ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПАРАЦЕТАМОЛА И ДРОТАВЕРИНА ПРИ ПРИЕМЕ КОМБИНИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

CHEMICAL AND TOXICOLOGICAL STUDY OF PARACETAMOL AND DROTAVERINE IN THE USE COMBINED DRUGS

Аносова Людмила Сергеевна
Кандидат фармацевтических наук

Агафонов Алексей Михайлович

Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького

Anosova Ludmila Sergeevna
PhD in Pharmacy

Agafonov Alexey Mikhailovich

Donetsk State Medical University named after M. Gorky

E-mail:

Резюме

Отравления ОТС-препаратами каждый год набирают обороты. Информационные технологии доступны для всего населения. Очень актуальными для молодежи являются такие социальные сети как TikTok, instagram, like, telegrams и др. В погоне за тысячами подписчиков, лайков современное молодое поколение готово даже расстаться с жизнью. В столь знаменитых интернет-сетях прокатилась волна « попробуй и посмотри что будет». В январе 2021 года на Украине произошло массовое отравление детей (8 человек) такими лекарственными препаратами как парацетамол, панадол, но-шпа, комбинированными препаратами- но-шпа дуо. В Донецкой области в конце 2020 года зафиксировано 2 случая использования парацетамола и дротаверина в качестве «красивого видео» в целях самоубийства. Все эти лекарственные препараты отпускаются из аптек без рецепта и являются очень доступными для молодежи. В статье поднимается вопрос о проведении химико-токсикологического анализа таких действующих веществ как дротаверин, парацетамол при использовании комбинированных лекарственных форм.

Ключевые слова: отравление, парацетамол, дротаверин, химико-токсикологический анализ, нативное вещество, метаболит.

Summary

Poisoning with OTC drugs is gaining momentum every year. Information technology is available to the entire population. Such social networks as TikTok, instagram, like, telegrams, etc. are very relevant for young people. In pursuit of thousands of subscribers and likes, the modern young generation is even ready to give up their lives. In such famous Internet networks, a wave of "try and see what happens" swept. In January 2021, in Ukraine, there was a massive poisoning of children (8 people) with such medicinal preparations as paracetamol, panadol, no-shpa, combined drugs no-shpa duo. In the Donetsk region at the end of 2020, 2 cases of the use of paracetamol and drotaverin as a "beautiful video" for suicide were recorded. All of these drugs are available from pharmacies without a prescription and are very affordable for young people. The article raises the question of conducting a chemical-toxicological analysis of such active substances as drotaverin, paracetamol when using combined dosage forms.

Key words: poisoning, paracetamol, drotaverine, chemical-oxycological analysis, native substance, metabolite.

Библиографическая ссылка на статью
Аносова Л.С., Агафонов А.М. Химико-токсикологическое исследование парацетамола и дротаверина при приеме комбинированных лекарственных препаратов // Innova. - 2022. - № 1 (26). - С.6-13.

References to the article
Anosova L.S., Agafonov A.M. Chemical-toxicological study of paracetamol and drotaverine when taking combined drugs // Innova. - 2022. - No. 1 (26). - P.6-13.

Введение. В настоящее время по частоте применения анальгетики и спазмолитики занимают одно из первых мест в мире. Такое широкое применение данной группы препаратов обусловлено тем, что это ОТС-препараты, т.е. безрецептурные, которые обладают разным фармакологическим действием и широко используются при болях разной этиологии. На фармацевтическом рынке популярностью стали пользоваться комбинированные лекарственные препараты, которые кроме анальгетиков-антипиретиков содержат и другие группы препаратов для получения более широкого фармакологического эффекта [1]. На

фармацевтическом рынке популярностью пользуются такие комбинированные ОТС-препараты: спазмалгон эффект, пенталгин (содержащие парацетамол, дротаверин, кофеин, напроксен, фенирамин), но-шпа дуо (содержащие парацетамол и дротаверин).

Парацетамол занимает лидирующее место среди жаропонижающих лекарственных средств. Благодаря подавлению синтеза простагландинов, парацетамол оказывает обезболивающий эффект. Парацетамол, либо ацетаминофен (другое название парацетамола) - препарат, который снижает температуру тела и облегчает боль. Учеными из Университета Сиднея (University of Sydney) установлено, что за последние 10 лет отравление парацетамолом увеличилось в разы и составило более 200 человек. Результаты исследований опубликованы в издании «Medical Journal of Australia» [2].

