

## ИЗОЛИРОВАНИЕ ОЛАНЗАПИНА ИЗ МОДЕЛЬНЫХ ПРОБ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ

Ремезова И.П.<sup>1</sup>, Сварыч М.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Пятигорский медико-фармацевтический институт - филиал ГБОУ ВПО «Волгоградский медицинский университет» Минздрава РФ, Пятигорск, Россия, (375500, Пятигорск, пр. Калинина-11), e-mail: svarych\_mv@mail.ru

Оланзапин – препарат группы атипичных нейролептиков, которые применяют при шизофрении и других заболеваниях нервной системы. Известны случаи отравления оланзапином со смертельным исходом. В связи с этим его определение во внутренних органах и биологических объектах является решающим в диагностике смертельных отравлений. Целью настоящего исследования явилось определение степени извлечения оланзапина из модельных проб печени и почек классическими методами, а также разработка оптимальной методики его изолирования. Степень извлечения оланзапина из модельных проб печени и почек определяли с использованием классических методов изолирования: Стаса-Отто, А.А. Васильевой, В.Ф. Крамаренко. Наибольшее количество оланзапина (из почек 57,98 – 58,71 % и из печени 60,73 – 61,68 %) изолируется методом А.А. Васильевой. Тем не менее, это количество не приближается к максимальному. Разработана оптимальная методика изолирования оланзапина из модельных проб печени и почек. В извлечении из раствора с рН=2 удается обнаружить 71,80- 73,05 % оланзапина, в то время как в извлечении из раствора с рН=12 – 82,94- 83,25 %.

Ключевые слова: оланзапин, модельные пробы, изолирование

## ISOLATION OF OLANZAPINE FROM MODEL SAMPLES OF INTERNAL ORGANS

Remezova I. P. <sup>1</sup>, Svarych M. V. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute - branch of the «Volgograd state medical Uni-versity» of the Ministry of health of the Russian Federation, Pyatigorsk, Russian (375500, Pyatigorsk, Kalinina str.-11), e-mail: svarych\_mv@mail.ru

Olanzapine – the drug group atypical antipsychotics, used for schizophrenia and other diseases of the nervous system. There have been cases of poisoning olanzapine fatal. In this regard, its definition in the internal organs and biological objects is crucial in the diagnosis of fatal poisoning. The aim of the present study was to determine the degree of extraction of olanzapine from model tests of the liver and kidneys by classical methods and the development of optimal methods of isolation. The degree of extraction of olanzapine from model tests of the liver and kidney was determined using classical methods of isolation: Stas-Otto, A. A. Vasilyeva, V. F. Kramarenko. The greatest number of olanzapine (kidney 57,98 – 58,71 % and from the liver 60,73 – 61.68 per week %) is isolated by the method of A. A. Vasileva. However, this number is not close to the maximum. Developed optimal methods of isolation of olanzapine from model tests of the liver and kidneys. In the extraction from a solution with рН=2 are able to detect 71,80 - 73,05 % of olanzapine, while in the extraction from a solution with рН=12 – 82,94- 83,25 %.

Keywords: olanzapine, the model samples, isolation

Группа препаратов атипичных нейролептиков в последнее время стали все больше применяться для лечения различных психических заболеваний. Одним из представителей этой группы является оланзапин, который по механизму фармакологического действия характеризуется взаимодействием с несколькими различными нейромедиаторными системами: дофаминовыми, серотониновыми, норадренергическими, холинергическими и гистаминовыми рецепторами. Препарат широко применяют при шизофрении и других заболеваниях. Известны случаи отравления оланзапином со смертельным исходом. Клинические симптомы и патоморфологическая картина при отравлениях оланзапином

нехарактерны[5]. В связи с этим его определение во внутренних органах и биологических объектах является решающим в диагностике смертельных отравлений.

**Целью настоящего исследования** явилось определение степени извлечения оланзапина из модельных проб печени и почек классическими методами, а также разработка оптимальной методики его изолирования.

**Материалы и методы исследования.** Приготовление модельных проб печени и почек. К 10 г измельченных до размера  $0,5 \times 0,5 \times 0,5$  см<sup>3</sup> печени и почек (по отдельности) добавляли раствор оланзапина в терапевтической, токсической и летальной концентрации. Таким образом, концентрация оланзапина во внутренних органах была 1,5; 4,0; 8,5 мкг. Внутренние органы оставляли на 24 часа при комнатной температуре.

