



## **INTERACTIONS BETWEEN PROMETHAZINE AND OPIUM ALKALOIDS BASED ON EXPERIMENTS CARRIED OUT IN A RAT MODEL**

Małgorzata ALBERT, Zofia OLSZOWY, Rafał CELIŃSKI, Joanna KULIKOWSKA

*Department of Forensic Medicine, Medical University of Silesia, Katowice, Poland*

### **Abstract**

The mechanism underlying interactions between numerous bioactive poppy straw extract compounds taken simultaneously seems to be complex. The effect of opium alkaloids is modified by promethazine added to “compote” (Polish home-made poppy straw brew) by drug addicts. The aim of the present experimental study was to determine toxicokinetic parameters of opiates in “compote” enriched with promethazine and in non-enriched “compote”. The experimental model was male SPD rats. In their investigations, the authors employed poppy straw extracts supplied to the Department of Forensic Toxicology, Medical University of Silesia, as evidence in cases of drug offences. Initially, the  $LD_{50}$  dose of acute intraperitoneal toxicity for poppy straw extracts with (kp) and without promethazine supplementation (k) was calculated with reference to morphine. Based on blood analysis of rats divided into groups administered “k” and “kp” extracts at a dose of  $1/2 LD_{50}$ , as well as a dose of standard morphine with concentration corresponding to that in the extract (8.56 mg/ml 0.9% NaCl), basic toxicokinetic parameters of the opiates were determined. Identification and quantitative examination of morphine, codeine, monoacetylmorphine, papaverine, narceine and promethazine were performed using the high performance liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS) technique. The results of the present study allowed us to conclude that in acute exposure to the xenobiotic, the poppy straw extract enriched with promethazine shows a higher toxicity as compared to the extract with no promethazine added ( $LD_{50}$  of 83.8 mg/kg vs. 57.3 mg/kg, respectively). Promethazine supplementation to poppy straw extract (0.25 mg/ml of the “compote”) significantly changes the kinetics of the (simultaneously taken) opiates.

### **Key words**

Opiates; Promethazine; Interactions; LC-MS.

*Received 12 October 2007; accepted 29 October 2007*

### **1. Introduction**

The mechanism of pharmacological and toxic activity of a narcotic substance in the form of so-called “compote” (Polish home-made poppy straw brew) is complex and depends on the components of such an extract. Simultaneous usage by drug addicts of psychotropic substances that enhance and prolong intoxication or neutralise adverse effects of opiates additionally complicates the phenomenon. Such substances

intensify the potency of narcotics and at the same time pose a serious threat to health and life [2, 4, 7, 8, 11].

The most common additive to poppy straw extracts is promethazine. It enhances the effect of intoxication, facilitates self-administration of the narcotic in an intravenous or intramuscular injection, and through its cholinolytic, antihistamine and antiemetic activity reduces the adverse effects of opiates [5, 6]. The effects observed following the taking of a promethazine-enriched narcotic, which are perceived as beneficial by

a drug addict, may result from a synergistic interaction between the added medication and opium alkaloids [9, 13]. Such effects may, nevertheless, be harmful, directly preceding development of pathological lesions or dysfunctions. At continued exposure to the activity of such substances, noxious effects result from accumulation of a toxic compound or its metabolites in the body.

In the present study, the authors have attempted to assess the effect of interactions between opium alkaloids and promethazine on toxicokinetic parameters based on concentration values of morphine, codeine, monoacetylmorphine, papaverine and narceine determined in blood of rats administered a single intraperitoneal  $1/2 LD_{50}/kg$  dose of the narcotic with and without promethazine.

The implementation of the study required:

1. Determination of the  $LD_{50}$  toxicity for poppy straw extract relative to morphine.
2. Determination of the  $LD_{50}$  toxicity for poppy straw extract supplemented with promethazine.
3. Determination – based on testing blood collected from experimental rats at defined time intervals over 24 hours – of toxicokinetic parameters of opium alkaloids following administration of the above extracts.

## 2. Material and methods

### 2.1. Experimental conditions

The experiments were carried out following obtaining of permission from the Local Ethics Committee for Animal Experiments in Katowice (individual permission to perform animal experiments no. 27/03 dated 10.06.2003). The experimental model consisted of male Sprague Dowley (SPD) rats aged 3 months and with body mass of 200–250 g. The animals were provided by the Central Experimental Animal Breeding Farm, Medical University of Silesia, where the experiments were conducted. The rats were kept in the following living conditions:

- temperature – 20–22°C;
- relative air humidity – 50–60%;
- air exchange rate 12 times/h;
- artificial light;
- regulated circadian rhythm – 12/12 h.

The animals were fed granulated Murigram fodder and given tap water ad libitum. Access to water was allowed after 2 hours, and to fodder – after 5 hours following xenobiotic administration. During the experi-

ment, the animals were kept in separate breeding and metabolic cages.

In the experiments, the authors employed homemade poppy straw extract submitted to the Department of Forensic Toxicology as evidence in a drug case. Promethazine content in the drug-enriched extract was 0.25 mg/ml; the value was the mean promethazine concentration level determined in extracts provided for testing. The standard morphine solution prepared for the purpose of the experiment contained 8.56 mg of morphine hydrochloride in 1 ml of saline.

Employing the technique of high performance liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS), the authors performed qualitative and quantitative examinations of poppy straw extracts and biological materials collected from experimental animals, aimed at detection of morphine, codeine, monoacetylmorphine, papaverine, narceine and promethazine.

### 2.2. Description of experiment

The  $LD_{50}$  toxicity for poppy straw extracts with and without promethazine was determined using a method developed by Litchfield and Wilcoxon [12]. The medication-enriched and non-enriched extracts were administered intraperitoneally as a single dose, employing three dose potency values. Intraperitoneal injections are commonly used (interchangeably with IV injections) in view of the markedly similar absorption to that of IV administration. In the case of the poppy straw extract, the following doses were employed: 35 mg (with respect to morphine)/kg, 70 mg/kg and 105 mg/kg, while the promethazine-enriched extract was administered at a dose of 24.5 mg/kg, 49 mg/kg and 73.5 mg/kg.