Проведенные исследования в Австралии показали, что за период с 2007 по 2008 гг. отравление парацетамолом составило 8147 случаев, а за период 2016 по 2017 г. — случаев отравления парацетамолом стало больше и составило 11 754 случая. Статистика отравлений парацетамолом составлена из результатов госпитализации пациентов в лечебные учреждения [2].

Парацетамол представляет собой N-4-гидроксифенилацетамид. Рекомендованная доза парацетамола для взрослого пациента составляет 4 г (или 75 мг / кг) в течение 24-х часов. Любой прием внутрь, превышающий эту дозу, считается передозировкой [3,4].

Зафиксированы 16 февраля 2021 года случаи отравления дротаверином школьниц 13 и 12 лет в Боярске Киевской области (Украина). Несовершеннолетние дети, насмотревшись роликов в известных современный социальных сетях с призывом попробовать лекарственный препарат дротаверин и посмотреть, что будет, на перемене приобрели в аптеке лекарственный препарат «Дротаверин» и приняли единоразово 800 мг (40 таблеток). Все эти «эксперименты» происходили в школе, девочки были найдены в бессознательном состоянии [5] и доставлены в больницу. Спасти школьниц не удалось. Также зафиксирован случай отравления данным спазмолитиком подростка 17 лет в Донецке (ДНР) в 2020 году, который свое отравление препаратом «Дротаверин» снимал и выкладывал в социальную сеть. Спасти подростка также не удалось.

Дротаверин представляет собой 1-3,4-диэтоксибензилиден-6,7-диэтокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин (в виде гидрохлорида). Максимальная дозировка при этом 240 мг, выше данной дозы наступает отравление.

Случаи отравления безрецептурными препаратами являются не единичными. И связано это не только с социальными сетями, но и с полипрагмазией при котором одни препараты усиливают действие других препаратов, либо блокируют их метаболизм, тем самым способствуя их накоплению в организме.

Поскольку лекарственные препараты подвергаются в организме человека интенсивной биотрансформации, для обнаружения фактов его потребления необходимы данные об основных метаболитах. Для подтверждения факта приема и определение степени воздействия препарата на организм, необходимо количественное определение всех составляющих комбинированного препарата в биожидкостях [1, 6].

Целью явилась разработка метода изолирования и проведение идентификации в биологической жидкости (интактная моча человека) таких веществ как дротаверина и парацетамола методом газовой хроматографией с масс-селективным детектором (ГХ-МС) при приеме комбинированных препаратов.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования была использована интактная моча людей, употреблявших лекарственный препарат (спазмалгон эффект, пенталгин), который содержит 5 компонентов, содержащих в том числе такие действующие вещества: парацетамол- N-4-гидроксифенилацетамид и дротаверин-3,4-диэтоксибензилиден-6,7-диэтокси-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин.

Условия ГХ-МС-анализа: хроматограф Agilent 6890 N, мас-детектор Agilent 5975; колонка капиллярная Agilent HP 1- неподвижная фаза метилсилоксан (30 м×0,25 мм, 0,25 мкм); газ-носитель – гелий, скорость потока – 1,0 мл/мин; начальная температура колонки 70 ºС-1,00 мин, следующее повышение со скоростью 15°С/мин до 295ºС/мин, изотермический режим (295 ºС) − 4 мин; температура инжектора – 250 оС, температура источника излучения и квадруполя масс-детектора устанавливались на уровне 230оС и 150оС, соответственно, объем введенной пробы-1 мкл; масс-детекция проводится при электронной ионизации 70 eV, а сканирование проводилось в режиме SCAN, в диапазоне 45 - 550 атомных единиц массы (m/z).

Управление данным производилось согласно программного обеспечения Agilent ChemStation (версия E.01.01.335). Дротаверин и парацетамол в пробах идентифицировали по времени удерживания и масс-спектрам [3,13].