*Метод Стаса-Отто:* 10,0 г биоматериала измельчали и заливали абсолютным этанолом, подкисляли щавелевой кислотой до  $\text{pH}=2-3$ . Перемешивали и проверяли значение  $\text{pH}$ , настаивали при комнатной температуре в течение суток при периодическом перемешивании и проверяли значение  $\text{pH}$ . Жидкую фазу сливали, операцию повторяли 2-3 раза (в течение 2-3 суток), затем биоматериал помещали на фильтр и промывали спиртом; спиртовые вытяжки объединяли и упаривали на водяной бане при  $40-50^\circ\text{C}$  до густоты сиропа. Сиропообразную жидкость обрабатывали этанолом до прекращения выпадения осадка, жидкость фильтровали, снова упаривали до густоты сиропа и вновь осаждали белки. Остаток обрабатывали 20-25 мл воды, осадок отфильтровывали, проводили экстракцию хлороформа (2-3 порции), получали кислое хлороформное извлечение. Водную фазу подщелачивали 25% раствором  $\text{NH}_4\text{OH}$  до  $\text{pH}=9-10$ , извлекали хлороформом (2-3) порции, получали щелочное хлороформное извлечение.

*Метод А.А. Васильевой:* 10,0 г биоматериала измельчали и заливали водой, подкисляли щавелевой кислотой и настаивали при комнатной температуре в течение 1 часа, перемешивали, проверяли значение  $\text{pH}$ , вытяжку фильтровали, центрифугировали и экстрагировали хлороформом (трижды) – осторожно, во избежание эмульгирования с водой. Водную фазу подщелачивали 20%  $\text{NaOH}$  и трижды экстрагировали хлороформом.

*Метод В.Ф. Крамаренко:* 10,0 г биоматериала измельчали и заливали 0,02М раствором  $\text{H}_2\text{SO}_4$  до  $\text{pH}=2,5$ , настаивали 2 часа при периодическом перемешивании, проверяли  $\text{pH}$ , водный слой процеживали. Операцию проводили 2 раза. Водную вытяжку объединяли, центрифугировали, добавляли сульфат аммония до насыщения, центрифугировали, и извлекали эфиром 2-3 раза. К водной фазе прибавляли небольшими порциями раствор  $\text{NaOH}$  20% до  $\text{pH}=9-10$  и экстрагировали эфиром или хлороформом.

Обнаружение и количественное определение оланзапина проводили методом ВЭЖХ. Использовали следующие условия хроматографирования: хроматографическая колонка

размером 2×75 мм, заполненная обращено-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 обсуждение.** Нами были получены следующие данные при использовании метода Стаса–Отто, представленные в таблицах 1 и 2.

**Таблица 1**

Степень извлечения оланзапина из печени

Внесено, мкг	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики
1,5	50,54; 49,23; 53,76; 48,44; 52,05; 51,19	$\bar{X}=50,87\%$ ; SD=1,93; $\Delta\bar{X}=2,02$ ; $\varepsilon=3,97\%$
4,0	51,56; 50,34; 48,12; 49,65; 52,32; 50,65	$\bar{X}=50,44\%$ ; SD=1,47; $\Delta\bar{X}=1,55$ ; $\varepsilon=3,06\%$
8,5	47,45; 50,49; 48,78; 52,19; 49,98; 51,14	$\bar{X}=50,01\%$ ; SD=1,69; $\Delta\bar{X}=1,78$ ; $\varepsilon=3,55\%$

Полученные данные свидетельствуют о том, что методом Стаса-Отто из печени изолируется 50,01- 50,87 % оланзапина. Относительная ошибка определения не превышает  $\pm 4\%$ .

**Таблица 2**

Степень извлечения оланзапина из почек

Внесено, мкг	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики
1,5	45,74; 49,52; 48,78; 48,44; 46,33; 48,61	$\bar{X}=47,90\%$ ; SD=1,50; $\Delta\bar{X}=1,58$ ; $\varepsilon=3,30\%$
4,0	49,26; 47,45; 48,58; 45,21; 46,06; 50,21	$\bar{X}=47,78\%$ ; SD=1,92; $\Delta\bar{X}=2,01$ ; $\varepsilon=4,21\%$
8,5	48,45; 49,57; 50,50; 47,11; 45,74; 46,33	$\bar{X}=47,95\%$ ; SD=1,88; $\Delta\bar{X}=1,97$ ; $\varepsilon=4,10\%$

Полученные данные свидетельствуют о том, что методом Стаса-Отто из почек изолируется 47,78 – 47,95 % оланзапина. Относительная ошибка определения не превышает  $\pm 5\%$ .

