



ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 340.67:343.612.1:615.276

ИЗОЛИРОВАНИЕ НИМЕСУЛИДА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

В.К. ШОРМАНОВ
Д.А. ГЕРАСИМОВ
С.Г. ГАЛУШКИН

*Курский
государственный
медицинский
университет*

e-mail: r-wladimir@yandex.ru

В качестве изолирующего агента для извлечения нимесулида из биологического материала предложен ацетон. Определены оптимальные условия изолирования нимесулида из ткани печени трупа человека ацетоном и дана количественная оценка результатов изолирования.

Ключевые слова: нимесулид, изолирование, судебно-химический анализ, ТСХ, спектрофотометрия.

Введение. Нимесулид (4-нитро-2-феноксифенилметансульфонамид) – нестероидное противовоспалительное средство, проявляющее анальгезирующую, жаропонижающую и противовоспалительную активность. Нимесулид является основным действующим веществом препаратов Нимулид, Нимесил, Найз, Актасулид и др. Его фармакологические эффекты широко используются при лечении различных патологий суставов, а также болях различного генеза.

Нимесулид по химической структуре является веществом, относящимся к производным соединений нитроанилиновой структуры. По физическим свойствам он представляет собой кристаллы от слабо-желтого до желтого цвета, хорошо растворимые в этаноле, ацетонитриле, диметилформамиде, ацетоне, хлороформе и ограниченно растворимые в гексане и воде [2, 5, 12].

Данное лекарственное вещество обладает значительной токсичностью для теплокровных организмов. LD₅₀ для крыс составляет от 163 мг/кг при внутрибрюшинном введении и от 200 мг/кг при пероральном введении. Для мышей LD₅₀ составляет от 216 мг/кг при внутрибрюшинном введении и от 392 мг/кг при пероральном введении [12].

В доступной литературе встречается описание многочисленных случаев отравления людей нимесулидом, в том числе и с летальным исходом [7, 8, 10, 15-17].

Кроме этого, зарегистрированы случаи острых отравлений теплокровных животных (собаки, кошки, крысы) [9, 13-14].

Широкое применение нимесулида в качестве лекарственного средства, его токсичность и наличие случаев летального отравления обуславливают необходимость изучения этого соединения в химико-токсикологическом отношении [1].

Вопросы химико-токсикологического анализа данного вещества остаются недостаточно изученными. Существующие методики изолирования и определения нимесулида и близких по структуре соединений в биологическом материале обладают недостаточно высокой экспрессностью и селективностью [3, 4-6, 11].

Целью исследования явилось изучение изолирования нимесулида из биологического материала изолирующими агентами различной природы и подбор оптимальных условий изолирования (объема изолирующего агента, времени и кратности настаивания).

Материалы и методы исследования. Объектом исследования явилась субстанция нимесулида, соответствующая требованиям нормативной документации (ФС N 012824/03-040411), структура и чистота которой дополнительно были подтверждены методами ИК-, Н-ЯМР и ГХ-МС анализа.

Изучали особенности изолирования нимесулида из биологического материала растворителями различной химической природы: водой и водными растворами кислот и щелочей (0,1 н. раствор гидроксида натрия, 8% раствор уксусной кислоты), карбоновыми кислотами (ледяная уксусная кислота), сложными эфирами карбоновых кислот (уксусный ангидрид), кетонами (ацетон), спиртами (метанол, этанол, пропанол-1, пропанол-2, бутанол-1, изобутанол), гетероциклическими кислородсодержащими соединениями (диоксан), алканами (гексан), галогеналканами (метилхлорид, хлороформ, 1,2-дихлорэтан, тетрачлорметан), а также аренами (бензол, толуол, о-ксилол), сложными и простыми эфирами (диэтиловый эфир, этилацетат, пропилацетат, бутилацетат), нитрилами (ацетонитрил).