Each dosage level was employed in 14 animals (84 rats). Follow-up was carried out for 15 days and the number of rats that died within 48 hours was recorded. The median lethal dose ( $LD_{50}$ ) of acute intraperitoneal toxicity determined for the investigated extracts (k and kp) constituted the basis for determining the dose administered to rats from the experimental group.

Toxicokinetic examinations were carried out on a representative group of 270 animals.

Each group included 90 rats, which were weighed and subsequently received a single intraperitoneal  $1/2 LD_{50}/kg$  dose with a volume of 1 ml/100 g of body mass:

- group I (k) – poppy straw extract;
- group II (kp) – poppy straw extract supplemented with promethazine;

– group III (m) – standard morphine hydrochloride solution in the dose equivalent to narcotics administered in the extract.

Materials for analysis were collected at 15 predetermined time intervals (0.5 h; 1 h; 1,5 h; 2 h; 2,5 h; 3 h; 4 h; 5 h; 6 h; 7 h; 8 h; 10 h; 12 h; 20 h and 24 h) in the course of a 24-hour follow-up. At each defined interval, six rats from the given group were decapitated and blood samples were drawn.

### 2.3. Preparation of extracts from biological material

Isolation of opiates and promethazine from biological materials was carried out employing the liquid-liquid extraction method with preliminary sample deproteinisation [1, 3]. Two grams of blood were diluted with 2 ml of Tris buffer, pH = 8.5, and left in an ultrasound bath for 15 min. Subsequently, 2 ml of acetonitrile was added to the samples to achieve deproteinisation, and the samples were centrifuged at 2000 g for 15 min. The resultant supernatant was chloroform-extracted. The chloroform extract was evaporated and the dry residue was dissolved in 0.5 ml of methanol. The methanol extract was examined using the high pressure liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method.

### 2.4. Selection of analytical conditions

The samples were analysed using an LCQ Finnigan Mat liquid chromatograph/mass spectrometer. The working conditions of the liquid chromatograph and mass spectrometer were established based on preliminary tests that preceded the main body of the study. The following analytical variant was employed:

1. Chromatographic separation of samples was performed using a high performance liquid chromatograph equipped with:
  - a TSP P4000 pump operating in gradient mode;
  - a 10 l sample loop (Rheodine);
  - a TSP UV2000 detector with wavelength range of 200–400 nm;
  - a Hypersil BDS C-18 chromatography column (Thermo Quest) with a pre-column.
2. The gradient system of liquid phase flow was employed. Mobile phases and their percentages are presented in Table I.
3. The investigated compounds were detected employing a mass spectrometer equipped with an ion trap, and the electrospray ionisation (ESI) method.

Using the technique of high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry, the

authors performed qualitative and quantitative studies of selected opiates and promethazine. The resultant chromatographic distribution is illustrated in Figure 1.

TABLE I. COMPOSITION OF MOBILE PHASE

Phase A – ammonium formate 0.05 mol/l Phase B – 90% acetonitrile + 10% phase A Flow rate 0.3 ml/min		
Time [min]	[%] Phase A	[%] Phase B
0	95	5
2	95	5
30	30	70
32	30	70
40	95	5

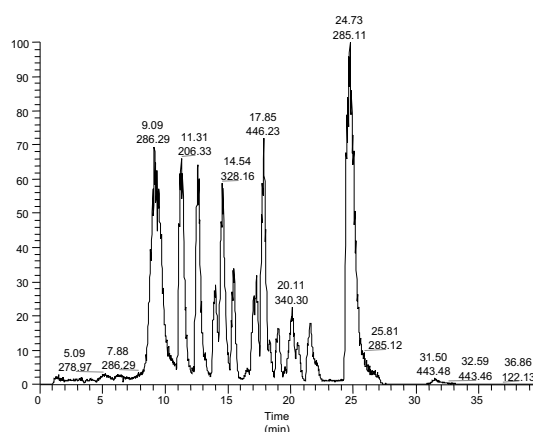


Fig. 1. Chromatographic separation of opiates and promethazine.

### 2.5. Calculation procedures

The preliminary phase of the procedure was determination of validation parameters for the LC-MS method employed in analyses of the investigated xenobiotics. The method was characterized using the following parameters: selectivity, specificity, linear range, detection threshold, precision (repeatability, reproducibility), accuracy and recovery. Validation parameters for selected opiates and clomipramine are listed in Table II.

An indirect method for determining substance concentration was employed. In stage 1, the authors determined the relationship between peak size and content on the basis of known content of a standard substance – clomipramine – in methanol solution. Standard solutions were obtained by dilutions. In stage 2, a reversed procedure was employed: based on the known peak surface, the content of investigated sub-

stances (morphine, codeine, monoacetylmorphine, papaverine, narceine) was determined and converted to a value per 1 g of biological material.

The experimental data were subjected to a preliminary analysis. The mean value of six measurements

taken at each time point was calculated along with the standard deviation. Using gross error detection, the authors rejected results that showed a fourfold difference from the calculated mean value.

TABLE II. VALIDATION PARAMETERS FOR OPIATES AND CLOMIPRAMINE

Xenobiotic	Morphine	MAM	Codeine	Papaverine	Narceine	Clomipramine	
Criterion	Characterisation						
Linearity [mg/l]	0.1–2	0.1–2	0.1–2	0.1–2	0.1–2	0.5–10	
LOQ [mg/l]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5	
LOD [ng]	20	20	10	10	10	10	
Precision	Repeatability [%]	3.36–12.8	3.78–10.15	1.25–5.60	1.15–2.2	0.96–2.1	1,15–4,48
	Reproducibility [%]	5.45–10.85	5.65–12.20	2.39–7.15	2.2–3.78	0.98–2.5	2,33–6,17
Bias/accuracy [%]	–3.45–9.78	3.60–12.20	–2.15–7.80	–1.17–4.3	2.7–9.18	–3.10–10.7	
Recovery [%]	72.15 ± 9.26	74.46 ± 10.2	93.33 ± 5.45	86.25 ± 2.55	91.7 ± 3.46	5.06 ± 8.93	
RSD [%]	4.34–10.12	3.88–9.65	3.15–10.18	3.42–9.9	3.5–7.78	6.58–13.63	