Методика изолирования из биожидкостей (интактная моча человека). В связи с образованием коньюгатов анализируемых веществ, при анализе мочи, стадии изолирования предшествует стадия кислотного гидролиза для их разрушения. К 3 мл мочи с исследуемыми веществами прибавляли 3 мл дихлорметана и кислоту хлористоводородную

концентрированную для разрушения коньюгатов до pH =2-3 (по индикаторной бумаге), нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 мин. После кипячения добавляли дихлорметан и изменяли pH среды посредством добавления гидроксида аммония до pH =9 (по индикаторной бумаге). Охлаждали, центрифугировали при 3000 об/мин. в течение 10 мин и отделяли водную фазу. Полученное извлечение переносили в выпарительную чашу и выпаривали до сухого остатка. Проводили дериватизацию 3-фторацилированием. К сухому остатку добавляли 70мкл 3-фторуксусного ангидрида. Термостатирование проводили 60мин при температуре 60°С. Реактив упаривали до сухого остатка и реконструировали в 100мкл этилацетата. Вводили пробу в прибор в объеме 0,2мкл.

Щелочной гидролиз. К 3 мл мочи с исследуемыми веществами прибавляли 3 мл дихлорметана и гексана (8:1), добавляли 2 г карбонатного буфера до pH = 9-10 (по индикаторной бумаге), нагревали на водяной бане в течение 20 мин при 700 С. После проводили высаливание. После этапа высаливания добавляли дихлорметан и изменяли pH среды посредством добавления хлористоводородной кислоты до pH =3 (по индикаторной бумаге). Охлаждали, осадок отделяли путём центрифугирования 3000 об/мин. в течение 10 мин и отбрасывали. Надосадочную жидкость переносили в выпарительную чашку и выпаривали до сухого остатка [6,7].

При определении щелочного извлечения методом ГХ-МС использовали метод пробоподготовки – силирование с BSTFA. К исследуемому объекту, помещенному в виалу, прибавляли 50 мкл смеси 25% раствора BSTFA в ацетонитриле. Смесь термостатировали при 90 С в течение 20 мин, затем упаривали до сухого остатка. Растворяли в 100 мкл этилацетата и вводили 0,2 мкл в испаритель газового хроматографа и проводили исследование методом ГХ-МС [6,7].

Результаты и обсуждение. При ГХ/МС исследовании извлечения из мочи после кислотного гидролиза и обработки дериватизирующими агентами (рисунок 1) идентифицированы метаболит и продукт гидролиза парацетамола – n-аминофенол (рисунок 2) Характерные ионы в масс-спектрах обнаруженных соединений приведены в таблице 1

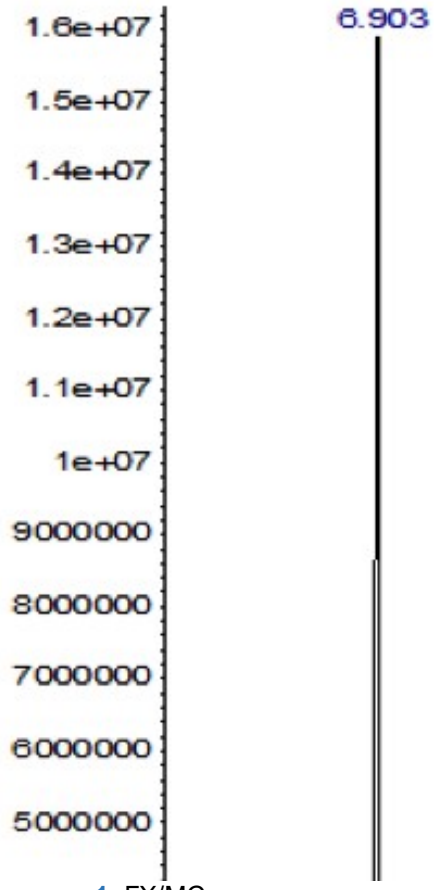

Рисунок 1. ГХ/МС хроматограмма извлечения после предварительног кислотного гидролиза с дериватизацией

Таблица 1.

Характерные ионы в масс-спектрах исследуемых веществ

Аналитическая форма	Время удерживания, мин	Молекулярная масса	m/z
n-Аминофенол-2TFA	6,9	301	301*, 204, 69, 109, 176, 232,134

* Молекулярный ион. Ионы приведены в порядке уменьшения интенсивности сигнала.

Полученные масс-спектры сравнивали с библиотечными масс-спектрами (библиотеки NIST'2002, Wiley 7N, PMW-TOX 3, США).

