

Булатов Р. М.,

*ассистент кафедры токсикологической химии
ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации*

Малкова Т. Л.,

*доктор фармацевтических наук, доцент,
заведующая кафедрой токсикологической химии
ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации*

ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РИСПЕРИДОНА И 9-ГИДРОКСИРИСПЕРИДОНА В МОЧЕ

Аннотация. Одним из представителей атипичных нейролептиков, применяемых для лечения шизофрении в качестве препарата первого выбора, является рисперидон. В организме он метаболизируется до 9-гидроксирисперидона, который обладает аналогичным фармакологическим действием. В зарубежной и отечественной литературе описаны случаи острых отравлений рисперидоном, в том числе с летальным исходом.

Разработаны методики изолирования рисперидона и 9-гидроксирисперидона в моче, их идентификация и количественное определение с помощью физико-химических методов (ТСХ, ВЭЖХ), которые могут быть включены в схему химико-токсикологического анализа изучаемых лекарственных веществ.

Ключевые слова: нейролептики, рисперидон, моча, анализ, отравления.

На сегодняшний день хорошо известен положительный опыт применения нейролептиков, но при этом одной из наиболее актуальных в современной клинической токсикологии является проблема острых отравлений данными препаратами. В психиатрической практике отравления препаратами этой группы составляют 10-15% [9].

Постановка проблемы. Условно нейролептики можно разделить на «типичные» и «атипичные» [7]. Самое общее отличие «атипичных» антипсихотиков от «типичных» заключается в более низкой степени сродства к дофаминовым D₂-рецепторам и наличию мультирецепторного профиля связывания (сродства к рецепторам других типов) [1].

Рисперидон (син. рисполепт, сперидан, ридонал, риссет) относится к группе «атипичных» нейролептиков (антипсихотических средств), производных бензизоксазола. Применяется чаще всего для лечения психозов при шизофрении, а также в терапии некоторых форм биполярного расстройства, психотической депрессии, обсессивно-компульсивного расстройства, синдрома Туретта и других заболеваний [7].

Фармакокинетические данные свидетельствуют о том, что рисперидон при приеме внутрь абсорбируется быстро и полностью, при этом пища не влияет на полноту и скорость абсорбции. Основной путь биотрансформации – гидроксилирование с образованием активного метаболита 9-гидроксирисперидона. Выводится преимущественно

почками (70%) и с фекалиями (15%) [1].

Основной метаболит рисперидона – 9-гидроксирисперидон, имеющий подобную химическую структуру и фармакологическое действие, является активным веществом с более длительным периодом полувыведения. На его основе создан лекарственный препарат под торговым названием «Инвега» [6].

В зарубежной и отечественной литературе описаны случаи острых отравлений рисперидоном, связанные с побочными эффектами, к которым относятся синдром удлиненного интервала QT [4; 11], злокачественный нейролептический синдром [10]. Также возникают случаи острых отравлений, связанные с использованием рисперидона с целью самоубийства, некоторые из них заканчиваются летальным исходом [5; 8]. Как правило, это возникает у пациентов, использующих данные лекарственные препараты в лечении. Несистематический прием препаратов или отказ от них приводит к обострению болезни, в связи с чем увеличивается вероятность суицида, в том числе с использованием данных лекарственных препаратов.

Анализ последних публикаций по теме исследования свидетельствует о том, что не было проведено систематических исследований по разработке методик изолирования из биологических объектов, а также идентификации рисперидона и его активного метаболита 9-гидроксирисперидона. Р.Г. Мансурова с соавторами опубликовала подходы к проведению судебно-химического анализа рисперидона в трупном материале хроматографическими методами [5]. Также имеются статьи Д.С. Лазаряна с соавторами, предлагающие методики определения рисперидона в таблетках и слюне [2; 3].

Установить присутствие рисперидона и его активного метаболита в организме и определить их количество при отравлениях позволяет химико-токсикологический анализ с использованием максимально чувствительных физико-химических методов определения.