Для этого готовили модельные смеси исследуемого вещества и мелкоизмельченной трупной печени человека, которые выдерживали при 18-20°C в течение 1,5 часа после их приготовления. Осуществляли двукратное изолирование нимесулида при соотношении изолирующего агента и биологического материала 2:1 (по массе). Продолжительность каждого настаивания составляла 45 минут. Оба извлечения, полученные из каждой модельной смеси, объединяли, отфильтровывали на фильтре, предварительно промытом изолирующим агентом, и часть объединенного извлечения наносили на пластины ВЭТСХ типа «Сорбфил» с люминесцентным индикатором и хроматографировали, используя подвижную фазу толуол-ацетонитрил в соотношении (7:3) в присутствии вещества-свидетеля. На хроматограммах нимесулид обнаруживался в виде темного пятна с желтоватой окантовкой на более светлом общем фоне пластины в УФ-свете и в виде светлого-жёлтого пятна в видимом свете. Значение R_f составляло $0,74 \pm 0,03$. Элюирование нимесулида из сорбента осуществляли диметилформамидом. Количество анализируемого вещества определяли методом спектрофотометрии при аналитической длине волны равной 439,4 нм. Расчеты осуществляли по уравнению калибровочного графика.

С помощью описанной выше схемы изолирования, очистки и определения нимесулида исследовали зависимость величины степени извлечения рассматриваемого вещества из биологического материала от продолжительности контакта изолирующей жидкости с биологическим материалом, кратности настаивания и количественного соотношения изолирующего агента и биологической ткани.

Изучалась зависимость степени извлечения нимесулида оптимальным изолирующим агентом от концентрации анализируемого соединения в биологическом объекте. В каждом случае 25,00 г мелко измельченной трупной печени человека, содержащей определенное количество нимесулида (от 2,50 до 50,00 мг), заливали 50 г ацетона и выдерживали в течение 45 минут при периодическом перемешивании. Извлечение сливали с твердого остатка, а процесс настаивания повторяли по описанной выше схеме. Отдельные извлечения объединяли и отфильтровывали на фильтре, предварительно промытом ацетоном. 0,3 мл полученного фильтрата наносили на хроматографическую пластину ВЭТСХ «Сорбфил» с люминесцентным индикатором в виде полосы и осуществляли хроматографирование в присутствии вещества-свидетеля в стеклянной камере объемом 600 см³, используя в качестве элюента систему растворителей толуол-ацетонитрил (7:3). Участок хроматограммы с анализируемым веществом вырезали и элюировали веществом 5 мл диметилформамида в течение 15 минут. Оптическую плотность элюата измеряли на СФ-2000 в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм при аналитической длине волны равной 439,4 нм. В качестве фона использовали элюат, полученный в контрольном опыте. Количественное содержание рассматриваемого вещества рассчитывали с помощью уравнения калибровочного графика.

Результаты исследования и их обсуждение. В данном случае уравнение калибровочного графика имело вид:

$$A = 0,07482 \cdot C - 0,0003123,$$

где A – оптическая плотность; C – концентрация, мкг/мл;

Результаты зависимости изолирования нимесулида из трупной печени от природы изолирующего агента представлены на рис. 1.

Сравнение результатов изолирования показало, что наибольшая степень извлечения достигается при использовании в качестве изолирующего агента ацетона.

Установлено, что максимальная степень извлечения нимесулида из трупной печени ацетоном достигается при продолжительности настаивания не менее 45 минут (рис. 2).

Исследование зависимости степени извлечения нимесулида от кратности настаивания показало, что для достаточно полного извлечения рассматриваемого вещества из трупной печени необходимо двукратное настаивание биологического

