

УДК 543.42.062:535.24:615.214.24:547.821

І. М. Іванчук, В. В. Болотов, Л. Ю. Клименко, З. В. Шовкова
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

РОЗРОБКА МЕТОДИК ІЗОЛЮВАННЯ ДОНОРМІЛУ З БІОЛОГІЧНИХ РІДИН ОРГАНІЗМУ

Вивчено умови ізолювання донормілу з біологічних рідин на модельних сумішах з кров'ю і сечею за допомогою різних осаджувачів формених елементів крові та білків, які найчастіше застосовують у сучасному хіміко-токсикологічному аналізі. Встановлено, що з використаних методів найбільш ефективними є методи ізолювання донормілу з крові та сечі за умов обробки біологічних рідин 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої та використання для очищення "кислої" водної витяжки й екстракції препарату з "лужної" водної витяжки діетилового естеру та хлороформу відповідно.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: донорміл, тонкошарова хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія, УФ-спектрофотометрія, фотоколориметрія, іонетрія, екстракція, ізолювання з крові та сечі.

ВСТУП. За інформацією, наведеною в науковій літературі, донорміл викликає інтерес з точки зору хіміко-токсикологічних досліджень. Розробники та компанії-виробники у своїх рекламних матеріалах вказували на практичну відсутність ознак розвитку фізичної залежності, відсутність летальних випадків при застосуванні донормілу, а також на окремі випадки передозування, що переважно не вимагають проведення підтримувальної терапії [6–8]. Але вже незабаром з'явилися відомості про випадки смертельних отруєнь донормілом у Німеччині, Франції, Великобританії, США [9–11, 14, 18]. У 1983 році повідомлялося про суїцидальне отруєння донормілом 20-річної жінки на фоні приймання алкоголю [18]. У 1987 році в Німеччині було зафіксовано 109 летальних отруєнь донормілом [14]. У період з 1985 по 1995 рік публікації про випадки гострих отруєнь, передозувань і летальних результатів у ході лікування препаратом, а також випадки суїциду і приймання на фоні алкоголю почали з'являтися все частіше [9–11, 14, 18].

За даними Національного медичного університету Великобританії в період з 1983 по 1999 рік, у Сполученому королівстві донорміл увійшов до першої сотні лікарських препаратів, отруєння якими найчастіше реєструють на території цієї держави [11]. У Фінляндії фіксують до 10 летальних отруєнь донормілом на рік [15–17]. Крім того, за умов тривалого приймання препарат негативно впливає на

© І. М. Іванчук, В. В. Болотов, Л. Ю. Клименко, З. В. Шовкова, 2011.

пам'ять, пригнічує реакції організму і рухову активність, що, зокрема, призводить до автокатастроф за участю водіїв, які регулярно приймають донорміл [12, 13, 15]. У Швеції щорічно трапляється до 20 таких випадків [12, 13].

Потрібно зазначити, що летальні й токсичні дози донормілу в різних пацієнтів можуть відрізнятися в 10–20 разів, як і концентрації препарату в печінці, крові та сечі. Так, для сечі зафіксовано показники в діапазоні від 16 до 148 мг/л, для крові – від 7 до 120 мг/л, а для печінки – від 14 до 800 мг/кг [9–18].

Проте інформація щодо отруєнь донормілом на території України відсутня, не в останню чергу тому, що методи його хіміко-токсикологічного дослідження практично не розроблено.

Одним із найважливіших етапів хіміко-токсикологічного дослідження є проведення ізолювання препарату з біологічного матеріалу, зокрема з біологічних рідин, з максимально можливим виходом.

Метою даної роботи була розробка методів ізолювання донормілу з біологічних рідин організму – крові та сечі.

Попередні дослідження умов екстракції донормілу з водних розчинів органічними розчинниками показали, що хлороформ екстрагує донорміл із водних розчинів у лужному середовищі – при цьому при одноразовій екстракції в органічний шар переходить близько 90 % препарату. Ступінь одноразової екстракції донормілу з водних розчинів діетиловим естером сягає максимуму (75 %) при

pH=10–12. Гексан практично не екстрагує донормілі із водних розчинів ні з кислого, ні з лужного середовища.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. При дослідженні виділення донормілу з біологічних рідин використовували модельні суміші крові та сечі з препаратом. Для цього до 10 г відповідної біологічної рідини додавали 1,00 мл розчину донормілу у воді очищеній (1000 мкг препарату), ретельно перемішували і залишали на добу. Готували також контрольні суміші біологічних рідин із розчинником (вода очищена), дослідження яких проводили паралельно з основними.

