

УДК 615.214.2.099.074:543.422.3:616-092.9

ИЗОЛИРОВАНИЕ, ОБНАРУЖЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОЛАНЗАПИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ**Ремезова И.П., Лазарян Д.С., Воронков А.В., Авраменко Н.С., Сварыч М.В.***Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал,**ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ,**Пятигорск, e-mail: irinaremezova@rambler.ru*

Для точной диагностики отравления оланзапином необходимо разработать методики его изолирования, обнаружения и количественного определения в биологических объектах. Целью настоящего исследования явилась разработка методик изолирования, обнаружения и количественного определения оланзапина в биологических объектах при остром отравлении лабораторных животных. Изучение влияния некоторых факторов экстракции (природа органического растворителя, pH, природа электролита, время и кратность экстракции) оланзапина проводили с помощью УФ-спектрофотометрии. На основании полученных данных нами разработаны методики изолирования оланзапина из плазмы крови и мочи. Для обнаружения оланзапина в извлечениях из внутренних органов и биологических жидкостей использовали физико-химические методы: ТСХ, дифференциальную спектрофотометрию и ВЭЖХ. Распределение оланзапина во внутренних органах и биологических жидкостях после острого отравления изучали на белых мышах обоего пола массой 21,0–28,0 г. Оланзапин был введен в виде суспензии в желудок в концентрации, являющейся токсической – 450 мг/кг. В течение 24 часов после острого отравления оланзапин в максимальном количестве накапливается в мозге лабораторных животных ($11,83 \pm 0,98\%$). В печени и почках оланзапин обнаруживался в меньших количествах. В извлечениях из желудка с содержимым, кишечника с содержимым и сердца оланзапин не обнаруживался. В плазме крови оланзапин обнаруживался в количестве $14,52 \pm 1,39\%$. В моче оланзапин в неизменном виде обнаруживался в концентрации $1,61 \pm 0,21\%$.

Ключевые слова: оланзапин, экстракция, острые отравления, химико-токсикологический анализ**ISOLATION, DETECTION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF OLANZAPINE IN BIOLOGICAL OBJECTS****Remezova I.P., Lazaryan D.S., Voronkov A.V., Avramenko N.S., Svarych M.V.***Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, branch, «Volgograd state medical University» of the Ministry of health of the Russian Federation, Pyatigorsk, e-mail: irinaremezova@rambler.ru*

For accurate diagnosis of poisoning with olanzapine it is necessary to develop methods of isolation, detection and quantitative determination in biological objects. The aim of the present study was the development of techniques for the isolation, detection and quantitative determination of olanzapine in biological objects under acute intoxication of laboratory animals. The study of the influence of some factors extraction (nature of organic solvent, pH, nature of electrolyte, time and frequency extraction) of olanzapine was performed using UV spectrophotometry. Based on these data, we have developed methods for the isolation of olanzapine from human blood plasma and urine. For the detection of olanzapine in extracts from internal organs and biological fluids used physico-chemical methods: TLC, differential spectrophotometry and HPLC. The distribution of olanzapine in the internal organs and biological fluids after acute poisoning was studied on white mice of both sexes weighing 21,0–28,0 G. Olanzapine was introduced in suspension into the stomach in concentrations which are toxic to 450 mg/kg. Within 24 hours after acute poisoning olanzapine in the maximum number accumulates in the brain of laboratory animals ($11,83 \pm 0,98\%$). In the liver and kidneys olanzapine were found in smaller quantities. In the extracts from the stomach contents, intestinal contents, and the heart of olanzapine did not show up. In plasma olanzapine were found in the number $14,52 \pm 1,39\%$. In urine olanzapine in unaltered form was detected at a concentration of $1,61 \pm 0,21\%$.

Keywords: olanzapine, extraction, acute poisoning, chemical and toxicological analysis

Оланзапин (2-Метил-4-(4-метил-1-пиперазинил)-10Н-тиено [2,3-б] [1, 5] бензодиазепин) относится к группе «атипичных» нейролептиков. Спектр психотропного действия оланзапина характеризуется наличием инцизивного антипсихотического эффекта и способностью редуцировать не только продуктивную, но и негативную симптоматику. Наряду с этим препарат оказывает благоприятное воздействие на протекание нейрокогнитивных функций у больных шизофренией и в клинически эффективных дозах практически не вызывает экстрапирамидных и нейроэндокрин-

ных побочных явлений, что позволяет рекомендовать препарат как средство выбора как для купирования острых психозов, так и для проведения длительной противорецидивной терапии [1, 5]. Исследователями отмечаются случаи передозировки и отравлений оланзапином с летальным исходом [6, 7]. Для точной диагностики отравления оланзапином необходимо разработать методики его изолирования, обнаружения и количественного определения в биологических объектах.

