

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ЭКСТРАКЦИИ ЛЕВАМИЗОЛА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

З.У. УСМАНАЛИЕВА, К.С. РИЗАЕВ, Д.А. ЗУЛФИКАРИЕВА, М.О. РОХАТАЛИЕВА

Ташкентский фармацевтический институт

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR EXTRACTION OF LEVAMIZOL FROM BIOLOGICAL FLUIDS

Z.U. USMANALIEVA, K.S. RIZAEV, D.A. ZULFIKARIEVA, M.O. ROHATALIEVA

Tashkent Pharmaceutical Institute

Цель. В случаях острого отравления, чтобы оказать экстренную медицинскую помощь больному нужно правильно определить причину отравления. При анализе крови и мочи для идентификации ядовитого вещества в судебно-химической экспертизе важно извлечение этого вещества из биологических жидкостей. Целью данной работы была разработка условий изолирования с помощью экстракции левамизола из биологических жидкостей лабораторных животных.

Материал и методы. Для разработки оптимальной методики изолирования левамизола из биологических жидкостей лабораторных животных сперва была проведена экстракция левамизола из водной среды в разных условиях. Для изучения влияния природы органического растворителя на процесс разделения использовались несколько растворителей. Также было изучено влияние pH-среды на извлечение левамизола из водной среды.

Результаты. По результатам анализа было признано целесообразным проводить трехкратную экстракцию левамизола из водной среды хлороформом при pH средах 3-4. Данная методика использовалась для изолирования левамизола из крови и мочи лабораторных животных.

Ключевые слова: левамизол, экстракция, биологические жидкости.

Aim. In cases of acute poisoning, in order to provide emergency medical care to the patient, it is necessary to correctly determine the cause of the poisoning. When analyzing blood and urine for the identification of a poisonous substance in a forensic chemical examination, it is important to extract this substance from biological fluids. The aim of this work was to develop isolation conditions using the extraction of levamisole from biological fluids of laboratory animals.

Material and methods. To develop optimal conditions for isolating levamisole from biological fluids of laboratory animals, levamisole was first extracted from an aqueous medium under different conditions. Several solvents were used to study the effect of the nature of the organic solvent on the separation process. The influence of the pH of the medium on the extraction of levamisole from the aqueous medium was also studied.

Results. According to the results of the analysis, it was found expedient to carry out three-fold extraction of levamisole from the aqueous medium with chloroform at a pH of 3-4. This technique was used to isolate levamisole from blood and urine of laboratory animals.

Keywords: levamisole, extraction, biological fluids.

https://doi.org/10.54185/TBEM/vol14_iss4/a10

Введение

В практике химико-токсикологического анализа участились случаи отравления людей некоторыми антигельминтными препаратами. Левамизол включен в примерный перечень ВОЗ основных лекарственных средств — список важнейших препаратов по версии Всемирной организации здравоохранения, куда относят самые эффективные, безопасные и экономически доступные лекарства [1].

Несмотря на всемирное признание, эффективность, доступность и дешевизну, левамизол имеет важный недостаток — серьезные побочные эффекты. Попадая в организм

однократно, левамизол менее опасен, но все же побочные эффекты могут проявиться и в этом случае. Одним из самых опасных будет агранулоцитоз — резкое сокращение числа гранулоцитов в крови. Эти клетки могут чувствовать концентрацию веществ — индикаторов воспаления, двигаться к пораженному участку, поедать и переваривать чужеродные частицы и бактерии, травить врагов antimicrobными веществами и захватывать их в ловушки. Поскольку гранулоциты — самый многочисленный вид лейкоцитов одной из разновидностей клеток иммунной системы, агранулоцитоз снижает защитные функции организма. Человек со сниженным из-за агранулоцитоза иммунитетом может

Таблица 1. Результаты исследования влияния pH-среды и органического растворителя на экстракцию левамизола из водных сред ($n = 5$)

рН среда	Органический растворитель							
	хлороформ		диэтиловый эфир		бензол		гексан	
	экстрагирован							
	мкг	%	мкг	%	мкг	%	мкг	%
1,68	56,8	56,80	12,1	12,15	17,0	17,00	5,2	5,23
3,56	96,5	96,59	20,1	20,16	20,5	20,51	8,4	8,42
6,86	72,3	72,37	19,3	19,31	19,5	19,57	5,4	5,42
9,18	32,0	32,04	18,5	18,56	19,8	19,89	7,6	7,63
12,45	34,2	34,23	20,0	20,01	20,1	20,18	8,2	8,21

пострадать от тяжелых инфекций (пневмонии, инфекции мочевыводящих путей), а образующиеся на слизистых оболочках язвочки могут привести к заражению крови [2].