Кількість донормілу, який використовували для виконання модельних дослідів, було розраховано, виходячи з даних наукової літератури [9, 10, 14, 18] щодо кількості препарату в біологічних рідинах людини при смертельних отруєннях.

Ізолювання донормілу з крові проводили за двома методиками, що відрізнялися використаним осаджувачем для формених елементів крові та білків.

У першому випадку до 10 г модельної суміші крові з донормілом додавали 5 мл 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої, перемішували та перевіряли за універсальним індикаторним папером pH суміші (при необхідності по краплях додавали 6 М розчин кислоти хлористоводневої до pH=2), залишали на 2 год при постійному перемішуванні. Суміш центрифугували (протягом 5 хв при 5000 об./хв), зливали надосадову рідину і тричі екстрагували діетиловим естером порціями по 5 мл. Естерні витяжки відділяли та в подальшому не досліджували. Водний шар підлужували 50 % розчином натрію гідроксиду до pH=11 і тричі екстрагували хлороформом порціями по 10 мл (при утворенні стійких емульсій застосовували центрифугування (протягом 5 хв при 5000 об./хв)).

У другому випадку до 10 г модельної суміші крові з донормілом додавали 5 мл 10 % водного розчину кислоти трихлорацетатної, перемішували та залишали на 1 год при постійному перемішуванні. Суміш центрифугували (протягом 5 хв при 5000 об./хв), зливали надосадову рідину, перевіряли pH (повинен дорівнювати 2) і тричі екстрагували діетиловим естером порціями по 5 мл. Естерні витяжки відділяли та в подальшому не досліджували. Водний шар підлужували 50 % розчином натрію гідроксиду до pH=11 і тричі екстрагували хлороформом порціями по 10 мл (при утворенні стійких емульсій застосовували центрифугування (протягом 5 хв при 5000 об./хв)).

Ізолювання донормілу із сечі проводили таким чином. До 10 г модельної суміші сечі з донормілом додавали 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої до pH=2 і тричі екстрагували діетиловим естером порціями по 5 мл. Естерні витяжки відділяли та в подальшому не досліджували. Водний шар підлужували 50 % розчином натрію гідроксиду до pH=11 і тричі екстрагували хлороформом порціями по 10 мл (при утворенні стійких емульсій застосовували центрифугування (протягом 5 хв при 5000 об./хв)).

Одержані витяжки (“лужна” хлороформна витяжка) об’єднували та фільтрували через паперовий фільтр (“червона стрічка”) з 1 г натрію сульфату безводного в мірну колбу місткістю 25,0 мл, доводили об’єм хлороформом до позначки. Таким чином, отримували витяжки 1, 2 та 3.

По 5, 10 та 100 мкл отриманої хлороформної витяжки використовували для ідентифікації донормілу методом ТШХ [3].

Кількісне визначення донормілу проводили за УФ-спектрофотометричною, екстракційно-фотометричною, іонометричною та ВЕРХ-методиками в 10 мл одержаної хлороформної витяжки, що висвітлено нами в роботах [1, 2, 4, 5]. Дослідження методом ВЕРХ проводили після очистки отриманої хлороформної витяжки методом ТШХ.

Методика ТШХ-очистки витяжок із біологічних рідин. 10 мл хлороформної витяжки випаровували на водяній бані до сухого залишку, який розчиняли в 0,5 мл хлороформу та кількісно наносили на лінію старту хроматографічної пластини “Sorbfil” ПТСХ-ІІВ (пластини попередньо обробляли 0,1 М розчином калію гідроксиду в метанолі, а потім висушували при 110 °С протягом 30 хв) смугою шириною 2 см. Поряд наносили 10 мкл стандартного хлороформного розчину донормілу (концентрація 1 мкг/мкл).

Пластину елюювали в хлороформі з метою очистки від співекстрактивних речовин – один раз або, за необхідності, двічі. За цих умов донормілі залишається на лінії старту, а співекстрактивні речовини мігрують до лінії фінішу.

Після висушування елюювали пластину в системі розчинників хлороформ – метанол (90:10), висушували, проявляли смугу “свідка” реактивом Драгендорфа та спостерігали пляму коричневого кольору з $R_f=0,58$.

Хроматографування проводили в камері об’ємом 500 см³, в яку вносили 10 мл системи розчинників. Камеру насичували протягом 30 хв. Довжина шляху пробігу розчинників становить 5 см.