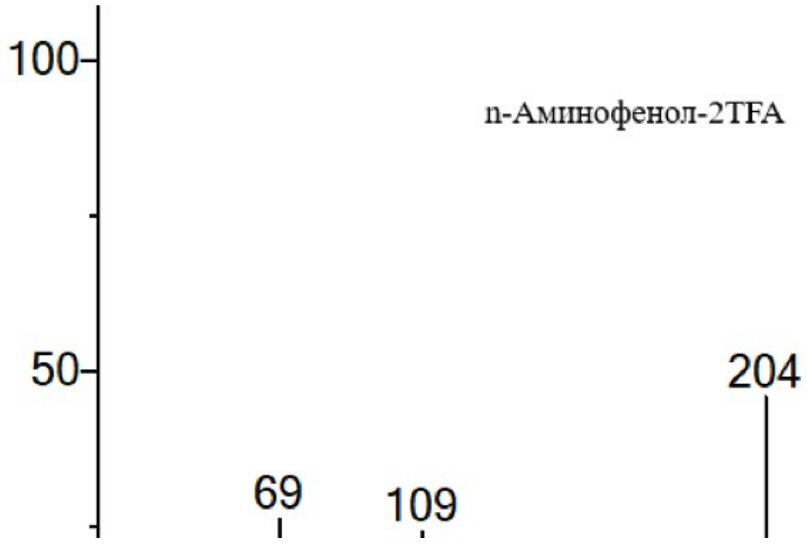

Рисунок 2. Масс-спектр метаболита парацетамола (n-аминофенол-2TFA)

При ГХ/МС исследовании извлечения из мочи после щелочного гидролиза и обработки дериватизирующими агентами был получен спектр (рисунок 3). Регистрация масс-спектров триметилсилильных производных в режиме полного ионного тока в интервале 45-550 а.е.м.

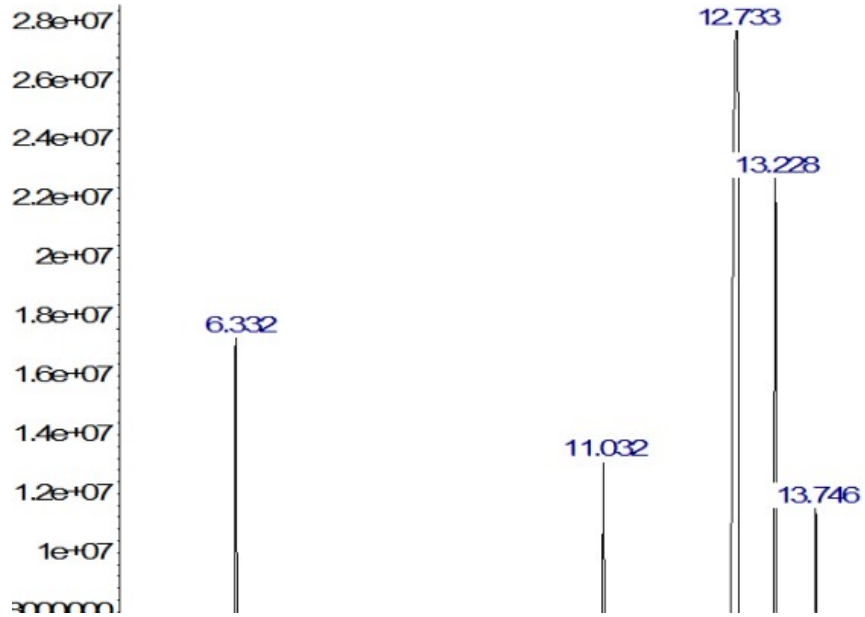

Рисунок 3. ГХ/МС хроматограмма извлечения после предварительног щелочного гидролиза с дериватизацией

Масс-спектры обнаруженных соединений приведены в таблице 2

Таблица 2.
Характерные ионы в масс-спектрах исследуемых веществ

Аналитическая форма	Время удерживания, мин	Молекулярная масса	m/z
Парацетамол-2TMS	9,71	295	206, 280,295*, 116, 237, 165, 63
Парацетамол-O-TMS	10.39	223	181,223*,166, 208,106,65

* Молекулярный ион. Ионы приведены в порядке уменьшения интенсивности сигнала

После щелочного гидролиза и силирования обнаружены дериваты парацетамола – парацетамол-2TMS (рис.4) и парацетамол O-TMS (рис.5)