Еще один тяжелый побочный эффект — васкулит. Так называют воспаление и разрушение сосудов, вызванное аутоиммунными нарушениями. Васкулиты могут сопровождаться тяжелыми поражениями почек, кровотечениями, потерей веса, кровавым кашлем и стулом с кровью, головной болью и проблемами со зрением. Сосуды в организме расположены повсюду, поэтому это заболевание может принимать различные формы и поражать разные органы.

Как сообщает обзор 2017 года в научном журнале *Archives of Toxicology*, женщины серьезно рискуют «обзавестись» агранулоцитозом и васкулитом при приеме левамизола в качестве лекарства. Также обзор рассказывает о другом побочном эффекте — лейкоэнцефалопатии. Причиной этого заболевания также становится подавление иммунитета. У некоторых пациентов это приводит к тому, что прежде безвредный полиомавирус человека вызывает воспаление, разрушающее миelinовое покрытие на длинных отростках нервных клеток, аксонах [1].

Есть и менее опасные, но довольно странные симптомы, и это не только тошнота или сыпь. Как рассказывает опубликованный еще в 1978 году обзор не связанных с кровеносной системой побочных эффектов левамизола, иногда после приема декариса временно меняется восприятие запахов и вкусов, например, вода может начать резко пахнуть хлоркой, а продукты приобретают металлический привкус. Но, как подтверждает обновленный в 2017 году обзор действия лекарств на восприятие вкуса и запаха, опубликованный на информационном сайте для врачей-неврологов *MedLink Neurology*, это связано с влиянием левамизола на вкусовые рецепторы человека, но на молекулярном уровне причины такого отклонения до сих пор не изучены.

Цель. Разработка условий экстракции левамизола из биологических жидкостей.

Материалы и методы

Основным этапом химико-токсикологического анализа является изолирование ядовитого вещества из биологического материала и биологических жидкостей. Для этого первоначально был проведен ряд исследований по подбору оптимальных условий экстракции левамизола из водных растворов.

Для каждого вещества существует среда с максимальным pH экстракции с органическим растворителем, который не смешивается с водой, что называется максимальной площадью экстракции среды. Максимальное извлечение веществ зависит от природы органического растворителя [3]. Для изучения влияния природы органического рас-

творителя на процесс разделения использовались такие растворители, как гексан (T.кип. = 69 °C), диэтиловый эфир (T.кип. = 36 °C), бензол (T.кип. = 80,5 °C) и хлороформ (T.кип.= 61 °C).

pH среды оказывает значительное влияние на экстракцию исследуемого вещества из водной среды. В связи с этим было изучено влияние pH на извлечение левамизола от водной среды. Для этого с помощью стандартных фиксаторов (ГОСТ 8.135 – 74, pH стандарт), pH среды которых составляет 1,56; 3,56; 6,86; 9,18 и 12,45, готовили растворы. В плотно закрытые конические колбы ёмкостью 250 мл добавляли 50 мл растворов с различным pH, 1 мл рабочего раствора, содержащего левамизол с концентрацией 100 мкг/мл, и 10 мл органических растворителей и равномерно встряхивали в механическом шейкере в течение 15 мин. Пробирки оставляли на 5 мин для разделения слоев. После полного разделения слоев слой органического растворителя фильтровали в сухие фарфоровые чашки с использованием 5 г безводного сульфата натрия. Фильтровальную бумагу промывали 3-5 мл органического растворителя и добавляли к основному экстракту. Органические растворители из экстрактов упаривали в потоке горячего воздуха до тех пор, пока не остался сухой остаток. Сухой остаток растворяли в 0,1 М серной кислоты до 10 мл и анализировали методом УФ-спектрофотометрии [4, 5, 6]. Количество левамизола в водной среде определяли на основании предварительно построенного калибровочного графика. Результаты приведены в таблице 1 и на рисунке 1.