TABLE III. RESULTS OF THE QUANTITATIVE ANALYSIS OF MORPHINE IN THE BLOOD OF RATS COLLECTED AT SPECIFIC INTERVALS

Time of blood collection [h]	Xenobiotic [ g/g]					
	Morphine standard		Morphine k		Morphine kp	
	$x (n = 6)$	$s$	$x (n = 6)$	$s$	$x (n = 6)$	$s$
0.5	29.700	2.959	16.517	3.806	23.600	4.809
1	31.883	3.133	13.667	2.039	31.150	2.327
1.5	31.416	3.139	32.150	4.875	39.766	3.513
2	40.533	2.448	14.783	1.794	46.100	5.111
2.5	11.633	0.977	13.750	2.272	31.300	3.005
3	5.200	0.666	10.900	3.005	12.400	3.134
4	1.333	0.581	2.683	1.355	3.700	0.701
5	0.000	–	0.718	0.311	0.966	0.531
6	0.000	–	0.173	0.059	0.000	–
7	0.000	–	0.020	0.049	0.000	–
8	0.000	–	0.000	–	0.000	–
10	0.000	–	0.000	–	0.000	–
12	0.000	–	0.000	–	0.000	–
20	0.000	–	0.000	–	0.000	–
24	0.000	–	0.000	–	0.000	–

$x$  – arithmetic mean;  $s$  – standard deviation.

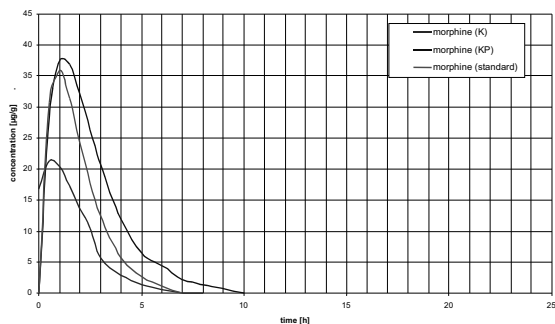


Fig. 3. Graph of changes in concentration of morphine administered in the form of standard morphine solution, poppy straw extract (k) and poppy straw extract with addition of promethazine (kp) observed in the blood of animals over 24 hours.

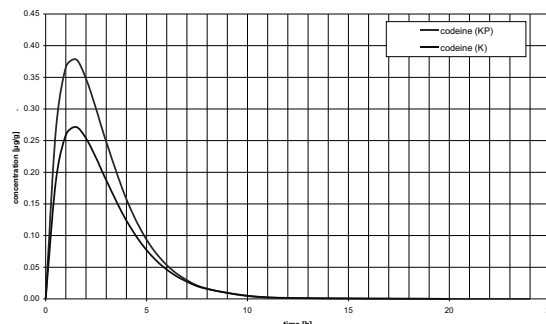


Fig. 4. Graph of changes in concentration of codeine administered in the form of poppy straw extract (k) and poppy straw extract with addition of promethazine (kp) observed in the blood of animals over 24 hours.

TABLE IV. RESULTS OF THE QUANTITATIVE ANALYSIS OF CODEINE IN THE BLOOD OF RATS TAKEN AT SPECIFIC INTERVALS

Time of blood collection [h]	Xenobiotic [ g/g]			
	Codeine k		Codeine kp	
	$x (n = 6)$	$s$	$x (n = 6)$	$s$
0.5	0.160	0.028	0.155	0.025
1	0.206	0.025	0.333	0.052
1.5	0.376	0.048	0.435	0.039
2	0.245	0.033	0.516	0.029
2.5	0.181	0.023	0.261	0.041
3	0.153	0.017	0.176	0.028
4	0.128	0.014	0.105	0.018
5	0.081	0.013	0.071	0.009
6	0.051	0.011	0.055	0.008
7	0.033	0.005	0.030	0.007
8	0.020	0.004	0.017	0.005
10	0.015	0.002	0.012	0.004
12	0.009	0.001	0.007	0.004
20	0.005	0.002	0.003	0.002
24	0.003	0.002	0.000	—

$x$  – arithmetic mean;  $s$  – standard deviation.

TABLE V. RESULTS OF THE QUANTITATIVE ANALYSIS OF MONOACETYLMORPHINE IN THE BLOOD OF RATS COLLECTED AT SPECIFIC INTERVALS

Time of blood collection [h]	Xenobiotic [ g/g]			
	MAM k		MAM kp	
	$x (n = 6)$	$s$	$x (n = 6)$	$s$
0.5	0.039	0.010	0.046	0.006
1	0.051	0.013	0.059	0.009
1.5	0.105	0.011	0.113	0.016
2	0.068	0.022	0.103	0.033
2.5	0.034	0.016	0.064	0.008
3	0.022	0.006	0.028	0.003
4	0.015	0.003	0.018	0.002
5	0.010	0.002	0.010	0.002
6	0.005	0.001	0.006	0.002
7	0.002	0.002	0.000	—
8	0.000	—	0.000	—
10	0.000	—	0.000	—
12	0.000	—	0.000	—
20	0.000	—	0.000	—
24	0.000	—	0.000	—

$x$  – arithmetic mean;  $s$  – standard deviation.

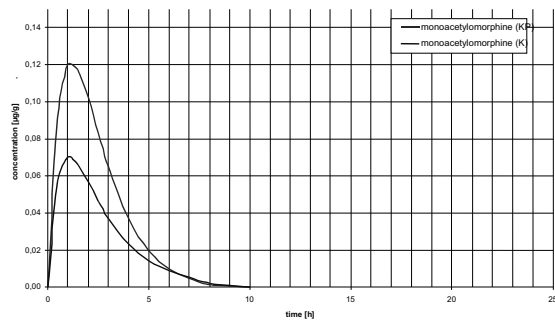


Fig. 5. Graph of changes in concentration of MAM administered in the form of poppy straw extract (k) and poppy straw extract with addition of promethazine (kp) observed in the blood of animals over 24 hours.

