

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ИЗОЛИРОВАНИЯ И ОБНАРУЖЕНИЯ КЛОЗАПИНА И ОКСАЗЕПАМА В МОДЕЛЬНОЙ СМЕСИ МОЧИ

Ремезова И. П., Лазарян Д. С., Максименко Т. И., Лихота Т. Т.

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО «Волгоградский медицинский университет» Минздрава РФ, Пятигорск, Россия, (375500, Пятигорск, пр. Калинина-11), e-mail:irinaremezova@rambler.ru

Предварительно были разработаны методики изолирования, идентификации и количественного определения клозапина и оксазепам в растворах. Разработаны методики изолирования клозапина и оксазепам из модельных смесей мочи. Предложены условия идентификации клозапина и оксазепам в извлечениях из мочи и их последующая дифференциация между собой с помощью тонкослойной хроматографии и УФ-спектрофотометрии. Изучена возможность использования общих и частных систем растворителей для обнаружения клозапина и оксазепам методом ТСХ. Разработаны условия количественного определения клозапина и оксазепам методом УФ-спектрофотометрии после очистки с помощью метода ТСХ. Расчет количественного содержания изучаемых веществ проводили по их удельному показателю поглощения. Валидационную оценку разработанной методики проводили по показателям: прецизионность, правильность, линейность и предел количественного определения. Предложенные методики могут быть включены в схему химико-токсикологического анализа изучаемых лекарственных веществ.

Ключевые слова: анализ, отравления, оксазепам, клозапин.

DEVELOPMENT OF METHODS OF DETECTION AND ISOLATION CLOZAPINE AND OXAZEPAME MODEL MIXTURE URINE

Remezova I. P., Lazarjan D. S., Maksimenko T. I., Likhota T. T.

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of the «Volgograd state medical University» of the Ministry of health of the Russian Federation, Pyatigorsk, Russian (375500, Pyatigorsk, Kalinina str.-11), e-mail:irinaremezova@rambler.ru

Previously there have been developed methods of isolation, identification and quantitative determination of clozapine and oxazepam in solutions. The methods of isolation of clozapine and oxazepam of modelling of mixtures of urine. Proposed conditions for the identification of clozapine and oxazepam in extracts of urine and their subsequent differentiation among themselves by means of thin-layer chromatography and in the UV spectrophotometry. Possibility of use of public and private systems dissolve teachers for the detection of clozapine and oxazepam by TLC. Developed conditions for the quantitative determination of clozapine and oxazepam by UV spectrophotometry after cleaning with the help of the method of TLC. Calculation of the quantitative content of studied substances was carried out according to their specific index of absorption. Validation assessment methods developed conducted by the indicators precision, accuracy, linearity and the limit of quantification. The proposed methods may be included into the scheme of chemical-toxicological analysis of the studied drugs.

Key words: the analysis, poisonings, oxazepam, clozapine.

Введение. Результативность сочетанного назначения клозапина и других антипсихотических препаратов является предметом давнего и пристального внимания специалистов.

Отчасти это связано с тем, что клозапин, в отличие от других атипичных антипсихотиков, применяется в клинической практике уже около 20 лет, но также и потому, что он был признан за это время антипсихотическим препаратом резерва [8]. Основанием для такой комбинации было представление, что не для всех больных монотерапия клозапином является достаточной для купирования продуктивной психотической симптоматики. В различных западных странах, а также и в нашей стране, более 50 % больных, принимающих клозапин, дополнительно получают еще и антипсихотические препараты других групп [3], например,

бензодиазепины [1]. Поэтому **целью** настоящего исследования явилась разработка схемы химико-токсикологического анализа клозапина с оксазепамом в моче.

Материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение. Предварительно нами были разработаны методики изолирования, идентификации и количественного определения клозапина и оксазепама в растворах. Изолирование клозапина [2, 7, 11] и оксазепама [11] проводили хлороформом как наиболее оптимальным растворителем для обоих веществ при pH=10-11. Для обнаружения изучаемых лекарственных веществ при совместном присутствии использовали метод ТСХ. В работе применяли готовые пластины «Сорбфил». В качестве подвижных фаз использовали следующие системы растворителей, наиболее часто применяемые в скрининге лекарственных веществ основного характера при ненаправленном анализе (таблица 1).