Анализ литературы показал, что степень извлечения большинства веществ из водного слоя с использованием органических растворителей зависит от наличия электролитов при экстракции. Во многих случаях электролиты помогают извлечению большего количества веществ из водной

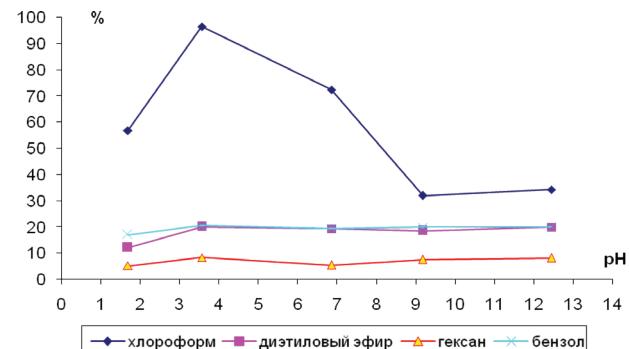


Рис. 1. Результаты влияния природы органических растворителей и pH среды на экстракцию левамизола из водных сред

Таблица 2. Результаты влияния электролитов и степени экстракции на экстракцию левамизола из водных сред

Электролит	Степень экстракции и количество извлеченного левамизола							
	однократная экстракция		двуухратная экстракция		трехкратная экстракция		четырехкратная экстракция	
	мкг	%	мкг	%	мкг	%	мкг	%
Без электролита	37,0	37,02	72,6	72,62	96,5	96,59	97,6	97,64
(NH ₄) ₂ SO ₄	27,7	27,77	70,3	70,34	92,3	92,37	93,5	93,55
NaCl	27,0	27,04	69,4	69,42	90,3	90,35	92,7	92,72

среды. При этом под действием электролитов растворимость вещества в воде снижается, они также используются при разложении образовавшихся эмульсий или осаждении белков. Однако в некоторых случаях скорость извлечения веществ из водных растворов значительно снижается под действием электролитов.

В судебной химии в качестве электролитов широко используются соли сульфата аммония и хлорида натрия, которые также обладают указанными выше свойствами. Поэтому было изучено влияние этих электролитов на процесс извлечения левамизола из водного слоя.

Исследование влияния электролитов на скорость экстракции проводилось следующим образом. Готовили 5%, 25% и насыщенные растворы хлорида натрия и сульфата аммония. Затем в делительную воронку добавляли 9 мл раствора с pH = 3,56, 2 мл электролита и 1 мл рабочего раствора, содержащего 100 мкг левамизола и экстрагировали в вышеуказанных условиях. Также были выполнены 1, 2, 3, 4-кратные экстракции хлороформом, чтобы изучить влияние количества экстракций на полный переход исследуемого вещества в органический слой. Органические растворители из экстрактов упаривали до сухого остатка. Сухой остаток растворяли в 0,1 М серной кислоты до 10 мл и анализировали методом УФ-спектрофотометрии.

В ходе исследования изучалась экстракция левамизола из биологических жидкостей. При выделении левамизола из биологических жидкостей использовали разработанные выше условия его извлечения из водной среды.

Готовили модели биологических жидкостей, проправленные левамизолом, в количестве 1 мг. 5 мл пробу крови доводили до pH 3-4 0,1 М серной кислотой и экстрагировали 10 мл хлороформом в течение 10 мин. Затем кровь в смеси центрифугировали в течение 5 мин (3000 об / мин)

Таблица 3. Результаты экстрагирования левамизола из крови и мочи

Биологическая жидкость	Определено		Статистическая обработка данных
	мг	%	
Кровь	0,64	64,15	f=4; T (95%,4) =2,78;
	0,61	61,73	$\bar{O}=63,46$; S ₂ =1,9415;
	0,65	65,17	S=1,3933; Sx=0,6231;
	0,63	63,89	$\Delta X=3,8736$; $\Delta \bar{O}=1,7323$
	0,62	62,37	$\varepsilon=6,1038\%$; $\bar{\varepsilon}=2,7297\%$
Моча	0,73	73,59	f=4; T (95%,4) =2,78;
	0,75	75,25	$\bar{O}=73,76$; S ₂ =1,3340;
	0,74	74,62	S=1,1550; Sx=0,5165;
	0,72	72,55	$\Delta X=3,2109$; $\Delta \bar{O}=1,4359$
	0,72	72,82	$\varepsilon=4,3528\%$; $\bar{\varepsilon}=1,9466\%$