Целью работы является разработка методики химико-токсикологического анализа рисперидона и 9-гидроксирисперидона в моче.

Изложение основного материала исследования. Для идентификации рисперидона и 9-гидроксирисперидона был использован метод ТСХ (нормально-фазный и обращенно-фазный варианты) и ВЭЖХ.

Проведенные исследования показали, что в нормально-фазном варианте величина R_f рисперидона и 9-гидроксирисперидона на пластинках «Сорбфил» имеет оптимальное значение при использовании системы бензол-диоксан-раствор аммония гидроксида 25% (6:3,5:2). Значение R_f , рассчитанное как среднее значение 5 повторений, составило для 9-гидроксирисперидона, рисперидона соответственно 0,41 и 0,47. Оптимальным детектором является реактив Драгендорфа, поскольку после обработки все вещества проявились (коричневое окрашивание).

В обращенно-фазном варианте максимальное разделение веществ (9-гидроксирисперидон, рисперидон) наблюдается в системе этанол-раствор аммония гидроксида 25%-вода (7:4:2,5). Значение величины R_f 9-гидроксирисперидона и рисперидона располагается в средней зоне на хроматографических пластинках. Значение R_f , рассчитанное как среднее значение 5 повторений, составило для 9-гидроксирисперидона, рисперидона 0,57 и 0,63 соответственно. Оптимальное детектирование достигается при использовании УФ-света (254 нм).

Следует отметить, что применяемые в обращенно-фазовом варианте ТСХ системы растворителей более стабильны ввиду отсутствия летучих органических растворителей, результаты ТСХ более воспроизводимы, деление веществ хорошее.

Для идентификации 9-гидроксирисперидона и рисперидона методом ВЭЖХ в своей работе мы использовали обращенно-фазный вариант с применением жидкостных хроматографов различных производителей, для которых были определены оптимальные условия хроматографирования. В качестве стандартных образцов были приготовлены метанольные растворы 9-гидроксирисперидона и рисперидона с концентрацией 10 мкг/мл.

Разделение исследуемых веществ, производимое на хроматографической колонке «Discovery C18» диаметром 4,6 мм, длиной 25 см, диаметр зерен сорбента 5 мкм, установленной в «Shimadzu LC-20 Prominence» с программным комплексом «LC Solutoins», оснащенным диодно-матричным детектором. Выбор оптимального состава подвижной фазы (элюента) проводили с использованием воды, буферных растворов (фосфатный pH 3,2, 6,4, ацетатный pH 3,2, 4,0, 5,2, 6,4) в смеси с ацетонитрилом и добавлением поверхностно-активных веществ (гексилсульфонат натрия (ГСН), лаурилсульфонат натрия (ЛСН)).

По результатам проведенных исследований предложены следующие условия анализа рисперидона и 9-гидроксирисперидона при совместном присутствии методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе «Shimadzu LC-20 Prominence»:

- подвижная фаза: ацетонитрил – буферный раствор (ацетатный pH=5,2), режим элюирования – градиентный (увеличение содержания ацетонитрила от 20% до 90% за 10 минут, 90% с 10 до 13 минут, от 90% до 20% с 13 до 20 минут);
- объем вводимой пробы – 30 мкл;
- детектор диодно-матричный (длины волн 280, 275, 253, 243 нм);
- скорость потока элюента – 1 мл/мин;
- температура колонки – 40°C.

В качестве параметра идентификации использовали УФ-спектры определяемых веществ. Времена удерживания 9-гидроксирисперидона, рисперидона составляют 9,33 и 9,82 мин. соответственно.

В разработанных условиях наблюдается хорошее разделение исследуемых веществ, полученные пики имеют правильную и симметричную форму. Добавление поверхностно-активных веществ ГСН, ЛСН и повышение температуры термостата колонки с 40°C до 80°C не повлияло на эффективность хроматографирования.