За допомогою скальпеля навпроти плями “свідка” з пластини ретельно знімали сорбент з площі 3 см×1 см у скляний флакон. У флакон додавали 10 мл 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої (при наступному проведенні кількісного визначення за УФ-спектрофотометричною методикою) або 10 мл 0,01 М розчину кислоти хлористоводневої (при наступному проведенні кількісного визначення за екстракційно-фотометричною або ВЕРХ-методикою) та струшували протягом 5 хв, після чого фільтрували в мірну колбу місткістю 10,0 мл та доводили об’єм розчину через фільтр (“червона стрічка”) відповідним розчинником до позначки.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати кількісного визначення донормілу у витяжках із біологічних рідин наведено в таблиці.

Таблиця – **Результати ізолювання донормілу з біологічних рідин та їх метрологічні характеристики (n=3, α=0,95)**

Витяжка	Метод ізолювання	Виділено донормілу, %			
		УФ-спектрофотометрична методика	фотоколориметрична методика	іонометрична методика	ВЕРХ – пряме визначення (після ТШХ-очистки)
1	із крові (методика I)	75,53±1,72	76,79±2,22	75,01±1,20	75,30±4,13
2	із крові (методика II)	70,06±3,16	63,99±1,29	65,49±2,00	70,46±5,55
3	із сечі	89,85±3,09	91,07±5,87	90,97±4,76	91,59±6,63

ВИСНОВКИ. 1. Вивчено умови ізолювання донормілу з біологічних рідин на модельних сумішах з кров’ю і сечею за допомогою різних осаджувачів формених елементів крові та білків, що найчастіше застосовуються у сучасному хіміко-токсикологічному аналізі. Встановлено, що з використаних методів найбільш ефективними є методи ізолювання донормілу з крові та сечі за умов обробки біологічних рідин 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої і застосування для очистки “кислої” водної витяжки й екстракції препарату з “лужної”

Таким чином, потрібно зазначити, що найкращі результати ізолювання донормілу з крові та сечі було одержано за умов обробки біологічних рідин 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої і використання для очистки “кислої” водної витяжки й екстракції препарату з “лужної” водної витяжки діетилового естеру та хлороформу відповідно.

За умов проведення ідентифікації позитивний результат одержано для всіх витяжок. За допомогою запропонованих ТШХ-методик ідентифікації можна виявити донорміл при його вмісті в пробі не менше 0,1 мкг. Слід зазначити, що співекстрактивні речовини при проведенні ідентифікації не заважають виявленню донормілу у витяжках із біологічних рідин.

Запропонована методика ТШХ-очистки дозволяє виділити з пластини не менш як 90 % препарату.

водної витяжки діетилового естеру та хлороформу відповідно.

2. Запропоновано умови ідентифікації донормілу у витяжках із біологічних рідин, а також очистки одержаних витяжок від співекстрактивних речовин з використанням методу ТШХ.

3. Експериментально доведено доцільність застосування розроблених спектрофотометричної, фотоколориметричної, іонометричної та ВЕРХ-методик для кількісного визначення донормілу у витяжках з біологічних рідин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Болотов В. В. Вивчення методів ізолювання донормілу з об’єктів біологічного походження / В. В. Болотов, І. М. Іванчук, Л. Ю. Клименко // Вісник фармації. – 2008. – № 3 (55). – С. 20–22.
2. Болотов В. В. Застосування високоефективної рідинної хроматографії в аналізі донормілу / В. В. Болотов, І. М. Іванчук // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2006. – 4, вип. 2 (14). – С. 74–77.
3. Болотов В. В. Застосування тонкошарової хроматографії в аналізі снодійних засобів зопікло-

ну та донормілу / В. В. Болотов, Л. Ю. Клименко, І. М. Іванчук // Вісник фармації. – 2005. – № 2 (42). – С. 7–12.

4. Болотов В. В. Розробка твердоконтактного електрода, селективного до донормілу / В. В. Болотов, І. М. Іванчук, Г. Л. Кобзар // Вісник фармації. – 2007. – № 2 (50). – С. 7–10.

5. Болотов В. В. Спектрофотометричне та екстракційно-фотометричне визначення донормілу / В. В. Болотов, І. М. Іванчук // Вісник фармації. – 2005. – № 4 (44). – С. 16–19.