Целью настоящего исследования явилась разработка методик изолирования, обна-

ружения и количественного определения оланзапина в биологических объектах при острых отравлениях лабораторных животных.

Материалы и методы исследования

Изучение влияния некоторых факторов экстракции (природа органического растворителя, рН, природа электролита, время и кратность экстракции) проводили по следующей методике: 1 мл раствора оланзапина в 96% этаноле с концентрацией 10 мкг/мл помещали в коническую колбу объемом 25 мл, добавляли 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты до рН 6; 5; 4; 3; 2 или 25% раствор аммиака до рН 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14 и 3 мл органического растворителя. Содержимое колбы взбалтывали и помещали в делительную воронку. После разделения фаз отделяли слой органического растворителя. Растворители удаляли при комнатной температуре. Сухие остатки, полученные после испарения экстрагента, растворяли в 5 мл 96% этанола. Количественное содержание оланзапина определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 270 нм [2].

Распределение оланзапина во внутренних органах и биологических жидкостях после острого отравления изучали на белых мышах обоего пола массой 21,0–28,0 г. Оланзапин был введен в виде суспензии в желудок в концентрации, являющейся токсической – 450 мг/кг [8]. По истечении 24 часов животных вводили в наркоз, декапитировали и отбирали внутренние органы и кровь. Мочу собирали в течение суток.

Оланзапин из желудка с содержимым, кишечника с содержимым, печени, почек, головного мозга, сердца изолировали по методу А.А. Васильевой.

Для обнаружения оланзапина в извлечениях методом ТСХ использовали следующую методику [3, 4]: на линию старта хроматографической пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ-В-УФ наносили по 20 мкл исследуемых извлечений с помощью микрошприца. Пластины с нанесенными пробами высушивали на воздухе в течение 10 минут, затем помещали в камеру с системой растворителей, предварительно насыщенную их парами в течение 30 минут и хроматографировали восходящим способом в системах растворителей: этанол-вода – 25% раствор аммиака (8:1:1); хлороформ-диоксан-ацетон – 25% раствор аммиака (45:47,5:5:2,5); толуол – ацетон-этанол – 25% раствор аммиака (45:45:7,5:2,5); диоксан-хлороформ-ацетон – 25%

раствор аммиака (47,5:45:5:2,5); ацетонитрил-изопропанол-вода (5:3:2); этанол – 25% раствор аммиака (100:1,5); хлороформ-ацетон (90:10); метиленхлорид-метанол – 25% раствор аммиака (85:15:1); этилацетат – 25% раствор аммиака – уксусная кислота (26:1,6:3,3); хлороформ-метанол (100:10); этилацетат-хлороформ – 25% раствор аммиака (85:10:5); бензол-этанол – 25% раствор аммиака (50:10:0,5); метанол – 25% раствор аммиака (100:1,5). После прохождения фронта растворителей 10 см пластину вынимали и сушили на воздухе в течение 15 мин. Детекцию пятен проводили с помощью УФ-света при длине волны 254 нм с последующей обработкой реактивом Драгендорфа.

Идентификацию оланзапина в извлечениях методом дифференциальной спектрофотометрии проводили по следующей методике: сухой остаток извлечения растворяли в 5 мл 96% этанола, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили полученный раствор до метки растворителем, измеряли спектр поглощения полученного раствора в области 200–300 нм с помощью спектрофотометра в кюветах с длиной рабочего слоя 10 мм относительно спиртового раствора извлечения из соответствующего биологического объекта.

Для обнаружения и количественного определения оланзапина методом ВЭЖХ были использованы следующие условия хроматографирования: хроматографическая колонка размером 2×75 мм, заполненная обращенно-фазовым сорбентом «ProntoSil 120-5-C18 AQ»; подвижная фаза: элюент А – 0,1% раствор кислоты трифторуксусной, элюент Б – ацетонитрил; скорость потока – 100 мкл/мин; время измерения 0,18 с; температура термостата колонки – комнатная, объем пробы 2 мкл, длина волны – 270 нм. Для выяснения характеристик удерживания оланзапина выполняли анализ в градиентном режиме от 10% элюента Б до 90% за 15 мин.

Полученные данные статистически обрабатывали с помощью пакета программ EL.

Результаты исследования и их обсуждение

Для разработки оптимальной методики изолирования оланзапина из биологических объектов изучено влияние некоторых факторов на его экстракцию из растворов. Влияние природы органического растворителя и рН среды представлено на рис. 1.