Таблица 1. Значения R_f исследуемых лекарственных веществ в общих хроматографических системах (n=6)

Исследуемое вещество	Системы растворителей		
	толуол- ацетон- спирт 96% - 25% раствор аммиака (45: 45: 7,5: 2,5)	хлороформ- метанол (100:10)	метанол- 25% раствор аммиака (100: 1,5)
Клозапин	0,62	0,42	0,53
Оксазепам	0,81	0,82	0,80

Полученные данные свидетельствуют о том, что максимальное разделение клозапина и оксазепама наблюдается в системе хлороформ- метанол (100:10).

Так же исследовали возможность применения частных систем растворителей, используемых при испытании субстанции, таблеток и растворов для инъекций клозапина на посторонние примеси [4, 5, 9, 10], субстанции оксазепама [6] (таблица 2).

Таблица 2. Значения R_f исследуемых лекарственных веществ в частных хроматографических системах (n=6)

Исследуемое вещество	Системы растворителей				
	бензол-спирт 96%-25% раствор аммиака (50: 10: 0,5)	этилацетат-хлороформ-25% раствор аммиака (85: 10: 5)	толуол-ацетон-25% раствор аммиака (50:50:1)	этилацетат-25% раствор аммиака-уксусная кислота (26:1,6:3,3)	этилацетат-дихлорэтан-25% раствор аммиака (80:20:5)

Клозапин	0,51	0,53	0,52	0,65	0,55
Оксазепам	0,87	0,81	0,80	0,67	0,57

В системах бензол- спирт 96 %-25 % раствор аммиака (50: 10: 0,5), этилацетат- хлороформ- 25% раствор аммиака (85: 10: 5), толуол-ацетон-25% раствор аммиака (50:50:1) наблюдается хорошее разделение клозапина и оксазепам. Системы бензол- спирт 96%- 25% раствор аммиака (50: 10: 0,5) и этилацетат- хлороформ- 25% раствор аммиака (85: 10: 5) целесообразно использовать для очистки клозапина и оксазепам от соэкстрактивных веществ извлечений из биологических объектов.

Для разработки методик идентификации и количественного определения клозапина с помощью УФ спектрофотометрии готовили раствор клозапина в 0,1 М растворе хлористоводородной кислоты. Полученный спектр раствора (10 мкг/мл) характеризуется наличием максимумов при длинах волн 245 ± 2 нм и 297 ± 2 нм, что совпадает с данными литературы [11]. Расчет содержания клозапина проводили по удельному показателю поглощения, определенному в экспериментальных условиях и равному 911. Валидационную оценку разработанной методики проводили по показателям: прецизионность, правильность, линейность и предел количественного определения (таблица 3).

Таблица 3. **Результаты оценки прецизионности и правильности спектрофотометрического определения клозапина**

№ п/п	Внесено, г	Найдено, г	R, %	Метрологические характеристики
1	0,0511	0,05138	100,5	$\bar{X}=0,0516$ г SD=0,0005 RSD=0,97% $\bar{R}=100,15\%$
2	0,0522	0,05221	100,02	
3	0,0523	0,05220	99,81	
4	0,0512	0,05134	100,3	
5	0,0517	0,05168	99,96	
6	0,0509	0,05105	100,3	

Относительное стандартное отклонение не превышает 1 % при значении открываемости $100,15\pm 0,27$ %. Поскольку рассчитанный критерий Стьюдента (1,22) меньше табличного (2,57), результаты не отягощены систематической ошибкой. Предел количественного определения клозапина устанавливали с помощью метода «десяти сигма», который составил 0,0006 г/100 мл. Линейная зависимость наблюдается в области концентраций клозапина от 4 до 14 мкг/мл.

Для разработки методик идентификации и количественного определения оксазепам с помощью УФ спектрофотометрии готовили раствор оксазепам в спирте 96 % . Полученный

спектр характеризуется наличием максимумов при длине волны 229 ± 2 нм (4 мкг/мл) и 316 ± 2 нм (40 мкг/мл), что совпадает с данными литературы [6, 11]. Для количественного определения оксазепам нами была использована длина волны 316 нм.