6. Левин Я. И. Донормил в терапии инсомнии / Я. И. Левин, К. Н. Стрыгин // Лечение нервных болезней. – 2005. – **6**, № 2 (16). – С. 9–16.
7. Левин Я. И. Клиническая сомнология: проблемы и решения / Я. И. Левин // Неврологический журнал. – 2004. – **9**, № 4. – С. 4–13.
8. Левин Я. И. Снотворные в неврологии / Я. И. Левин // Лечение нервных болезней. – 2000. – № 2. – С. 9–14.
9. Bayley M. Fatal overdose from Bendectin / M. Bayley, F. M. Walsh, M. J. Valaske // Clin. Pediatr. (Phila). – 1975. – **14** (5). – P. 507–509, 514.
10. Bockholdt B. Suicide through doxylamine poisoning / B. Bockholdt, E. Klug, V. Schneider // Forensic Sci. Int. – 2001. – **119** (1). – P. 138–140.
11. Buckley N. A. Changes in fatalities due to overdose of anxiolytic and sedative drugs in the UK (1983–1999) / N. A. Buckley, P. R. McManus // Drug Saf. – 2004. – **27** (2). – P. 135–141.
12. Haga C. Poisonings with benzodiazepine-like drugs / C. Haga // Tidsskr Nor Laegeforen. – 2003. – **123** (4). – P. 473–474.
13. Jonsson A. Fatal intoxication in a Swedish forensic autopsy material during 1992–2002 / A. Jonsson, P. Holmgren, J. Ahlner // Forensic Sci. Int. – 2004. – **143**. – P. 53–59.
14. Koppel C. Poisoning with over-the-counter doxylamine preparations: an evaluation of 109 cases / C. Koppel, J. Tenczer, K. Ibe // Hum. Toxicol. – 1987.
15. Koski A. Interaction of alcohol and drugs in fatal poisonings / A. Koski, I. Ojanpera, E. Vuori // Hum. Exp. Toxicol. – 2003. – **22** (5). – P. 281–288.
16. Lahti R. A. Fatal alcohol poisoning: medicolegal practices and mortality statistics / R. A. Lahti, E. Vuori // Forensic Sci. Int. – 2002. – **126**. – P. 203–209.
17. Lahti R. A. Fatal drug poisoning: medico-legal reports and mortality statistics / R. A. Lahti, E. Vuori // Forensic Sci. Int. – 2003. – **136**. – P. 35–46.
18. The general toxicology unknown. II. A case report: doxylamine and pyrilamine intoxication / N. B. Wu Chen, M. I. Schaffer, R. L. Lin [et al.] // J. Forensic Sci. – 1983. – **28** (2). – P. 398–403.

И. М. Иванчук, В. В. Болотов, Л. Ю. Клименко, З. В. Шовковая
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ИЗОЛИРОВАНИЯ ДОНОРМИЛА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ОРГАНИЗМА

Резюме

Изучены условия изолирования донормила из биологических жидкостей на модельных смесях с кровью и мочой с помощью различных осадителей форменных элементов крови и белков, которые чаще всего применяют в современном химико-токсикологическом анализе. Установлено, что с использованных методов наиболее эффективными являются методы изолирования донормила из крови и мочи в условиях обработки биологических жидкостей 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной и использования для очистки "кислого" водного извлечения и экстракции препарата из "щелочного" водного извлечения диэтилового эфира и хлороформа соответственно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: донормил, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, УФ-спектрофотометрия, фотоколориметрия, ионометрия, экстракция, изолирование из крови и мочи.

I. M. Ivanchuk, V. V. Bolotov, L. Yu. Klymenko, Z. V. Shovkova
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

DEVELOPMENT OF DONORMIL ISOLATION METHODS FROM ORGANISM BIOLOGICAL LIQUIDS

Summary

The conditions of donormil isolation from biological liquids at model mixtures with blood and urine by different precipitants of hemocytes and albumens, which are more frequent than all used in the modern chemico-toxicological analysis have been studied. It has been set that among the used methods the most effective are methods of donormil isolation from blood and urine at the conditions of treatment of biological liquids by 0,1 M hydrochloric acid solution and the using diethyl ether and chloroform for purification of acid aqueous extraction and medicine extracting from alkaline aqueous extraction respectively.

KEY WORDS: donormil, thin-layer chromatography, high-performance liquid chromatography, UV-spectrophotometry, photocolormetry, ionometry, extraction, isolation from blood and urine.

Отримано 28.03.11

Адреса для листування: В. В. Болотов, просп. Гагаріна, 38, кв. 63, Харків, Україна.