Рисунок 4. Масс-спектр деривата парацетамол-2TMS

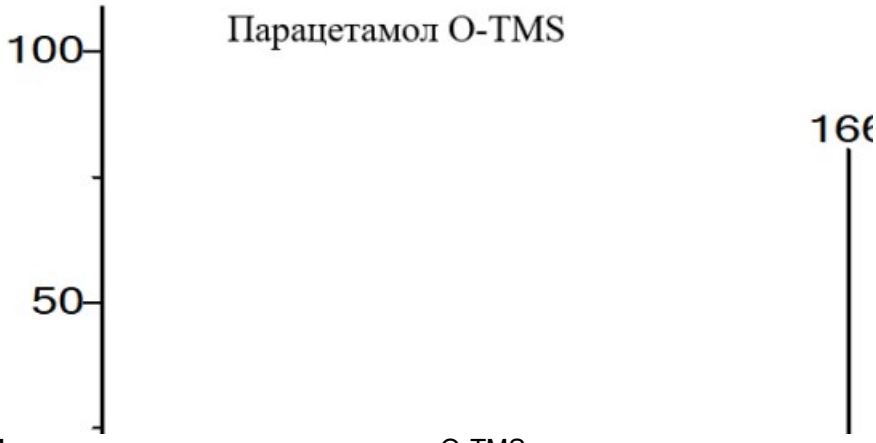

Рисунок 5. Масс-спектр деривата парацетамол O-TMS

При ГХ/МС исследовании щелочного извлечения из мочи без последующей обработки дериватизирующими агентами был получен спектр нативных соединений (рис. 6).

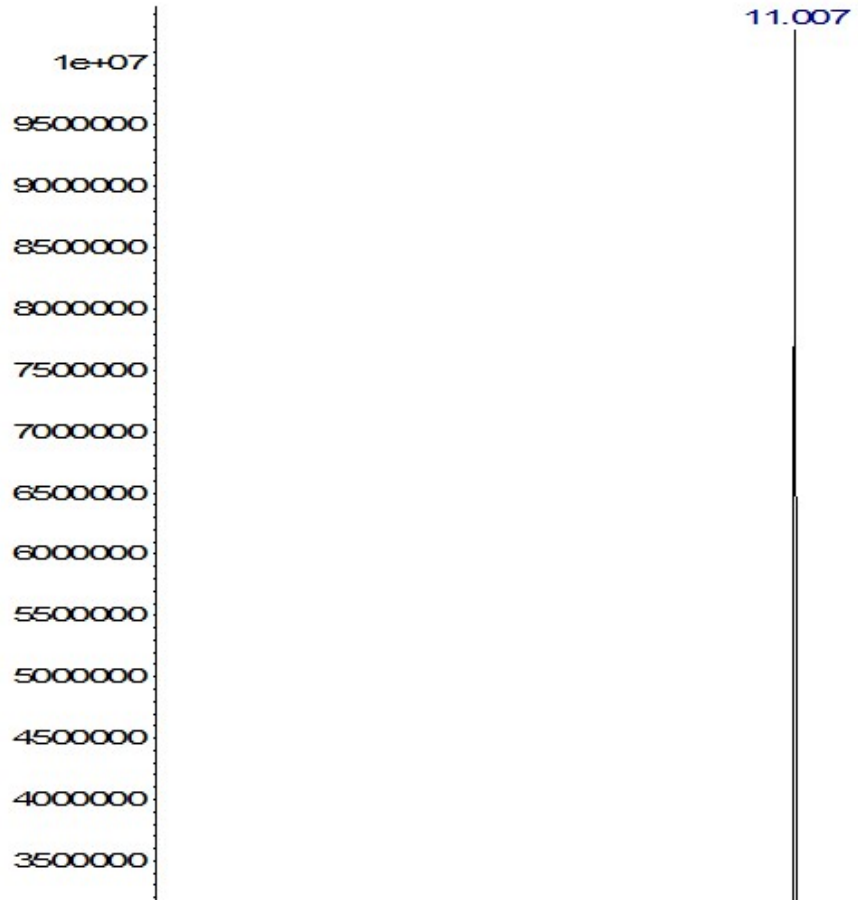

Рисунок 6. ГХ/МС хроматограмма щелочного извлечения без дериватизации

При ГХ/МС исследовании щелочного извлечения из мочи идентифицированы пики парацетамола (рис.7) и его продукта гидролиза n-аминофенола (рис.8).