Расчет количественного содержания проводили по удельному показателю поглощения оксазепам, определенному в экспериментальных условиях и равному 165,4. Валидационную оценку разработанной методики проводили по показателям: прецизионность, правильность, линейность и предел количественного определения (таблица 4).

Таблица 4. **Результаты оценки прецизионности и правильности спектрофотометрического определения оксазепам**

№ п/п	Внесено, г	Найдено, г	R, %	Метрологические характеристики
1	0,0210	0,02088	99,43	$\bar{X} = 0,021$ г $SD = 0,0002$ $RSD = 0,95\%$ $\bar{R} = 100,04\%$
2	0,0212	0,02127	100,3	
3	0,0213	0,02122	99,6	
4	0,0208	0,02085	100,2	
5	0,0207	0,02079	100,4	
6	0,0212	0,02126	100,3	

Относительное стандартное отклонение не превышает 1 % при значении открываемости $100,04\pm 0,43$ %. Поскольку рассчитанный критерий Стьюдента (1,25) меньше табличного (2,57), результаты не отягощены систематической ошибкой. Предел количественного определения оксазепам устанавливали с помощью метода «десяти сигма», который составил 0,0014 г/ 100 мл. Линейная зависимость наблюдается в области концентраций оксазепам от 10 до 60 мкг/мл.

При идентификации и количественном определении изучаемых лекарственных веществ в извлечениях из мочи важным условием является выбор pH среды. Значения pK_{a1} и pK_{a2} клозапина составляет 1,5; 10,5, а pK_{a1} и pK_{a2} оксазепам – 1,7; 11,6 соответственно [11]. Методика анализа: к 25 мл мочи добавляли спиртовой раствор, содержащий 2 мг клозапина и 82,5 мг оксазепам (концентрации веществ соответствуют минимальной терапевтической дозе, исходя из среднесуточного объема мочи 1500 мл). Полученную модельную смесь оставляли на 24 часа при комнатной температуре. Затем к смеси добавляли 25 % раствор аммиака до $pH=10-11$ и экстрагировали трехкратно хлороформом объемом по 10 мл. После каждой экстракции отделяли слой органического растворителя от водной фазы. Полученные органические извлечения объединяли и исследовали.

Обнаружение и клозапина и оксазепам в извлечениях из мочи проводили методом ТСХ в оптимальной системе растворителей: бензол-спирт 96 %-25% раствор аммиака (50: 10: 0,5). Затем с целью очистки от эндогенных примесей проводили элюирование изучаемых лекарственных веществ с хроматографической пластины.

Зону адсорбции клозапина элюировали 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты. Спектр поглощения полученного раствора измеряли в области 200-300 нм с помощью спектрофотометра в кюветах с длиной рабочего слоя 10 мм относительно раствора сравнения (извлечение из контрольного опыта без добавления клозапина и оксазепам). Спектр извлечения характеризуется наличием максимума при длине волны 242 ± 2 нм. В извлечениях из контрольной пробы мочи максимумов поглощения не наблюдали. Результаты количественного определения клозапина в извлечении из мочи представлены в таблице 5.

Таблица 5. Результаты количественного определения клозапина в извлечениях из мочи методом УФ спектрофотометрии

Внесено, мкг/мл	Обнаружено, мкг/мл	Метрологические характеристики
80,0	62,2	$\bar{X}=65,50$ мкг/мл $SD=2,0842$ $RSD=3,18\%$ $a=65,50 \pm 2,19$
80,0	67,8	
80,0	65,7	
80,0	67,2	
80,0	64,0	
80,0	66,1	

Предложенная методика позволяет определить $65,5 \pm 2,19$ мкг/мл клозапина, что составляет 81,88 % при относительном стандартном отклонении 3,18 %.

Зону адсорбции оксазепам с хроматографической пластины элюировали спиртом 96 %. Измеряли спектр полученного раствора в области 220–300 нм и 280–380 нм с помощью спектрофотометра в кюветах с длиной рабочего слоя 10 мм относительно раствора сравнения (извлечение из контрольного опыта без добавления клозапина и оксазепам). Спектр поглощения извлечения характеризуется наличием максимума при длине волны 228 ± 2 нм и 315 ± 2 нм. В извлечениях из контрольной пробы мочи максимумов поглощения не наблюдали. Результаты количественного определения оксазепам в извлечении из мочи представлены в таблице 6.