Установленная в жидкостном хроматографе «Милихром А-02» стальная колонка (диаметр – 2 мм, длина – 75 мм) упакована обращенно-фазным сорбентом «Prontosil» 120-5 C18, который представляет собой силикагель, модифицированный фазой C18. Размер частиц сорбента – 5 мкм.

Нами было исследовано хроматографическое поведение рисперидона и 9-гидроксирисперидона с использованием подвижных фаз на основе метанола, ацетонитрила с фосфатным буфером и водой.

При подборе условий хроматографирования первоначально использовали широко применяемые в обращенно-фазном варианте ВЭЖХ смеси ацетонитрила и метанола с водой в изократическом режиме. Были апробированы элюенты состава ацетонитрил-вода и метанол-вода в следующих соотношениях: 80:20; 70:30; 50:50; 30:70; 20:80. Однако в этих системах наблюдалось плохое разделение исследуемых веществ и хроматографические пики во всех случаях имели асимметричную форму.

Следующим этапом было использование вместо воды фосфатного буфера (pH=3) с ацетонитрилом и метанолом в тех же соотношениях.

Было определено, что наиболее оптимальным является элюент состава ацетонитрил-фосфатный буфер (pH=3) 30:70, при котором вещества имеют хорошее разделение и симметричные формы пиков, но относительно малое время удерживания. Это может неблагоприятно сказаться при дальнейшем исследовании, так как после проведения изолирования из биологического материала в анализируемой пробе помимо исследуемых веществ будут обнаруживаться балластные и соэкстрактивные вещества, которые плохо сорбируются и имеют небольшие времена удерживания и могут перекрывать пики исследуемых веществ.

Таким образом, на основании полученных данных об оптимальном составе элюента при изократическом режиме, необходимо подобрать условия градиентного хроматографирования, которое позволит увеличить время удерживания веществ, оптимальное их разделение и исключит возможность перекрывания пиков исследуемых веществ балластными и соэкстрактивными веществами.

По результатам проведенных исследований предложены следующие условия анализа рисперидона и 9-гидроксирисперидона методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе «Милихром А-02»:

- хроматографическая колонка диаметром 2 мм, длиной 75 мм;
- неподвижная фаза «Prontosil C18». Диаметр зерен сорбента – 5 мкм;
- подвижная фаза: ацетонитрил – фосфатный буфер (pH=2), режим элюирования – градиентный (увеличение содержания ацетонитрила с 10% до 50% за 15 минут);
- объем вводимой пробы – 5 мкл;
- детектирование при 8-ми длинах волн (210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм);
- постоянная времени детекции – 0,34 сек;

- скорость потока элюента – 100 мкл/мин. Режим элюирования – градиентный;
- температура колонки – 35°C.

Разработка методики идентификации исследуемых веществ осуществлялась при помощи базы данных «ВЭЖХ-УФ», с использованием времен удерживания и 8-волнового детектирования (210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм), определение проводилось по спектральным соотношениям.

В качестве параметра идентификации использовали спектральные соотношения определяемых веществ и УФ-спектры, снятые непосредственно в режиме хроматографирования. Время удерживания 9-гидроксириперидона и рисперидона составляют 10,07 и 10,66 мин. соответственно.

Далее исследование проводилось с использованием хроматографа «Agilent Technologies Series 1200», оснащенного диодной матрицей «UV-VIS» и масс-селективным детектором Quadrupole Agilent Technologies 6120. Условия хроматографического разделения таковы:

- предколонка Zorbax Eclipse SB-C8, колонка Zorbax Eclipse XDB-C18, (150x2,1 мм);
- элюент – метанол (MeOH) – 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде;
- градиентный режим, скорость подачи элюента 0,25 мл/мин;
- температура термостата 40°C;
- объем вводимой пробы 1 мкл;
- время анализа 30 мин;
- детектирование спектров в диапазоне длины волн от 190 до 400 нм, с выделением аналитической длины волны 275 нм.