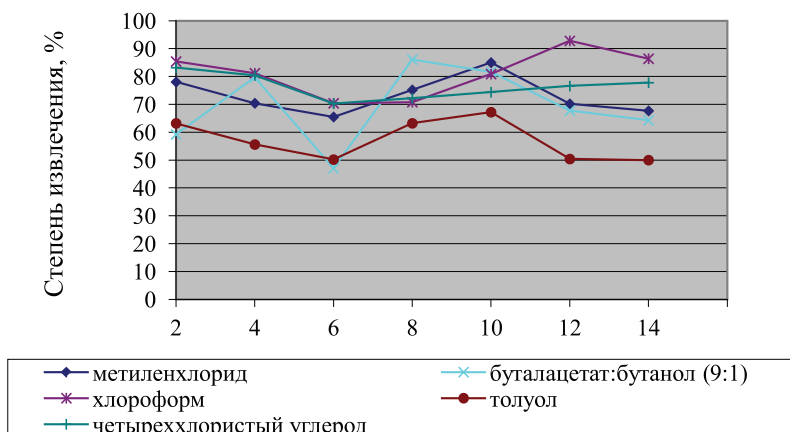


Рис. 1. Зависимость степени извлечения оланзапина от рН среды и природы органического растворителя

Установлено, что оптимальным органическим растворителем для экстракции оланзапина из растворов является хлороформ, который экстрагирует исследуемое вещество при pH = 2 и 12 в максимальном количестве. Этилацетат и бензол оланзапин не экстрагируют. Данные о влиянии природы электролита на экстракцию оланзапина из растворов представлены в табл. 1.

Таблица 1
Определение степени экстракции оланзапина в зависимости от природы электролита

Используемый электролит	Степень экстракции, %
Раствор натрия хлорида 20%	34,70
Раствор натрия хлорида насыщенный	37,06
Раствор натрия сульфата 5%	65,21
Раствор натрия сульфата насыщенный	93,26
Раствор аммония сульфата 20%	46,50
Раствор аммония сульфата насыщенный	75,93
Раствор натрия карбоната 10%	66,8
Раствор натрия карбоната насыщенный	60,3

Полученные данные свидетельствуют о том, что раствор натрия сульфата насыщенный обладает высаливающим действием для оланзапина, а раствор натрия хлорида 20% – всаливающим действием. Увеличение времени экстракции оланзапина с 3 до 7 минут приводит к уменьшению количества изолируемого вещества с 93,31 до 45,42%, так как равновесие в концентрациях вещества между твердой и жидкой фазами достигается в течение 3 минут. На степень экстракции оланзапина кратность экстракции не влияет.

Влияние изученных факторов экстракции использовалось нами при разработке методики изолирования оланзапина из плазмы крови и мочи. Методика изолирования оланзапина из плазмы крови: к 0,2 мл центрифугата добавляли 25% раствор аммиака до pH 12, 1 мл раствора натрия сульфата насыщенный и 3 мл хлороформа. Содержимое взбалтывали в течение 3 минут и помещали в делительную воронку. Экстракцию проводили 5 мл хлороформа. После разделения фаз отделяли слой органического растворителя. Растворители удаляли при комнатной температуре. Сухие остатки, полученные после испарения экстрагента, растворяли в 5 мл 96% этанола. Методика изолирования оланзапина из мочи: к 0,5 мл мочи добавляли 0,2 мл кислоты хлористоводородной концентрированной и кипятили в течение 1 ч на

водяной бане. После охлаждения добавляли 25% раствор аммиака до pH 12, 1 мл натрия сульфата насыщенный и 3 мл хлороформа. Содержимое взбалтывали в течение 3 минут и помещали в делительную воронку. Экстракцию проводили 5 мл хлороформа. После разделения фаз отделяли слой органического растворителя. Растворители удаляли при комнатной температуре. Сухие остатки, полученные после испарения экстрагента, растворяли в 5 мл 96% этанола.

Для обнаружения оланзапина в извлечениях из внутренних органов и биологических жидкостей использовали физико-химические методы: ТСХ, дифференциальную спектрофотометрию и ВЭЖХ.