Характерные ионы в масс-спектрах обнаруженных соединений приведены в таблице 3.

Таблица 3.

Характерные ионы в масс-спектрах исследуемых веществ

Аналитическая форма	Время удерживания, мин	Молекулярная масса	m/z
n-Аминофенол	6,39	109	109*,80, 53
Парацетамол	7,48	151	109, 80,151*,53,130
Дезэтилэтаверин	17,3	366	338, 366*, 310,236,123
Этаверин	17,57	395	366, 394*, 380,236,123

* Молекулярный ион. Ионы приведены в порядке уменьшения интенсивности сигнала

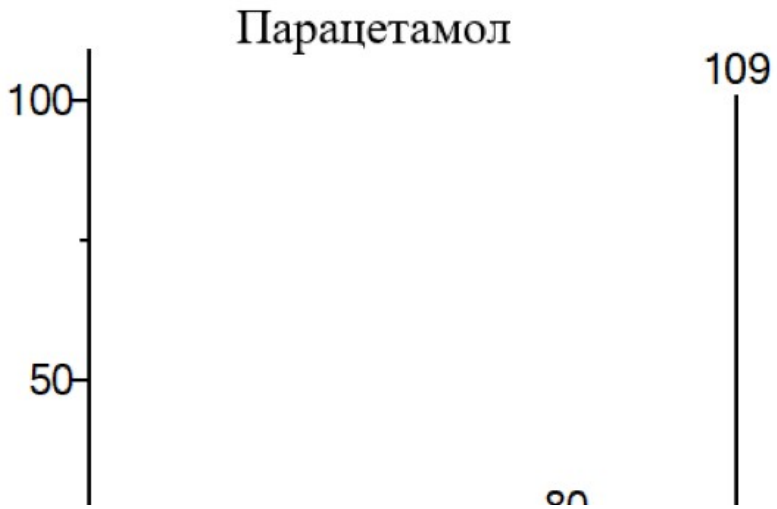

Рисунок 7. Масс-спектр парацетамола

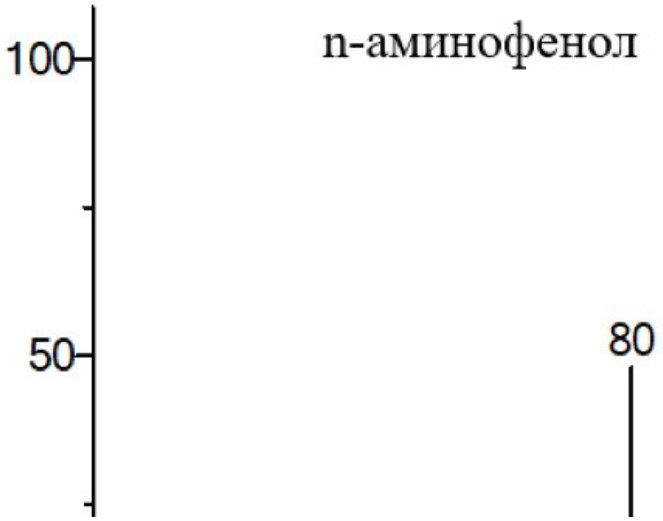

Рисунок 8. Масс-спектр n-аминофенола

В результате окислительной деградации, протекающей как в биологическом материале, так и во время пробоподготовки обнаружить дротаверин не удалось. Окисление дротаверина может протекать с участием мостиковой метиленовой группы, соединяющей циклические фрагменты. В результате образуется этаверин - спазмолитик, входящий в ряд фармацевтических композиций и постоянный спутник дротаверина в образцах [8,9] (рисунок 9).

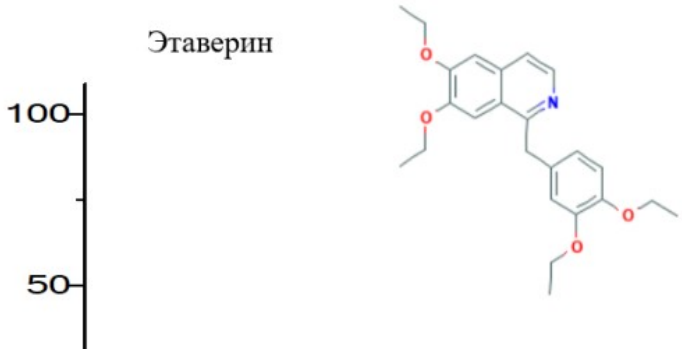

Рисунок 9. Масс-спектр этаверина

Сведений о метаболических связях между дротаверином и этаверином в литературе отсутствуют.