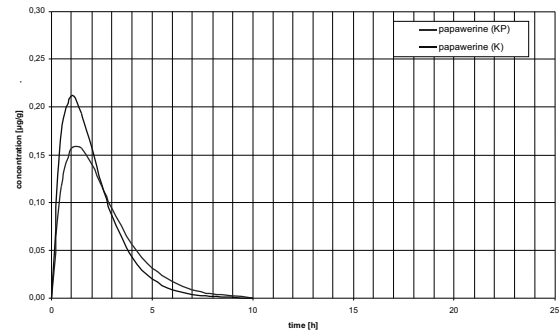


Fig. 6. Graph of changes in concentration of papaverine administered in the form of poppy straw extract (k) and poppy straw extract with addition of promethazine (kp) observed in the blood of animals over 24 hours.

TABLE VI. RESULTS OF THE QUANTITATIVE ANALYSIS OF PAPAVERINE IN THE BLOOD OF RATS COLLECTED AT SPECIFIC INTERVALS

Time of blood collection [h]	Xenobiotic [mg/g]			
	Papaverine k		Papaverine kp	
	$x (n = 6)$	$s$	$x (n = 6)$	$s$
0.5	0.156	0.041	0.092	0.017
1	0.189	0.047	0.120	0.013
1.5	0.269	0.053	0.154	0.022
2	0.139	0.026	0.263	0.069
2.5	0.090	0.014	0.104	0.022
3	0.070	0.016	0.050	0.019
4	0.041	0.004	0.027	0.008
5	0.032	0.003	0.014	0.005
6	0.024	0.003	0.009	0.002
7	0.017	0.001	0.004	0.003
8	0.008	0.001	0.000	–
10	0.000	–	0.000	–
12	0.000	–	0.000	–
20	0.000	–	0.000	–
24	0.000	–	0.000	–

$x$  – arithmetic mean;  $s$  – standard deviation.

TABLE VII. RESULTS OF THE QUANTITATIVE ANALYSIS OF NARCEINE IN THE BLOOD OF RATS COLLECTED AT SPECIFIC INTERVALS

Time of blood collection [h]	Xenobiotic [g/g]			
	Narceine k		Narceine kp	
	$x (n = 6)$	$s$	$x (n = 6)$	$s$
0.5	0.076	0.011	0.089	0.013
1	0.142	0.019	0.100	0.016
1.5	0.184	0.017	0.166	0.029
2	0.121	0.026	0.209	0.022
2.5	0.080	0.012	0.104	0.045
3	0.047	0.009	0.051	0.013
4	0.033	0.009	0.027	0.004
5	0.020	0.003	0.011	0.002
6	0.006	0.001	0.005	0.001
7	0.000	–	0.000	–
8	0.000	–	0.000	–
10	0.000	–	0.000	–
12	0.000	–	0.000	–
20	0.000	–	0.000	–
24	0.000	–	0.000	–

$x$  – arithmetic mean;  $s$  – standard deviation.

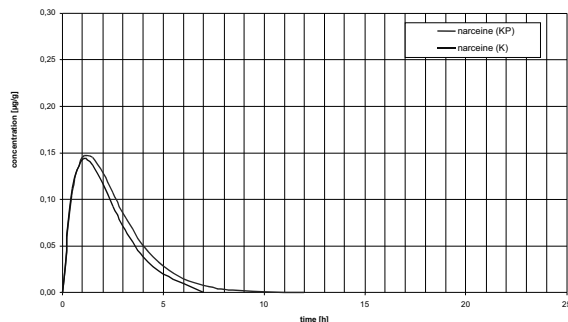


Fig. 7. Graph of changes in concentration of narceine administered in the form of poppy straw extract (k) and poppy straw extract with addition of promethazine (kp) observed in the blood of animals over 24 hours.

Mean concentration values were employed in mathematical determinations of appropriate toxicokinetic parameters. The employed PC-Nonlin 4.2 Series 4234331 software is commonly used in pharmacokinetic studies [10, 14]. The calculations were performed at the Chair of Toxicology, Collegium Medicum, Jagiellonian University in Krakow. A single-compartment model of changes in blood xenobiotic concentration values and first order reaction kinetics was adopted for the pharmacokinetic analysis.

### 3. Results

The determined concentration values [mg/ml] of opium alkaloids and an acetyl derivative of morphine in the investigated poppy straw extract (k) were as follows: morphine – 8.56; codeine – 1.25; noscapine – 0.23; narceine – 1.69; papaverine – 0.30; tebaine – 0.07; monoacetylmorphine – 2.73, heroine – 0.43. The concentration levels of opium alkaloids in the extract enriched with promethazine (kp) were the same, but the promethazine content was 0.25 mg/ml.

The median lethal dose ( $LD_{50}$ ) of acute intraperitoneal toxicity determined for SPD rats for particular types of extracts was as follows:  $LD_{50}$  for the poppy straw extract – 83.8 mg/kg, with the likelihood confidence interval = 0.05 <66.9 104.8>, and  $LD_{50}$  for the promethazine-enriched extract – 57.3 mg/kg, with the likelihood confidence interval = 0.05 <34.5 95.0>.

Results of the quantitative analysis of morphine, codeine, monoacetylmorphine, papaverine and narceine in the blood of rats collected over 24 hours were presented in tables III–VII. The changes in their concentrations were shown in Figures 2–6.

The kinetic processes of selected opium alkaloids administered to rats in the form of “compote” with and

without promethazine were quantitatively described by appropriate toxicokinetic parameters. The toxicokinetic parameters of opiates determined on the basis of analysing the blood of rats administered a single averaged intraperitoneal xenobiotic dose  $1/2 LD_{50}$  (35.33 mg/kg) are presented in Table VIII.

### 4. Discussion

The experimentally determined differences in  $LD_{50}$  values – 83.8 mg/kg for the poppy straw extract (k) and 57.3 mg/kg for the promethazine-enriched extract (kp) – confirmed the higher toxicity of the extract supplemented with the medication in conditions of acute exposure to xenobiotics. The increased toxicity was most likely the result of a synergistic interaction between opiates and promethazine in the CNS-depressing effect of the former.