Для предварительного исследования оланзапина выбраны системы растворителей: этанол-вода – 25% раствор аммиака (8:1:1); хлороформ-диоксан-ацетон – 25% раствор аммиака (45:47,5:5:2,5); толуол – ацетон-этанол – 25% раствор аммиака (45:45:7,5:2,5), так как величина R_f оланзапина находится в пределах 0,63–0,88. Нами рекомендуется использовать системы растворителей хлороформ-метанол (100:10) и этилацетат-хлороформ-25% раствор аммиака (85:10:5) для проведения основного исследования оланзапина, а системы этанол – 25% раствор аммиака (100:1,5); бензол-этанол – 25% раствор аммиака (50:10:0,5); метанол – 25% раствор аммиака (100:1,5) целесообразно использовать для хроматографической очистки, так как пятно оланзапина находится в средней хроматографической зоне, что позволяет отделить соэкстрактивные вещества от основного.

Обнаружение оланзапина в извлечениях методом дифференциальной спектрофотометрии проводили после предварительной хроматографической очистки. Спектр извлечения стандартного раствора характеризуется наличием максимума при длине волны 230 ± 2 и 275 ± 2 нм и минимума при 255 ± 2 нм. Спектры извлечений из внутренних органов и биологических жидкостей совпадали с таковыми по положению максимумов и минимумов.

Для обнаружения оланзапина в извлечениях из биологических объектов нами предложено также использовать метод ВЭЖХ. На хроматограмме стандартного раствора оланзапина обнаружен один основной пик со временем удерживания 7,75 мин. На хроматограммах извлечений из биологических объектов обнаруживался пик, совпадающий с основным на хроматограмме стандартного образца.

Данные и статистическая обработка результатов количественного определения оланзапина методом ВЭЖХ во внутренних органах представлены в табл. 2.

Таблица 2

Степень извлечения оланзапина из биологических объектов

Внутренний орган	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики
Печень	7,80; 8,64; 7,15; 8,62; 7,35; 7,09	$\bar{X} = 7,78\%$; SD = 0,71; $\Delta\bar{X} = 0,74$; $\varepsilon = 9,55\%$
Почки	8,60; 8,51; 10,99; 8,96; 10,68; 9,69	$\bar{X} = 9,57\%$; SD = 1,07; $\Delta\bar{X} = 1,12$; $\varepsilon = 11,70\%$
Мозг	10,46; 11,16; 12,38; 13,09; 12,18; 11,69	$\bar{X} = 11,83\%$; SD = 0,93; $\Delta\bar{X} = 0,98$; $\varepsilon = 8,28\%$

Таблица 3

Степень извлечения оланзапина из биологических жидкостей

Биологическая жидкость	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики
Плазма крови	14,90; 13,71; 12,33; 16,00; 15,46; 14,71	$\bar{X} = 14,52\%$; SD = 1,32; $\Delta\bar{X} = 1,39$; $\varepsilon = 9,54\%$
Моча	1,80; 1,87; 1,54; 1,47; 1,35; 1,63	$\bar{X} = 1,61\%$; SD = 0,20; $\Delta\bar{X} = 0,21$; $\varepsilon = 12,91\%$

Как следует из представленных данных, в течение 24 часов после острого отравления оланзапин в максимальном количестве накапливается в мозге ($11,83 \pm 0,98\%$). В печени и почках оланзапин обнаруживался в меньших количествах. В извлечениях из желудка с содержимым, кишечника с содержимым и сердца оланзапин не обнаруживался. Поэтому нами в качестве оптимального биологического объекта при исследовании внутренних органов на оланзапин при остром отравлении рекомендуется использовать мозг.

Данные и статистическая обработка результатов определения оланзапина методом ВЭЖХ в биологических жидкостях представлены в табл. 3.

Как следует из представленных данных, в течение 24 часов после острого отравления оланзапин в неизменном виде в максимальном количестве обнаруживался в плазме крови ($14,52 \pm 1,39\%$). В моче оланзапин в неизменном виде обнаруживался в концентрации $1,61 \pm 0,21\%$.

Выводы

1. Изучено влияние факторов экстракции (природы органического растворителя, pH среды, природы электролита, кратность и время экстракции) на изолирование оланзапина из растворов.

2. Предложены методики обнаружения и количественного определения оланзапина

в извлечениях из биологических объектов методами дифференциальной спектрофотометрии, ТСХ и ВЭЖХ.

3. Разработаны методики изолирования оланзапина из плазмы крови и мочи.

4. Предложены оптимальные биологические объекты для проведения судебно-химического анализа оланзапина при остром отравлении.