для осаждения белков. Центрифугат осторожно переливали в делительную воронку и отделяли слой хлороформа. Процесс экстракции повторяли 2 раза с 10 мл хлороформа. Хлороформные экстракты объединяли и пропускали через фильтровальную бумагу, содержащую 5 г безводного сульфата натрия. Органический растворитель из фильтрата упаривали при комнатной температуре. Остаток растворяли в 5 мл 96% этилового спирта, затем очищали от балластных примесей с помощью метода ТСХ и количество определяли методом УФ-спектрофотометрии.

25 мл мочи, содержащей 1 мг левамизола, доводили до pH среды 3-4 0,1 М серной кислотой и экстрагировали 10 мл хлороформом в течение 10 мин. Раствору давали отстояться в течение 10 мин, и слой хлороформа переносили в фарфоровую чашу через фильтр, содержащий 5 г безводного сульфата натрия. Процесс экстракции повторяли 2 раза с 10 мл хлороформа, экстракты объединяли и упаривали при комнатной температуре. Остаток растворяли в 5 мл 96% этилового спирта, затем очищали от посторонних веществ с помощью метода ТСХ, и количество анализировали методом УФ-спектрофотометрии.

Результаты

Из данных, приведенных в таблице 1, можно видеть, что максимальное количество левамизола (96,59%) было экстрагировано из водной среды при pH = 3,56 с помощью хлороформа. Данные таблицы 2 показывают, что электролиты, использованные в процессе экстракции из растворов левамизола, не оказали существенного влияния. По результатам анализа было признано целесообразным проводить трехкратную экстракцию левамизола из водной среды хлороформом при pH сред 3-4.

Данные таблицы 3 показывают, что при рекомендованных условиях экстракции из крови и мочи левамизол был изолирован в среднем на 63,46% и 73,76% соответственно.

Выводы

Полученные результаты показали, что разработанные условия экстракции могут быть использованы для изоляции левамизола из биологических жидкостей (кровь, моча) при острых отравлениях. Экспресс-методы выделения и анализа левамизола позволяют быстро обнаружить вещество, которое стало причиной отравления, и оказать неотложную медицинскую помощь отравившимся пациентам.

Литература

1. Мищенко Е. Чем нас лечат: Декарис. Изгнать паразитов без СМС и рецепта. <https://indicator.ru> [Mishchenko E. Chem nas lechat: Dekaris. Izgnat' parazitov bez sms i retsepta. https://indicator.ru. In Russian].

2. Архипов И.А. Антигельминтики: фармакология и применение. 2009:405. [Arkhipov I.A. Antigel'mintiki: farmakologiya i primenenie. 2009:405. In Russian].
3. Байзольданов Т.Б., Байзольданова Ш.Т. Руководство по токсикологической химии ядовитых веществ, изолируемых методами экстракции. Алматы: ТОО. «Марья». 2003:410. [Bayzoldanov T.B., Bayzoldanova Sh.T. Rukovodstvo po toksikologicheskoy khimii yadovitykh veshchestv, izoliruemых metodami ekstraktsii. Almaty: TOO. «Mar'ya». 2003:410. In Russian].
4. Усманалиева З.У. Разработка обнаружения и определения левамизола из биологических материалов методом ВЭЖХ. Инфекция, иммунитет и фармакология. 2020;2:174-177. [Usmanalieva Z.U. Razrabotka obnaruzheniya i opredeleniya levamizola iz biologicheskikh materialov metodom VEZhKh. Infektsiya, immunitet i farmakologiya. 2020;2:174-177. In Russian].
5. Усманалиева З.У., Абдугаффаров М.С., Рохаталиева М.А. Количественный анализ левамизола. Материалы IV Международной научно-практической конференции. Харьков Ревстраційне посвідчення UkrIHTEI №430 від 13 серпня 2019:571. [Usmanalieva Z.U., Abdugaffarov M.S., Rokhatalieva M.A. Kolichestvennyy analiz levamizola. Materiali IV Mizhnarodnoi naukovo-praktichnoi konferentsii. Kharkiv Revstratsiyne posvidcheniya UkrIHTEI №430 vid 13 serpnya 2019:571. In Russian].
6. Усманалиева З.У., Рохаталиева М.А., Абдугаффаров М.С. Хроматоспектрофотометрический анализ левамизола. Материалы IV Международной научно-практической конференции. Ревстраційне посвідчення UkrIHTEI №430 2019:572. [Usmanalieva Z.U., Rokhatalieva M.A., Abdugaffarov M.S. Khromatospektrofotometricheskiy analiz levamizola. Materiali IV Mizhnarodnoi naukovo-praktichnoi konferentsii. Revstratsiyne posvidcheniya UkrIHTEI №430 2019:572. In Russian].