The presented toxicokinetic investigations constituted an attempt at evaluating the interaction based on differences between the calculated parameters for k, kp and standard morphine. The comparison of the determined toxicokinetic parameters of opium alkaloids administered to rats in the form of two versions of so-called “compote” demonstrated that enriching the extract with promethazine affected the kinetics of simultaneously administered opiates. The addition of promethazine resulted in a diminished absorption rate, and thus a prolonged time needed for achieving the maximum concentration ( $C_{max}$ ) of all determined alkaloids except codeine.

In the case of the promethazine-enriched extract, the values of  $C_{max}$  (38.0) and the area under the curve –  $AUC$  (122.0) for morphine, its acetyl derivative ( $C_{max} = 0.12$ ;  $AUC = 0.38$ ) and codeine ( $C_{max} = 0.38$ ;  $AUC = 1.39$ ) – the most active compounds, responsible for inducing intoxication – were distinctly higher as compared to the values obtained for the same compounds following administration of the extract without the medication: morphine ( $C_{max} = 21$ ;  $AUC = 64.52$ ), monoacetylmorphine ( $C_{max} = 0.07$ ;  $AUC = 0.24$ ) and codeine ( $C_{max} = 0.27$ ;  $AUC = 1.05$ ). The authors demonstrated statistically that promethazine affected the kinetics of simultaneously administered papaverine. Papaverine was absorbed at a slower rate, reaching a lower value of  $C_{max}$  (0.16) over a longer time ( $t_{max} = 1.24$ ); it was also eliminated from blood over a longer time. In the case of narceine, the observed differences in toxicokinetics between administration in the form of “compote” with promethazine and without promethazine were the smallest.

TABLE VIII. OPIATE TOXICOKINETIC PARAMETERS DETERMINED ON THE BASIS OF RAT BLOOD ANALYSIS

Xenobiotic		$AUC$ [mg h/l]	$t_{max}$ [h]	$C_{max}$ [mg/l]	Elimination rate constant $K$ [h <sup>-1</sup> ]	Biological half-life ( $t_{0.5}$ ) [h]	Half absorption time [h]
Morphine	Standard	90.76	0.92	35.95	1.09	0.63	0.65
	“Compote”	64.52	1.10	21.47	0.90	0.76	0.76
	“Compote” with promethazine	122.34	1.18	38.00	0.84	0.82	0.81
Codeine	“Compote”	1.05	1.40	0.27	0.84	0.81	1.16
	“Compote” with promethazine	1.39	1.34	0.38	0.74	0.92	0.93
Monoacetyl morphine	“Compote”	0.24	1.05	0.07	1.63	0.42	0.41
	“Compote” with promethazine	0.38	1.17	0.12	0.86	0.80	0.81
Papaverine	“Compote”	0.57	1.00	0.21	0.98	0.70	0.68
	“Compote” with promethazine	0.54	1.24	0.16	0.79	0.87	0.85
Narceine	“Compote”	0.43	1.11	0.14	0.89	0.77	0.76
	“Compote” with promethazine	0.49	1.23	0.14	0.80	0.86	0.84

Mathematical determination of parameters describing absorption, distribution and elimination based on changes of blood opiate concentration levels gives a broad picture of the relationship between the administered dose of a narcotic and the concentration attained. Thus, the achieved values of these parameters allow conclusions to be drawn on the enhanced potency and toxicity of a promethazine-enriched narcotic substance.

## 5. Conclusions

1. In conditions of acute exposure (to xenobiotic/s), promethazine-enriched poppy straw extract exhibits a higher toxicity. Enhanced toxicity is confirmation of the synergistic effect of opiates and promethazine in their depressing effect on the CNS.
2. The addition of promethazine to poppy straw extract changes the kinetics of simultaneously taken opiates. Promethazine supplementation is the reason for changes occurring in absorption and elimination of morphine, monoacetylmorphine and codeine, and thus of possible enhanced intoxicating and toxic activity of the narcotic.

## References

1. Bujak-Giżycka B., Korona R., Kłys M., Badania nad przydatnością metod ekstrakcji wybranych ksenobiotyków z materiału biologicznego, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1999, 49, 67–77.
2. Janica J., Niemcunowicz-Janica A., Narkomania w aspekcie sądowo-lekarskim, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 2000, 50, 59–62.
3. Kłys M., Rojek S., Masełko J., Znaczenie metod chromatograficznych sprzężonych z spektrometrią mas (LC/MS, GC/MS) w identyfikacji leków do celów orzecznictwa sądowo-lekarskiego na przykładzie chlorfenoksyminy, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 2003, 53, 137–149.
4. Kołowski J., Wachowiak R., Rozmiary i skutki nadużywania środków psychoaktywnych w kazuistycie Zakładu Medycyny Sądowej AM w Poznaniu w latach 1990–1999, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 2000, 50, 63–69.
5. Kompendium farmakologii, Janiec W. [red.], PZWL, Warszawa 2001.
6. Kostkowski W., Kubikowski P., Farmakologia, PZWL, Warszawa 1994.
7. Kulikowska J., Sybirska H., Kształtowanie się poziomu opiatów we krwi osób zmarłych w przebiegu narkotyzowania się, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 2000, 50, 105–111.



8. Nasiłowski W., Sybirska H., Szczepański J., Niektóre aspekty lekarskie i toksykologiczne narkomanii na podstawie praktyki Zakładu Medycyny Sądowej Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1976, 26, 293–295.
9. Quach T. T., Duchemin A. M., Rose C., In vivo occupation of cerebral histamine H1 receptors evaluated with [3H] mepyramine may predict sedative properties of psychotropic drugs, *European Journal of Pharmacology* 1979, 60, 391–392.
10. Sjöquist B., Stjernschantz J., Ocular and systemic pharmacokinetics of latanoprost in humans, *Survey of Ophthalmology* 2002, 47, S6–S12.
11. Soja A., Celiński R., Kulikowska J. [i in.], Ocena zatruc śmiertelnych w narkomanii na podstawie praktyki analityczno-toksykologicznej Katedry Medycyny Sądowej Śląskiej Akademii Medycznej w latach 1996–2002, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 2003, 53, 33–38.
12. Starek A., Toksykometria [w:] Toksykologia – wybrane zagadnienia, Brandys J. [red.], Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 1999.
13. Stockley's drug interactions, Stockley I. H. [ed.], Pharmaceutical Press, London 2002.
14. Strenkoski-Nix L. C., Ermer J., DeCleene S. [et al.], Pharmacokinetics of promethazine hydrochloride after administration of rectal suppositories and oral syrup to healthy subjects, *American Journal of Health-System Pharmacy* 2000, 57, 1499–1505.