Список литературы

1. Джибсон М.Д. Сравнение эффективности атипичных антипсихотиков первой линии: отсутствие значимых различий в эффективности рисперидона, оланзапина, кветиапина, zipразидона, арипипразола / М.Д. Джибсон, Р. Тэндон // Русский медицинский журнал. – 2007. – № 24. – С. 1855–1859.
2. Изучение влияния природы растворителя и pH на изолирование оланзапина из объектов небиологического происхождения / И.П. Ремезова, Д.С. Лазарян, А.Б. Саморядова и др. // Международный научно-исследовательский журнал. – 2013. – № 11–3 (18). – С. 58–59.
3. Обнаружение клозапина, рисперидона, сертиндола, оланзапина, арипипразола с помощью метода тонкослойной хроматографии / И.П. Ремезова, Д.С. Лазарян, Т.И. Максимова и др. // Научное обозрение. – 2014. – № 12, Ч.1. – С. 207–210.
4. Разработка методик обнаружения некоторых атипичных нейролептиков для целей химико-токсикологического анализа / И.П. Ремезова, Д.С. Лазарян, Т.И. Максимова и др. // Фармация и фармакология. – 2014. – № 6 (7). – С. 54–59.
5. Comparative mortality associated with ziprasidone and olanzapine in real-world use among 18,154 patients with schizophrenia: the ziprasidone observational study of cardiac outcomes (ZODIAC) / B.L. Strom, S.M. Eng, G. Faich et al. // J. Psychiatry. – 2011. – № 16. – P. 193–201.

6. Olanzapine: сайт Toxnet-2014 [Электронный ресурс]. – URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?/temp/~DEapDv:1> (дата обращения 01.12.2014 г.).

7. Fatal poisoning in the Department of Toxicology in Poznam in 2008–2012-preliminary analysis [Электронный ресурс] / M. Lukasik-Glebocka, R. Adamek // Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> (дата обращения 04.06.2015 г.).

8. Fatal water intoxication during olanzapine treatment: a case report [Электронный ресурс] / S. Nagasava, D. Yajima, S. Torimitsu et al. // Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> (дата обращения 04.06.2015 г.).

References

1. Dzhibson M.D. Sravnenie effektivnosti atipichnykh antipsihotikov pervoy linii: otsutstvie znachimykh razlichiy v effektivnosti risperidona, olanzapina, kvetiapina, ziprazidona, aripiprazola / M.D. Dzhibson, R. Tendon // *Russkiy meditsinskiy zhurnal*, 2007, no. 24, pp. 1855–1859.

2. Izuchenie vliyaniya prirodyi rastvoritelya i rN na izolirovanie olanzapina iz ob'ektov nebiologicheskogo proishozhdeniya / I.P. Remezova, D.S. Lazaryan, A.B. Samoryadova i dr. // *Mezhdunarodnyy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal*, 2013, no. 11–3 (18), pp. 58–59.

3. Obnaruzhenie klozapina, risperidona, sertindola, olanzapina, aripiprazola s pomoschyu metoda tonkosloynoy hromatografii / I.P. Remezova, D.S. Lazaryan, T.I. Maksimenko i dr. // *Nauchnoe obozrenie*, 2014, no. 12, Ch.1, pp. 207–210.

4. Razrabotka metodik obnaruzheniya nekotorykh atipichnykh neyroleptikov dlya tseley himiko-toksikologicheskogo analiza / I.P. Remezova, D.S. Lazaryan, T.I. Maksimenko i dr. // *Farmatsiya i farmakologiya*, 2014, no. 6 (7), pp. 54–59.

5. Comparative mortality associated with ziprasidone and olanzapine in real-world use among 18,154 patients with schizophrenia: the ziprasidone observational study of cardiac outcomes (ZODIAC) / B.L. Strom, S.M. Eng, G. Faich et al. // *J. Psychiatry*, 2011, no. 16, pp. 193–201.

6. Olanzapine: sayt Toxnet-2014 [Elektronnyy resurs].- URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?/temp/~DEapDv:1> (data obrascheniya 01.12.2014 g.).

7. Fatal poisoning in the Department of Toxicology in Poznam in 2008-2012-preliminary analysis [Elektronnyy resurs] / M. Lukasik-Glebocka, R. Adamek // available at: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.

8. Fatal water intoxication during olanzapine treatment: a case report [Elektronnyy resurs] / S. Nagasava, D. Yajima, S. Torimitsu et al. // available at: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.

Рецензенты:

Оганесян Э.Т., д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой органической химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал, ГБОУ ВПО «Волгоградский медицинский университет» Минздрава РФ, г. Пятигорск;

Коновалов Д.А., д.фарм.н., заместитель директора по науке, заведующий кафедрой фармакогнозии, Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал, ГБОУ ВПО «Волгоградский медицинский университет» Минздрава РФ, г. Пятигорск.