LEVAMIZOLNI BIOLOGIK SURTILARDAN EKSTRAKSIYALASH USLUBINI ISHLAB CHIQISH

Z.U. USMANALIEVA, K.S. RIZAEV, D.A. ZULFIKARIEVA, M.O. ROHATALIEVA

Toshkent farmatsevtika instituti

Maqsad. O'tkir zaharlanish holatlarida bemorga shoshilinch tibbiy yordam ko'rsatish uchun zaharlanish sababini to'g'ri aniqlash kerak. Sud-kimyo ekspertizasida zaharli moddani aniqlash uchun qon va peshobni tahlil qilishda ushbu moddani biologik suyuqliklardan ajratib olish muhimdir. Ushbu ishning maqsadi laboratoriya hayvonlarining biologik suyuqliklaridan levamizolni ekstraksiya qilish yordamida ajratib olish uslubini ishlab chiqishdan iborat.

Material va uslublar. Levamisolni laboratoriya hayvonlarining biologik suyuqliklaridan ajratib olishning optimal uslubini ishlab chiqish uchun levamizol avval suvli muhitdan har xil sharoitda ajratib olingan. Organik erituvchi tabiatining ajratish jarayoniga ta'sirini o'rGANISH uchun bir nechta erituvchilardan foydalanilgan. Levamizolni suvli muhitdan olishiga muhitning pH qiymatining ta'siri ham o'rGANildi.

Natijalar. Tahlil natijalariga ko'ra, levamizolni suvli muhitdan xloroform bilan pH 3-4 da uch marta ekstraksiyalashni amalga oshirish maqsadga muvofiq deb topildi. Ushbu usul levamizolni laboratoriya hayvonlarining qoni va siydigidan ajratishda ishlatalig'an.

Kalit so'zlar: levamisol, ekstraksiya, biologik suyuqliklar.

Сведения об авторах:

Усманалиева Зумрад Уктамовна – кандидат фармацевтических наук, доцент, заведующая кафедрой токсикологической химии Ташкентского фармацевтического института.

Email: usmanalieva1970@mail.ru

Ризаев Камал Сайдакбарович – доктор медицинских наук, ректор Ташкентского фармацевтического института.

Зулфикариева Дилноза Алишеровна – доктор фармацевтических наук, доцент кафедры токсикологической химии Ташкентского фармацевтического института.

Рохаталиева Мунира Ойбек кизи – студентка 3 курса факультета промышленной фармации Ташкентского фармацевтического института.

Поступила в редакцию: 05.06.2021

About authors:

Usmanalieva Zumrad Uktamovna – PhD, Associate Professor, Head of the Department of Toxicological Chemistry, Tashkent Pharmaceutical Institute.
Email: usmanalieva1970@mail.ru

Rizaev Kamal Saidakbarovich – Doctor of Medical Sciences, Rector of the Tashkent Pharmaceutical Institute.

Zulfikarieva Dilnoza Alisherovna – Doctor of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Toxicological Chemistry, Tashkent Pharmaceutical Institute.

Rohatalieva Munira Oybek kizi – 3rd year student of the Faculty of Industrial Pharmacy of the Tashkent Pharmaceutical Institute.

Received: 05.06.2021