---

**Corresponding author**

Małgorzata Albert  
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej  
Śląski Uniwersytet Medyczny  
ul. Medyków 18  
PL 40-752 Katowice  
e-mail: medsad@slam.katowice.pl

---

## INTERAKCJE PROMETAZyny Z ALKALOIDAMI OPIUM OKREŚLONE NA PODSTAWIE DOŚWIADCZENIA PRZEPROWADZONEGO NA SZCZURACH

### 1. Wstęp

Mechanizm działania farmakologicznego i toksycznego środka narkotycznego w postaci tzw. „kompotu” jest złożony i zależy od znajdujących się w nim składników. Równoczesne przyjmowanie przez osoby uzależnione środków psychotropowych wzmacniających i wydłużających stan odurzenia czy też znoszących efekty uboczne opiatów, stanowi dodatkowo o złożoności zjawiska. Substancje te, zwiększając siłę działania środka odurzającego, powodują jednocześnie poważne zagrożenie dla zdrowia i życia [2, 4, 7, 8, 11].

Najczęściej do wyciągów ze słomy makowej dodawana jest prometazyna. Potęguje ona efekt odurzenia, ułatwia przyjęcie narkotyku w iniekcji dożylniej lub domięśniowej, a także poprzez działanie cholinolityczne, przeciwhistaminowe i przeciwwymiotne, łagodzi skutki działań ubocznych opiatów [5, 6]. Efekty po przyjęciu narkotyku wzbogaconego prometazyną, oceniane jako korzystne w odczuciu narkomana, mogą być wynikiem interakcji synergistycznej pomiędzy dodanym lekiem a alkaloidami opium [9, 13]. Działania takie mogą być jednak szkodliwe, bezpośrednio poprzedzając zmiany patologiczne lub zaburzenia czynnościowe. Przy stałym narażeniu na działanie tych substancji wynikają one z kumulacji związku toksycznego lub jego metabolitów w organizmie.

W niniejszej pracy podjęto próbę oceny następstw oddziaływania pomiędzy alkaloidami opium a prometazyną na parametry toksykokinetyczne w oparciu o stężenia morfiny, kodeiny, monoacetylmorfiny, papaweryny i narceiny oznaczane we krwi szczurów obciążanych jednorazowo podaną dootrzewnowo dawką  $1/2 LD_{50}/kg$  m.c. narkotyku bez i z prometazyną.

Realizacja tematu wymagała:

1. Wyznaczenia dawki  $LD_{50}$  dla wyciągu ze słomy makowej względem morfiny.
2. Wyznaczenia dawki  $LD_{50}$  dla wyciągu słomy makowej z dodatkiem prometazyny.
3. Ustalenia, na podstawie badania krwi pobieranej od zwierząt w określonych odstępach czasu w ciągu 24 godzin, parametrów toksykokinetycznych dla alkaloidów opium po podaniu ww. wyciągów.

### 2. Materiał i metody

#### 2.1. Warunki przeprowadzenia badań

Badania przeprowadzono po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Katowicach (zezwolenie indywidualne na wykonanie doświadczeń na zwierzętach nr 27/03 z dnia 10.06.2003 r.). Modelem doświadczalnym były szczury (samce) szczepu Sprague Dowley (SPD) w wieku 3 miesięcy, o masie ciała 200–250 g. Zwierzęta pochodziły z Centralnej Zwierzętarni Doświadczalnej Śląskiej Akademii Medycznej, gdzie przeprowadzono eksperyment. Zwierzęta przebywały w pomieszczeniach, w których zachowane były następujące warunki:

- temperatura 20–22°C;
- względna wilgotność powietrza 50–60%;
- wymiana powietrza 12 razy/h;
- oświetlenie sztuczne;
- rytm świetlny regulowany 12/12 h.

Zwierzęta karmiono paszą granulowaną Murigram i pojo no wodą wodociągową *ad libitum*. Dostęp do wody zapewniony był po 2 godzinach, a paszy po 5 godzinach od podania ksenobiotyku. W czasie doświadczenia zwierzęta przebywały w oddzielnych klatkach hodowlanych i metabolicznych.

W badaniach wykorzystano wyciąg ze słomy makowej otrzymany sposobem domowym, a dostarczony do Zakładu Toksykologii Sądowo-Lekarskiej jako dowód rzeczowy. Zawartość prometazyny w wyciągu wzbogaconym lekiem wynosiła 0,25 mg/ml. Było to średnie stężenie prometazyny oznaczane w wyciągach dostarczanych do badań. Przygotowany dla potrzeb eksperymentu roztwór wzorcowy morfiny zawierał 8,56 mg chlorowodoru morfiny w 1 ml soli fizjologicznej.

W oparciu o technikę wysokosprawną chromatografii cieczowej sprzężonej z detektorem masowym (LC-MS) wykonane zostały badania jakościowe i ilościowe wyciągów ze słomy makowej i materiału biologicznego pobranego od zwierząt doświadczalnych w kierunku obecności morfiny, kodeiny, monoacetylmorfiny, papaweryny, narceiny i prometazyny.