Масс-детектор работал в комбинированном режиме: положительной химической ионизации при атмосферном давлении (APCI) и положительной ионизации электростатическим распылением (ES) с регистрации ионов от 100 до 500 а.е.м. (режим SCAN), в режиме положительной химической ионизации при атмосферном давлении и положительной ионизации электростатическим распылением с регистрацией молекулярного иона 411 а.е.м. – рисперидон и 427 а.е.м. – 9-гидроксириперидон (режим SIM), напряжение на фрагментаторе 100 V, температура осушающего газа 350°C, температура испарителя 200°C, поток осушающего газа азота 5 л/мин, давление на небулайзере 40 psig, напряжение на капилляре 1000 V, ток коронного разряда 1 мкА, напряжение на заряжающем электроде 2000 V. Программное обеспечение «Agilent ChemStation» – автоматизированное управление работой прибора, сбором данных, количественной обработке информации и выводом сообщения результатов.

В качестве параметра идентификации использовали так же УФ-спектры определяемых веществ. Времена удерживания 9-гидроксириперидона и рисперидона составляют 15,13 и 15,71 мин. соответственно.

Изучение условий экстракции токсических веществ органическими растворителями имеет значение как для выделения их из водных растворов, так и для разработки наиболее эффективных методов изолирования этих веществ из биологических объектов.

Впервые нами было изучено влияние на процесс экстракции 9-гидроксириперидона и рисперидона сле-

дующих факторов: природы органического растворителя и pH буферного раствора.

В качестве экстрагентов применяли не смешивающиеся с водой органические растворители, наиболее часто употребляемые в химико-токсикологическом и фармацевтическом анализе: диэтиловый эфир, хлороформ, хлороформ-бутанол (9:1), хлороформ-изопропанол (9:1), этилацетат, метилхлорид. Для создания определенного значения pH в растворе использовали универсальные буферные смеси Бриттона-Робинсона. Контролировали pH с помощью универсального иономера ЭВ-74.

Установлено, что 9-гидроксириперидон и рисперидон лучше извлекаются из водного раствора метилхлоридом при pH 11, и степень извлечения составляет 69,01% и 67,24% соответственно.

Результаты проведенных исследований по подбору оптимальных условий анализа исследуемых веществ методом ВЭЖХ легли в основу разработки методики количественного определения. Для количественного определения исследуемых веществ нами предложен метод абсолютной калибровки. В качестве параметра, характеризующего содержание исследуемого вещества в пробе, мы использовали площадь хроматографического пика.

Для построения калибровочного графика готовили стандартные растворы 9-гидроксириперидона и рисперидона в метаноле. Растворы хроматографировали в разработанных условиях, измеряли площади хроматографических пиков и строили калибровочный график. Каждая точка на калибровочном графике была получена как среднее 5 параллельных измерений.

Линейная зависимость между концентрацией растворов и площадью хроматографического пика наблюдается во всем интервале выбранных концентраций.

Выводы. Разработаны оригинальные экономичные методики изолирования, обнаружения и количественного определения 9-гидроксириперидона и рисперидона в биологической жидкости (моча). Использование методов ТСХ, ВЭЖХ позволяет достоверно установить факт отравления изученными препаратами. Доказано и обосновано применение этих методик в практике химико-токсикологических лабораторий, что позволяет сократить время диагностирования отравления изученными препаратами, дать оценку степени отравления для оказания своевременной медицинской помощи пострадавшему.

Литература:

1. Регистр лекарственных средств России: энцикл. лекарств. Вып. 14 / гл. ред. Г.Л. Вышковский. – М.: РЛС – 2005, 2006. – С. 786-787.
2. Лазарян Д.С., Использование хроматографических и спектрофотометрических методов в химико-токсикологическом анализе вещественных доказательств небиологического происхождения, содержащих рисперидон, клозапин, сертиндол / Д.С. Лазарян, И.П. Ремезова // *Вопр. биол., мед. и фарм. химии.* – 2013. – № 3. – С. 31-37. – Библиогр.: с. 36 (7 назв.).
3. Лазарян Д.С. Химико-токсикологический анализ рисперидона и галоперидола в слюне / Д.С. Лазарян, И.П. Ремезова, Т.И. Максименко // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук.* – 2012. – Т. 14, № 5(3). – С. 751-753.
4. Лиманкина И.Н. Синдром удлиненного интервала QT и проблемы безопасности психофармакотерапии / И.Н. Лиманкина // *Вестник аритмологии.* – 2008. – С. 66-71.
5. Мансурова Р.Г. Изолирование рисперидона из биологического материала и его идентификация / Р.Г. Мансурова, Л.Д. Смирнова // *Современные проблемы медико-криминалистических, судеб-*