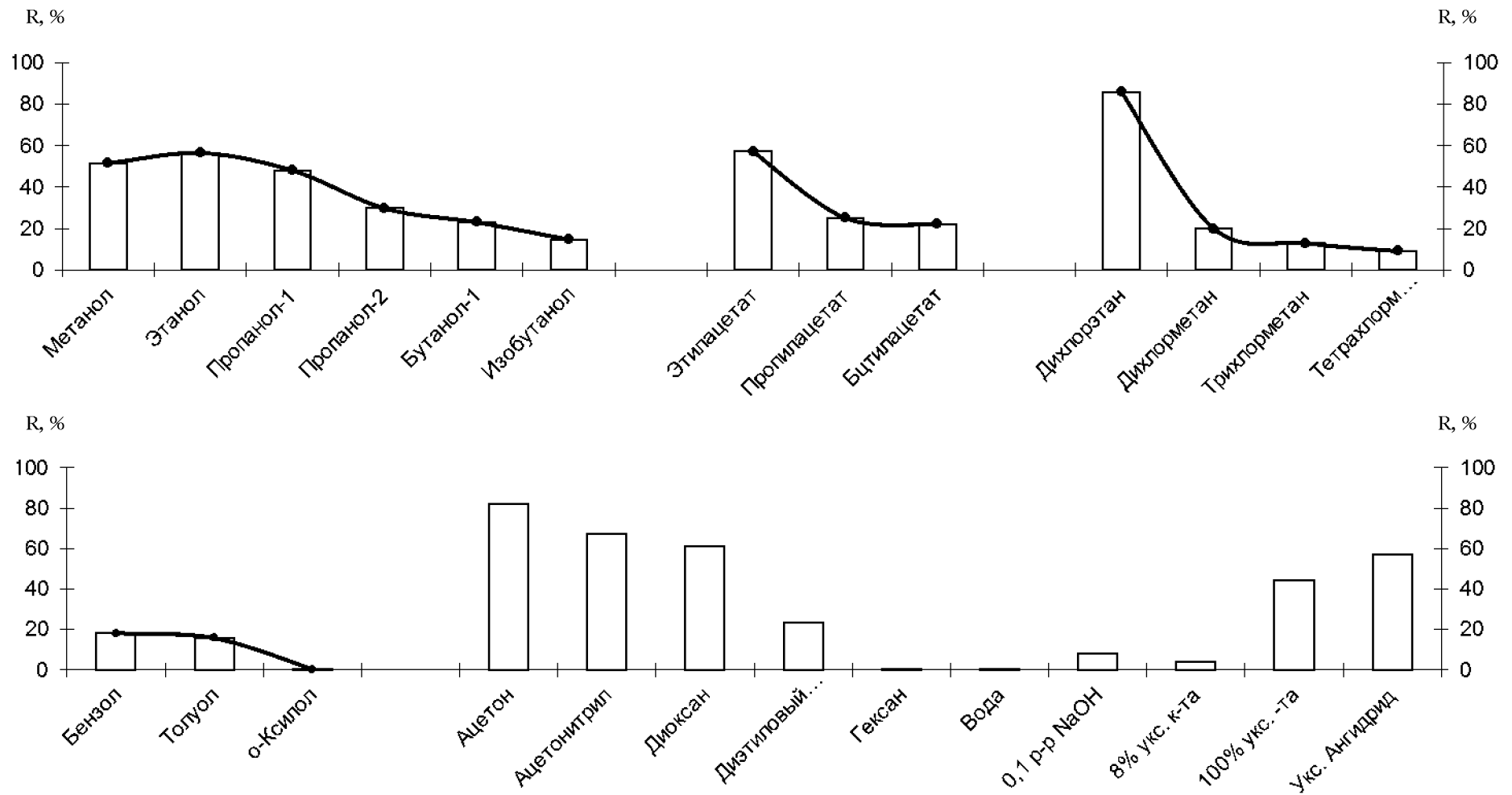


Рис. 1. Зависимость степени извлечения (R, %) нимесулида из ткани печени от природы изолирующего агента (двукратное изолирование, соотношение изолирующего агента и биологического материала 2:1 (по массе))

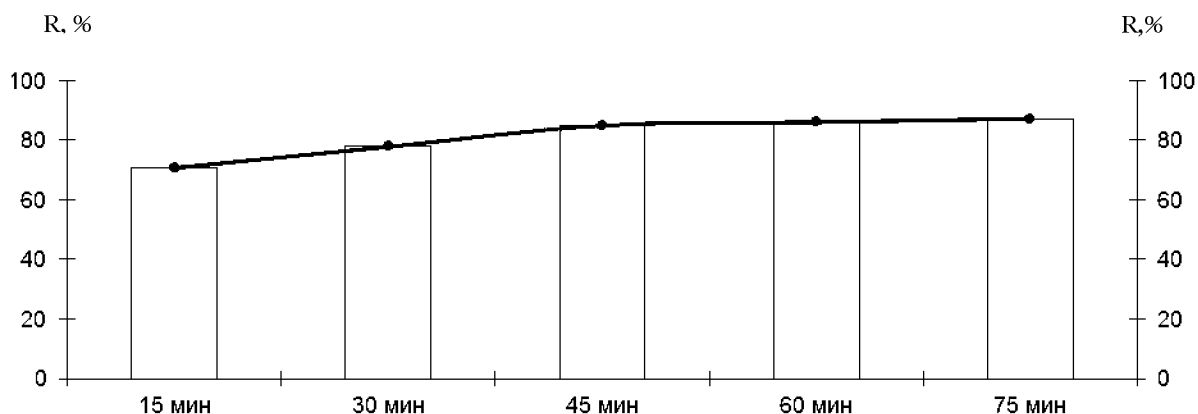


Рис. 2. Зависимость степени извлечения (R, %) нимесулида из ткани печени от времени (двукратное изолирование ацетоном, соотношение изолирующего агента и биологического материала 2:1 (по массе))