#### 2.2. Opis eksperymentu

Dawkę  $LD_{50}$  dla wyciągów ze słomy makowej bez i z dodatkiem prometazyny oznaczono metodą Litchfielda i Wilcoxon [12]. Wyciągi ze słomy makowej z do-

datkiem leku i bez dodatku podano szczurom jednorazowo w trzech zróżnicowanych dawkach dootrzewnowo. Iniekcja dootrzewnowa jest powszechnie zamieniana stosowana ze względu na bardzo podobne wchłanianie, jak przy podaniu dożylnym. Dla wyciągu ze słomy makowej stosowano dawki: 35 mg (w odniesieniu do morfiny)/kg m.c., 70 mg/kg m.c. i 105 mg/kg m.c., a dla wyciągu z dodatkiem prometazyny: 24,5 mg/kg m.c., 49 mg/kg m.c., 73,5 mg/kg m.c.

Na każdy poziom dawkowania przypadało 14 zwierząt (84 szczury). Obserwację prowadzono przez 15 dni, odnotowując liczbę zwierząt, które padły w ciągu 48 godzin. Wyznaczone medialne dawki śmiertelne toksyczności ostrej dootrzewnowej ( $LD_{50}$ ) dla badanych wyciągów (k i kp) stanowiły podstawę do określenia dawki podanej szczurom w grupie eksperymentalnej.

Badania toksykokinetyczne przeprowadzono na reprezentatywnej grupie 270 zwierząt.

W każdej grupie było 90 szczurów, którym, po zważeniu, drogą iniekcji dootrzewnowej podano jednorazowo dawkę  $1/2 LD_{50}$ /kg m.c. w objętości 1 ml/100 g m.c.:

- grupa I (k) – wyciąg ze słomy makowej;
- grupa II (kp) – wyciąg ze słomy makowej z dodatkiem prometazyny;
- grupa III (m) – roztwór wzorcowy chlorowodoru morfiny w dawce równoważnej do podawanych w roztworze narkotyków.

W ciągu 24-godzinnej obserwacji w wyznaczonych 15 przedziałach czasowych (0,5 h; 1 h; 1,5 h; 2 h; 2,5 h; 3 h; 4 h; 5 h; 6 h; 7 h; 8 h; 10 h; 12 h; 20 h i 24 h) pobierano materiał do badań. W wyznaczonym czasie po ekspozycji każdorazowo dekapitowano 6 szczurów z danej grupy i pobierano krew.

### 2.3. Przygotowanie ekstraktów z materiału biologicznego

Wysobnienie opiatów i prometazyny z materiału biologicznego przeprowadzono metodą ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz z wstępnym odbiałczeniem próbek [1, 3]. 2 g krwi rozcieńczono 2 ml buforu Tris o pH = 8,5 i pozostawiano na łaźni ultradźwiękowej przez 15 min. Następnie do próbek dodano 2 ml acetonitrylu w celu odbiałczania badanej próbki, po czym wirowano (przy obrotach 2000 g) przez 15 min. Uzyskany supernatant ekstrahowano chloroformem. Ekstrakt chloroformowy odparowywano, a suchą pozostałość rozpuszczano w 0,5 ml metanolu. Ekstrakt metanolowy badano metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej z detektorem masowym (LC-MS).

### 2.4. Dobór warunków analitycznych metody

Próbki analizowano na chromatografii cieczowym sprzężonym z detektorem masowym LCQ Finnigan Mat.

Warunki pracy chromatografu cieczowego oraz detektora masowego ustalono na podstawie wstępnych badań poprzedzających właściwą część pracy. Zastosowano następujący wariant analityczny:

1. Rozdział chromatograficzny próbek przeprowadzono, wykorzystując wysokosprawną chromatografię cieczową wyposażoną w:
  - pompę TSP P4000, pracującą w opcji gradientowego przepływu faz;
  - reodynę z pętlą o objętości nastrzyku 10 l;
  - detektor TSP UV2000 o zakresie długości fali 200–400 nm;
  - kolumnę chromatograficzną Hypersil BDS C-18 (Thermo Quest) z przedkolumną.

2. Zastosowano system gradientowego przepływu fazy ciekłej. Fazy ruchome oraz ich udział procentowy przedstawia tabela I.

3. Detekcję badanych związków przeprowadzono przy pomocy spektrometru masowego z pułapką jonową z zastosowaniem jonizacji w polu elektrycznym (ESI).

W oparciu o technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z detektorem masowym wykonane zostały badania jakościowe oraz ilościowe wybranych opiatów i prometazyny. Uzyskany rozdział chromatograficzny tych związków przedstawia rycina 1.

### 2.5. Zastosowana procedura obliczeniowa uzyskanych wyników

Wstępem do opracowanej procedury było wyznaczenie parametrów walidacyjnych dla metody LC-MS wykorzystywanej w analizach badanych ksenobiotyków. Charakterystykę metody przeprowadzono w oparciu o następujące parametry: selektywność, specyficzność, zakres liniowości, granica wykrywalności, granica oznaczalności, precyzja (powtarzalność, odtwarzalność), dokładność i odzysk. Parametry walidacyjne dla wybranych opiatów i klomipraminy zebrano w tabeli II.

W analizie zastosowano pośrednią metodę oznaczania stężeń substancji. W pierwszym etapie wyznaczono zależność wielkości piku na podstawie znanej zawartości substancji wzorcowej – klomipraminy w roztworze metanolem. Wzorcowe roztwory uzyskano na drodze rozcieńczeń. W drugim etapie zastosowano procedurę odwrotną: na podstawie znanej powierzchni piku ustalono zawartości badanych substancji (morfina, kodeina, monoacetylmorfina, papaweryna, narceina) z uwzględnieniem przeliczenia na 1 g materiału biologicznego.

Wstępnie przeprowadzono analizę uzyskanych danych eksperymentalnych. Wyznaczano średnią arytmetyczną z 6 pomiarów w każdym punkcie czasowym i odchylenie standardowe. Na podstawie prawa grubego błędu odrzucono wyniki, które różniły się czterokrotnie od wyliczonej wartości średniej.

Wartości średnie stężeń posłużyły do matematycznego określenia odpowiednich parametrów toksykokinetycznych. Zastosowany do obliczeń program komputerowy PC-Nonlin 4.2 No Seria 4234331 jest powszechnie stosowany w badaniach farmakokinetycznych [10, 14]. Obliczenia przeprowadzono w Katedrze Toksykologii CM Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. W analizie farmakokinetycznej przyjęty został model jednokompartimentowy zmian stężenia ksenobiotyku we krwi i kinetyka reakcji I rzędu.

