпий" дослід.

Через добу суміш тричі екстрагували новими порціями хлороформу по 5 мл. Хлороформні витяжки об'єднували. Виявлення лопераміду у витяжках із сечі проводили методом ТШХ, а кількісне визначення — екстракційно-фотометричним методом, як зазначено вище.

Результати та їх обговорення

Нами було встановлено, що з кислого середовища (pH 2,0-4,0) у діетиловий ефір, етилацетат та гексан лоперамід майже не переходить (рис.). Максимальний ступінь екстракції лопераміду діетиловим ефіром 98±2%, етилацетатом — 56±2%, гексаном 95±2% досягається при pH 10,0. При використанні хлороформу ступінь однократної екстракції лоперамі-

ду не залежить від pH (pH 2,0-10,0) та становить 70±2%.

Дані табл. 1 за результатами ізолювання лопераміду різними методами свідчать, що загальноприйняті в хіміко-токсикологічному аналізі методики дозволяють виділяти від 4% до 8% лопераміду. Методика Е.М.Саломатіна [4] також малоефективна. Більш ефективною є запропонована нами методика ізолювання ацетонітрилом, яка дозволяє виділяти до 45,3% препарату. Крім того, розроблена методика є більш експресною.

Результати визначень кількості лопераміду в біологічних рідинах організму наведені в табл. 2, дані якої свідчать, що запропоновані нами методики дозволяють виділити 95,01% та 55,38% препарату з печі та крові відповідно.

ВИСНОВКИ

1. Вивчені умови екстракції лопераміду з водних розчинів органічними розчинниками в залежності від pH; встановлено, що з кислого середовища (pH 2,0-4,0) у діетиловий ефір, етилацетат та гексан лоперамід майже не переходить. Максимальний ступінь екстракції діетиловим ефіром 98±2%, етилацетатом 56±2%, гексаном 95±2% досягається при pH 10,0. При використанні хлороформу ступінь однократної екстракції не залежить від pH та становить 70±2%.

2. Вивчені умови ізолювання лопераміду з модельних сумішей з печінкою за методами О.О.Васильєвої, В.П.Крамаренка, Стаса-Отто, Е.М.Саломатіна; встановлено, що усі методи малоефективні і дозволяють ізолювати від 4% до 11% препарату.

3. Розроблено ефективну та експресну методику ізолювання лопераміду ацетонітрилом, яка дозволяє виділяти 45,3% препарату.

4. Розроблені методики ізолювання лопераміду з біологічних рідин організму, що дозволяє виділити 95,01% та 55,38% препарату з печі та крові відповідно.

5. Встановлено, що для визначення вмісту лопераміду у витяжках з біологічного матеріалу можна використовувати екстракційно-фотометричний метод.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Болотов В.В., Ткаченко В.Г. //Вісник фармації. — 2002. — №4. — С. 12-14.*
2. *Крамаренко В.П. Токсикологічна хімія. — К.: Вища школа, 1995. — С. 158-183.*
3. *Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. — М.: Химия, 1989. — 447 с.*
4. *Саломатин Е. М.//Суд.-мед. экспертиза. — 1989. — №1. — С. 39-40.*
5. *Awouters F., Megens A., Verlinden M. et al. //Dig. Dis. Sci. — 1993. — Vol. 38, №6. — P. 977-995.*
6. *Clancy T., Korberly C., Temple B. et al.//J. of Toxicology. — 1997. — Vol. 35, №1. — P. 11-20.*
7. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology / Mercel Dekker. — New York, Toronto, Tokio, 2002. — 3032 p.*
8. *Epelde F., Boada L., Tost J. //Ann. Pharmacother. — 1996. — Vol. 30, №11. — P. 1339.*
9. *Ericsson C.D. //Infect. Dis. Clin. North Am. — 1998. — №12. — P. 28-303.*
10. *Langlitz N., Schotte K., Bschor T. //Nervenarzt. — 2001. — Vol. 72, №7. — P. 562-564.*
11. *The Merk index an Encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. / 13 Ed. — New York: Whitehouse Station, 2001. — P. 898.*
12. *Wells S.R., Anderson D.L., Thompson J.A.D. //Vet. Hum. Toxicol. — 1989. — Vol. 31, №4. — P. 313-316.*

Адреса для листування: 61002, м. Харків,
вул. Пушкінська, 53. Тел. (057) 706-30-63.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 22.09.2003 р.