Так же был обнаружен дезэтаверин, который является деэтилированным метаболитом этаверина. Положение элиминации этоксигруппы установить невозможно (рисунок 10). Наличие этих соединений может свидетельствовать о факте приема дротаверина.

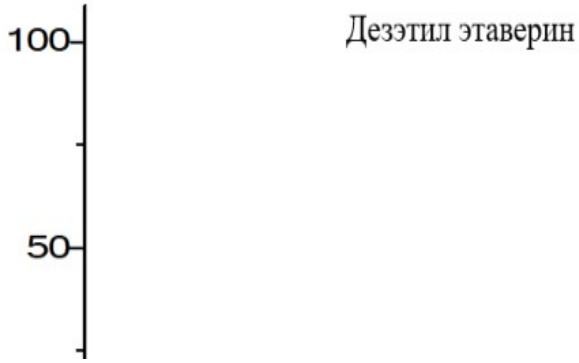

Рисунок 10. Масс-спектр дезэтилэтаверина

Вывод. Представленный метод позволяет быстро и надежно идентифицировать трудно хроматографируемые соединения, что имеет важное значение при постановке диагноза отравления и назначения адекватной терапии.

Изучена методика анализа веществ, входящих в состав комбинированного препарата, и их метаболитов в биологических объектах методом газовой хроматографии-масспектрометрии (ГХ-МС) с предварительной дериватизацией и без.

Литература.

1. Химико-токсикологическое исследование некоторых нестероидных противовоспалительных средств. Ваталев А.А., Киреева А.В., Куклин В.Н. Бутлеровские сообщения. 2014. Т.39. №7. С.108-116.

2. Отравление парацетамолом: за последнее десятилетие резко возросло количество случаев в Австралии. https://www.apteka.ua/article/512903 (дата доступа 15.12.2021).

3. Athersuch TJ, Antoine DJ, Boobis AR, Coen M, Daly AK, Possamai L, Nicholson JK, Wilson ID. Paracetamol metabolism, hepatotoxicity, biomarkers and therapeutic interventions: a perspective. Toxicol Res (Camb). 2018 May 08;7(3):347-357.

4. Saccomano SJ. Acute acetaminophen toxicity in adults.Nurse Pract. 2019 Nov;44(11):42-47.

5. https://kyiv.tsn.ua/ru/otravlenie-shkolnic-v-boyarke-stalo-izvestno-chto-upotreblyali-devochki-i-kakoe-sostoyanie-postradavshey-1727614.html (дата доступа 15.12.2021).

6. Аносова Л.С., Агафонов А.М. Химико-токсикологический анализ комбинированных препаратов методом ГХ-МС // International Scientific Conference on Medical Sciences "The concept of modern pharmacy and medicine in Ukraine and the EU countries". Włocławek, Poland, 2021.С. 184-196. DOI https://doi.org/10.30525/978-9934-26-113-8-29

7. Аносова Л.С., Агафонов А.М. Химико-токсикологический анализ напроксена и парацетамола методом ГЖ-МС в комбинированных лекарственных препаратах // материалы I Международная научно-практическая конференция «Хроматография в химии, медицине и биологии: актуальные вопросы, достижения и инновации». Кемерово, 2021, с.40-45.

8. Григорьев, А.М. Хроматографические методы определения дротаверина и идентификация его производных и метаболитов в биообразцах / А. М. Григорьев, А. А. Мельник, Л. В. Рудакова // Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология. – 2012. – Т. 55. – № 2. – С. 18-22.

9. Киричёк А. В., Сравнительное химико-токсикологическое исследование дротаверина и этаверина/ А. В. Киричёк, Д. А. Петрищева //Актуальные аспекты химической технологии биологически активных веществ: сб. научных трудов. Вып. 190 / под общ. ред. А. Е. Коваленко. М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2020. 248 с.