### 3. Wyniki badań

Oznaczone stężenia [mg/ml] alkaloidów opium i acetylowej pochodnej morfiny w wyciągu ze słomy makowej (k) przeznaczonym do badań kształtowały się następująco: morfina – 8,56; kodeina – 1,25; noskapina – 0,23; narceina – 1,69; papaweryna – 0,30; tebaina – 0,07; monoacetylmorfina – 2,73, heroina – 0,43. Stężenia alkaloidów opium w wyciągu z dodatkiem prometazyny (kp) były analogiczne, natomiast zawartość prometazyny osiągnęła wartość 0,25 mg/ml.

Wyznaczona dla szczurów szczepu SPD medialna dawka śmiertelna toksyczności ostrej dootrzewnowej ( $LD_{50}$ ) dla poszczególnych rodzajów wyciągów wynosiła:  $LD_{50}$  wyciągu ze słomy makowej – 83,8 mg/kg m.c. przy przedziale ufności z prawdopodobieństwem = 0,05 <66,9÷104,8>, a  $LD_{50}$  wyciągu z dodatkiem prometazyny – 57,3 mg/kg m.c. przy przedziale ufności z prawdopodobieństwem = 0,05 <34,5÷95,0>.

Wyniki analizy ilościowej morfiny, kodeiny, monoacetylmorfiny, papaweryny i narceiny we krwi szczurów pobranej w ciągu 24 godzin przedstawiono w tabelach III–VII, natomiast zmiany stężeń obrazują ryciny 2–6.

Procesy kinetyczne wybranych alkaloidów opium podawanych szczurom w postaci „kompotu” z prometazyną i bez opisane zostały ilościowo za pomocą odpowiednich parametrów toksykokinetycznych. Parametry toksykokinetyczne opiatów wyznaczone w oparciu o analizę krwi szczurów po jednorazowym podaniu dootrzewnowo ksenobiotyku w uśrednionej dawce  $1/2 LD_{50}$  (35,33 mg/kg m.c.) przedstawiono w tabeli VIII.

### 4. Omówienie wyników

Wyznaczone eksperymentalnie różnice w wartościach  $LD_{50}$  – 83,8 mg/kg m.c. dla wyciągu ze słomy makowej (k) i 57,3 mg/kg m.c. dla wyciągu z dodatkiem prometazyny (kp) potwierdziły większą toksyczność wyciągu wzbogaconego tym lekiem w warunkach ostrego narażenia na ksenobiotyk. Zwiększona toksyczność była prawdopodobnie wynikiem interakcji o charakterze synergi-

stycznym opiatów i prometazyny w zakresie ich depresyjnego oddziaływania na OUN.

Podjęte badania w zakresie toksykokinetyki stanowiły próbę oceny interakcji na podstawie różnic pomiędzy wyliczonymi parametrami dla k, kp i wzorca morfiny. Porównania wyznaczonych parametrów toksykokinetycznych alkaloidów opium podawanych szczurom w postaci dwóch wersji tzw. „kompotu” wykazały, że wzbogacenie wyciągu prometazyną ma wpływ na kinetykę jednocześnie podanych opiatów. Dodatek prometazyny skutkowało zmniejszeniem szybkości wchłaniania, a zatem wydłużeniem czasu, w którym osiągnane było stężenie maksymalne ( $C_{max}$ ) wszystkich oznaczonych alkaloidów z wyjątkiem kodeiny.

W przypadku wyciągu wzbogaconego prometazyną wartości  $C_{max}$  (38,0) i pola pod krzywą  $AUC$  (122,0) dla morfiny, jej acetylowej pochodnej ( $C_{max} = 0,12$ ;  $AUC = 0,38$ ) i kodeiny ( $C_{max} = 0,38$ ;  $AUC = 1,39$ ) – związków najbardziej aktywnych i odpowiedzialnych za stan odurzenia – były wyraźnie wyższe w porównaniu z wartościami uzyskanymi dla tych samych związków po podaniu wyciągu bez dodatku leku: dla morfiny ( $C_{max} = 21$ ;  $AUC = 64,52$ ), monoacetylmorfiny ( $C_{max} = 0,07$ ;  $AUC = 0,24$ ) i kodeiny ( $C_{max} = 0,27$ ;  $AUC = 1,05$ ). Statystycznie wykazano również, iż współwystępowanie prometazyny ma wpływ na kinetykę jednocześnie przyjętej papaweryny. Papaweryna wchłania się wolniej osiągając mniejszą wartość  $C_{max}$  (0,16) w dłuższym czasie ( $t_{max} = 1,24$ ), jest również dłużej eliminowana z krwi. W przypadku narceiny obserwowane różnice w toksykokinetyce tego związku podawanego w postaci „kompotu” z dodatkiem prometazyny i bez były wyrażone najslabiej.

Określenie matematyczne parametrów wchłaniania, dystrybucji i eliminacji na podstawie zmiany stężeń opiatów we krwi obrazuje zależność pomiędzy podaną dawką narkotyku a osiąganym stężeniem. Uzyskane zatem wielkości parametrów pozwalają wnioskować o wzmożonej sile działania i toksyczności narkotyku wzbogaconego prometazyną.

### 5. Wnioski

1. W warunkach ostrego narażenia na ksenobiotyk większą toksyczność wykazuje wyciąg ze słomy makowej wzbogacony prometazyną. Wzmożenie toksyczności jest potwierdzeniem synergizmu opiatów i prometazyny w zakresie ich depresyjnego oddziaływania na OUN.
2. Dodatek prometazyny do wyciągu ze słomy makowej zmienia kinetykę przyjmowanych równolegle opiatów. Dodanie prometazyny jest przyczyną powstałych zmian w zakresie wchłaniania i eliminacji morfiny, monoacetylmorfiny i kodeiny, a tym samym prawdopodobnie wzmożenia oddziaływania odurzającego i toksycznego narkotyku.