Таблица 1

Зависимость степени извлечения (R, %) нимесулида из ткани печени от соотношения количества биоматериала и ацетона и от кратности настаивания (n=5)

Взято вещества, мг	Масса ацетона, г	Кратность настаивания	Найдено вещества	
			мг	%
12,5	25	1	3,67	29,38
		2	3,14	25,13
		1+2	6,81	54,51
		3	2,75	21,99
		1+2+3	9,56	76,50
		4	1,56	12,44
12,5	50	1+2+3+4	11,12	88,94
		1	6,26	50,09
		2	4,12	32,94
		1+2	10,38	83,03
		3	1,59	12,70
		1+2+3	11,97	95,73
12,5	62,5	4	0,35	2,78
		1+2+3+4	12,31	98,51
		1	6,60	52,80
		2	3,92	31,38
		1+2	10,52	84,18
		3	1,40	11,17
12,5	75	1+2+3	11,92	95,35
		4	0,36	2,90
		1+2+3+4	12,28	98,25
		1	7,33	58,60
		2	3,38	27,02
		1+2	10,70	85,62
12,5	100	3	1,38	11,02
		1+2+3	12,08	96,64
		4	0,16	1,28
		1+2+3+4	12,37	98,92
		1	7,86	62,88
		2	3,10	24,82
12,5	100	1+2	10,88	87,05
		3	1,35	10,82
		1+2+3	12,23	97,87
		4	0,07	0,54
		1+2+3+4	12,30	98,41



материала с изолирующим агентом при условии, что количество ацетона в каждом случае должно превышать количество биологического материала как минимум в 2 раза по массе (табл. 1).

Как свидетельствуют данные эксперимента, представленные в табл. 2, увеличение содержания нимесулида в модельных смесях в достаточно широком интервале концентраций (2,50-50,00 мг) при постоянной массе навески ткани печени (25,00 г) сопровождается лишь незначительным изменением значений степени извлечения, не превышающим 1%. Это обстоятельство позволяет предположить, что взаимодействие молекул нимесулида со структурными элементами ткани печени не приводит к образованию достаточно прочных связей.

Таблица 2

Зависимость степени извлечения (R, %) нимесулида из ткани печени от количества нимесулида и биологического материала (по массе) (n = 5; P = 0,95)

Внесено нимесулида, мг в 25 г биоматериала	Найдено, %				
	\bar{X}	S	$S_{\bar{x}}$	$\Delta \bar{X}$	ϵ
50,0	84,06	2,04	0,91	2,54	3,02
25,0	83,89	2,09	0,93	2,59	3,09
12,5	83,66	2,13	0,95	2,65	3,17
5,0	83,58	2,35	1,05	2,92	3,49
2,5	83,35	2,71	1,21	3,37	4,04

Использование в качестве изолирующего агента ацетона и предложенные условия изолирования позволяют достичь достаточно высокой степени извлечения анализируемого вещества из ткани печени трупов. Открываемый минимум составляет 0,5 мг нимесулида в 100 г биологического материала. Предложенная методика достаточно хорошо воспроизводима, отличается простотой выполнения, не требует применения сложной аппаратуры и значительных затрат времени на воспроизведение. Она может быть использована в практике при проведении экспертизы в случае отравления нимесулидом.

Выводы:

1. Изучена возможность использования ацетона в качестве изолирующего агента при микро-токсикологическом исследовании нимесулида.
2. Определены оптимальные условия изолирования нимесулида ацетоном из биологического материала.
3. Дана количественная оценка изолирования ацетоном рассматриваемого вещества из модельных смесей с тканью печени.