Таблица 6. Результаты количественного определения оксазепам в извлечениях из мочи методом УФ спектрофотометрии

Внесено, мг/мл	Обнаружено, мг/мл	Метрологические характеристики
3,3	2,47	$\bar{X}=2,29$ мг/мл $SD=0,1475$ $RSD=6,44\%$ $a=2,29 \pm 0,16$
3,3	2,06	
3,3	2,23	

3,3	2,39	
3,3	2,35	
3,3	2,21	

Предложенная методика позволяет определить $2,29 \pm 0,16$ мг/мл оксазепам, что составляет 69,39 % при относительном стандартном отклонении 6,44 %.

Выводы. Таким образом, предложена методика изолирования клозапина и оксазепам из мочи при pH=10-11. Изучена возможность использования общих и частных систем растворителей для обнаружения клозапина и оксазепам. Обнаружение клозапина и оксазепам в извлечениях из мочи предложено проводить методом ТСХ в системе растворителей: бензол- спирт- 25 % раствор аммиака (50: 10: 0,5). Предложена методика количественного определения клозапина и оксазепам методом УФ спектрофотометрии после очистки с помощью метода ТСХ, которая может быть включена в схему химико-токсикологического анализа изучаемых лекарственных веществ.

Список литературы

1. Ильяшенко К. К. Особенности острых отравлений клозапином // Токсикологический вестник. – 2009. – № 2. – С. 2-5.
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 // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – № 3. – С. 31-36.
3. Маляров С. А. Чем должен руководствоваться врач при назначении комбинированной антипсихотической терапии? [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.health-ua.org/archives/health/738.html> (дата обращения 22.06.12).
4. НД 42-5335-99. Препарат Лепонекс в лекарственной форме таблетки 25 и 100 мг Фирмы-производителя Норватис Фарма АГ / Департамент гос. контроля качества, эффективности, безопасности лекарств, средств и мед. техники. Фармакопейный комитет. – М., 1999. – 21 с.
5. НД 42-6620-99. Препарат Лепонекс в лекарственной форме раствор для инъекций 25 мг/мл в ампулах по 2 мл. Фирмы-производителя Норватис Фарма АГ / Департамент гос. контроля качества, эффективности, безопасности лекарств, средств и мед. техники. Фармакопейный комитет. – М., 1999. – 13 с.

6. НД 42-11356-00. Оксазепам / Департамент гос. контроля качества, эффективности, безопасности лекарств, средств и мед. техники. Фармакопейный комитет. – М., 2000. – 10 с.
7. Соколова О. И. Обнаружение азалептина при судебно-химическом исследовании трупного материала / О. И. Соколова, Т. Л. Малкова, Н. И. Неволин // Судеб.-мед. экспертиза. – 2007. – № 2. – С. 35-38.
8. Точиллов В. А. Клозапин – препарат выбора для лечения больных с острыми психозами / В. А. Точиллов, О. Н. Кушнир // Социальная и клиническая психиатрия. – 2011. – № 2. – С. 37-42.
9. ФС 42-2803-99. Азалептин / Департамент гос. контроля качества, эффективности, безопасности лекарств, средств и мед. техники. Фармакопейный комитет. Взамен ВФС 42-2803-91; введ. 21.10.1999 до 21.10.2004. – [Б. м.], [1999]. – 8 с.
10. ФС 42-3018-94. Таблетки азалептина 0,025 г т 0,1 г / Гос. инспекция по контролю качества лекарств, средств и изделий мед. техники. Взамен ВФС 42-1448-84; введ. 04.04.1994 до 31.12.1999. Фармакопейный комитет. – [Б. м.], [1994]. – 7 с.
11. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. – London: The pharmaceutical Press, 2004. – 1931 p.

Рецензенты:

Оганесян Эдуард Тоникович, д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО «Волгоградский медицинский университет» Минздрава РФ, г. Пятигорск.

Попова Ольга Ивановна, д.фарм.н., профессор кафедры фармакогнозии, Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО «Волгоградский медицинский университет» Минздрава РФ, г. Пятигорск.