- но-химических и химико-токсикологических экспертных исследований: сб. материалов Всерос. науч.-практ. конф., посвящ. памяти проф. Ю.М. Кубицкого (31 октября – 01 ноября 2007 г., Москва) // под ред. В.А. Клевно. – М.: РИО ФГУ «РЦСМЭ Росздрава», 2007. – С. 256-258.
6. Снедков Е.В. Инвега (палиперидон): методические рекомендации для врачей по использованию препарата при лечении больных шизофренией / Е.В. Снедков // Психиатрия и психофармакотерапия. – 2009. – № 6. – С. 24-29.
 7. Харкевич Д.А. Фармакология: учеб. для студентов мед. вузов / Д.А. Харкевич. – 9-е изд., перераб., доп. и испр. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 750 с., портр., ил. – Указ. препаратов: С. 729-750.
 8. Bodiford E. An overdose of risperidone / E. Bodiford, A.C. Springfield // J. Anal. Toxicol. – 1996. – № 20 (3). – P. 202-3.
 9. Advances in the pharmacotherapy of psychotic disorders / J.M. Davis, P.G. Janicak, S. Preskorn, F.J. Jr. Ayd // Principles and Practice of Psychopharmacotherapy. – 1994. – № 1. – P. 1-14.
 10. Gurrera R. A comparison of diagnostic criteria for neuroleptic malignant syndrome / Chang S., Gurrera R., Romero J. // J. Clin. Psychiatry. – 1991. – № 24. – P. 93-95.
 11. Schwartz P.J. The long Q-T syndrome / A. Malliani, M. Periti, P.J. Schwartz // Am Heart J. – 1975. – № 89. – P. 378-390.

Булатов Р. М., Малкова Т. Л. Хіміко-токсикологічний аналіз рїсперїдона і 9-гідроксирїсперїдона в сечї

Анотація. Одним із представників атипових нейролептиків, вживаних для лікування шизофренї як препарат першого вибору, є рїсперїдон. В організмі він метаболїзується до 9-гідроксирїсперїдона, який володіє аналогічною фармакологічною дією. У зарубїжній і вітчизняній літературї описані випадки гострих

отруєнь рїсперїдоном, у тому числі з летальним наслідком. Розроблені методики ізолювання рїсперїдона і 9-гідроксирїсперїдона в сечї, їх ідентифікації і кількісного визначення за допомогою фізико-хімічних методів (ТСХ, ВЕЖХ), які можуть бути включені до схеми хіміко-токсикологічного аналізу лікарських речовин, що вивчаються.

Ключові слова: нейролептики, рїсперїдон, сеча, аналіз, отруєння.

Bulatov R., Malkov T. Chemical and toxicological analysis of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in the urine

Summary. One of the representatives of atypical neuroleptics used to treat schizophrenia as a drug of first choice, is risperidone. In the body it is metabolized to 9-hydroxyrisperidone (paliperidone), which has a similar pharmacological action. There are cases of acute poisoning with risperidone, including fatalities, described in foreign and domestic literature.

The methods of isolation of risperidone and 9-hydroxyrisperidone from a urine, their identification and quantitative definition by means of physical and chemical methods (by TLC, HPLC) which can be included in the scheme of chemical and toxicological analysis of studied medicinal substances are developed.

Key words: neuroleptics, risperidone, urine, analysis, poisonings.