Литература

1. Доброриз, А.М. Обнаружение нимесулида в биологическом материале / А.М. Доброриз // Судебно-медицинская экспертиза. – 2009. – Т. 52, № 4. – С. 32-34.
2. Зайцева, А.С. Химико-токсикологическое исследование отдельных нитропроизводных анилина : автореф. дис. ... канд. фарм. наук (14.04.02) / А.С. Зайцева; Курск. КГМУ. – Курск, 2012. – 23 с.
3. Заздравных, Н.А. Изолирование и идентификация нимесулида в биологическом материале / Н.А. Заздравных, И.В. Стаценко, Л.Г. Воронкова // Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики. – 2008. – № 13. – С. 75-78.
4. Особенности определения отдельных нитропроизводных анилина в биологических объектах в тонком слое обращеннофазового сорбента / В.К. Шорманов, А.С. Шилова, Ю.А. Сухомлинов, Д.А. Герасимов // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2011. – Т. 11, № 3. – С. 407-414.
5. Шорманов, В.К. Сохраняемость нимесулида и его основных метаболитов в гнилостно-разлагающемся трупном материале / В.К. Шорманов, Д.А. Герасимов, С.Г. Галушкин, Л.Е. Сипливая // Актуальные проблемы судебно-медицинской экспертизы : сб. тезисов науч.-практ. конф. с междунар. участием, г. Москва, 17-18 мая 2012 г. – М., 2012. – С. 271-273.
6. Шорманов, В.К. Определение изомеров нитроанилина в тонком слое нормальнофазового сорбента / В.К. Шорманов, Д.А. Герасимов, А.С. Шилова // Биотехнология. Биомедицинская инженерия и технология современных социальных практик : сб. тр. Всерос. науч.-практ. конф. – Курск : КГМУ, 2009. – С. 171-174.
7. Effects of the European restrictive actions concerning nimesulide prescription: a simulation study on hepatopathies and gastrointestinal bleedings in Italy / M. Venegoni, R. Da Cas, F. Menniti-Ippolito, J. Traversa // Ann. Ist. Super. Sanita. – 2010. – Vol. 46. – № 2. – P. 153-157.



8. Fatal hepatotoxicity secondary to nimesulide / G. Merlani, M. Fox, H.P. Oehen et al. // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 2001. – № 57. – P. 321-326.
9. Hepatotoxicity studies of nimesulide in litters of rat / P.B. Patel, T.K. Patel, S. Patni, et al. // *NJIRM.* – 2011. – Vol. 2, № 1. – P. 16-21.
10. Lithium poisoning and the use of nimesulide / M. Bocchia, G. Bertola, D. Morganti et al. // *Recenti Prog. Med.* – 2001. – Vol. 92, № 7-8. – P. 462.
11. New ultra-violet spectrophotometric method for the estimation of nimesulide / S. Chandran, S. Sagar, K.P. Priya, R.N. Saha // *Drug Dev. Ind. Pharm.* – 2000. – Vol. 26, № 2. – P. 229-234.
12. Nimesulide sc-200623: Material safety data sheet // Santa Cruz biotechnology (Canada). – Santa Cruz: CHEMWATCH, 2010. – 10 p.
13. Nimesulide toxicity in dogs / N. Ramesh, K. Jayakuma, K. Narayana et al. // *Ind. J. Pharmacol.* – 2001. – № 33. – P. 217-218.
14. Nimesulide-induced acute biliary tract injury and renal failure in a kitten: a case report / M.K. Borku, M. Guzel, M.C. Karakurun et al. // *Veterinari Medicina.* – 2008. – Vol. 53, № 3, P. 169-172.
15. Nimesulide-induced acute hepatitis / E. Cholongitas, D. Couleenti, K. Petraki, G.V. Papatheodoridis // *Annals of Gastroenterology.* – 2003. – Vol. 16, № 4, P. 359-362.
16. Nimesulide-induced hepatotoxicity and fatal hepatic failure / H.H. Tan, W.M.C. Ong, S.H. Lai, W.C. Chow // *Singapore Med. J.* – 2007. – Vol. 48, № 6, P. 582-585.
17. Schattner, A. Fatal hepatitis and renal failure during treatment with nimesulide / A. Schattner, N. Sokolovskaya, J. Cohen // *J. Int. Medicine.* – 2000. – № 247. – P. 153-155.

NIMESULIDE ISOLATION OF BIOLOGICAL MATERIAL

V.K. SHORMANOV
D.A. GERASIMOV
S.G. GALUSHKIN

Kursk State Medical University

e-mail: r-wladimir@yandex.ru

As isolating agent for extraction of biological material nimesulide was proposed acetone. The optimal conditions for isolation of nimesulide from human cadaver liver with acetone were clarified and quantified isolation results were shown.

Keywords: nimesulide, isolation, forensic chemical analysis, TLC, spectrophotometry