Степень извлечения оланзапина при изолировании методом А.А.Васильевой из модельных проб внутренних органов представлена в таблицах 3 и 4.

**Таблица 3**

Степень извлечения оланзапина из печени

Внесено,	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики
----------	-----------------------	--------------------------------

мг		
1,5	60,67; 61,65; 59,89; 62,43; 64,26; 57,55	$\bar{X}=61,08\%$ ; $SD=2,29$ ; $\Delta\bar{X}=2,41$ ; $\varepsilon=3,94\%$
4,0	58,96; 59,54; 65,44; 61,47; 60,89; 63,78	$\bar{X}=61,68\%$ ; $SD=2,50$ ; $\Delta\bar{X}=2,62$ ; $\varepsilon=4,25\%$
8,5	64,44; 61,38; 60,65; 60,83; 57,92; 59,16	$\bar{X}=60,73\%$ ; $SD=2,22$ ; $\Delta\bar{X}=2,33$ ; $\varepsilon=3,83\%$

Полученные данные свидетельствуют о том, что методом А.А. Васильевой из печени изолируется 60,73 – 61,68 % оланзапина. Относительная ошибка определения не превышает  $\pm 5\%$ .

**Таблица 4**

Степень извлечения оланзапина из почек

Внесено, мг	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики
1,5	55,15; 59,68; 57,43; 58,83; 60,72; 56,06	$\bar{X}=57,98\%$ ; $SD=2,15$ ; $\Delta\bar{X}=2,26$ ; $\varepsilon=3,89\%$
4,0	60,84; 56,54; 59,38; 56,15; 58,08; 57,75	$\bar{X}=58,12\%$ ; $SD=1,76$ ; $\Delta\bar{X}=1,85$ ; $\varepsilon=3,18\%$
8,5	59,52; 60,87; 55,94; 57,67; 58,05; 60,19	$\bar{X}=58,71\%$ ; $SD=1,83$ ; $\Delta\bar{X}=1,92$ ; $\varepsilon=3,27\%$

Полученные данные свидетельствуют о том, что методом А.А. Васильевой из почек изолируется 57,98 – 58,71 % оланзапина. Относительная ошибка определения не превышает  $\pm 4\%$ .

Данные по определению оланзапина методом В.Ф. Крамаренко из модельных проб внутренних органов представлены в таблице 5 и 6.

**Таблица 5**

Степень извлечения оланзапина из печени

Внесено, мг	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики
1,5	52,26; 50,45; 51,81; 49,35; 54,77; 55,38	$\bar{X}=52,34\%$ ; $SD=2,36$ ; $\Delta\bar{X}=2,48$ ; $\varepsilon=4,74\%$
4,0	50,26; 52,12; 49,88; 53,23; 55,67; 54,54	$\bar{X}=52,62\%$ ; $SD=2,31$ ; $\Delta\bar{X}=2,42$ ; $\varepsilon=4,61\%$
8,5	52,57; 49,43; 50,66; 55,34; 54,38; 53,52	$\bar{X}=52,65\%$ ; $SD=2,25$ ; $\Delta\bar{X}=2,36$ ; $\varepsilon=4,48\%$

Полученные данные свидетельствуют о том, что методом В.Ф. Крамаренко из печени изолируется 52,34 – 52,65 % оланзапина. Относительная ошибка определения не превышает  $\pm 5\%$ .

**Таблица 6**

Степень извлечения оланзапина из почек

Внесено,	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики
----------	-----------------------	--------------------------------

мг		
10,0	47,68; 49,77; 50,43; 51,42; 53,79; 51,15	$\bar{X}=50,71\%$ ; $SD=2,02$ ; $\Delta\bar{X}=2,12$ ; $\varepsilon=4,17\%$
25,0	49,54; 50,76; 52,12; 53,43; 54,18; 46,64	$\bar{X}=51,11\%$ ; $SD=2,77$ ; $\Delta\bar{X}=2,91$ ; $\varepsilon=5,69\%$
400,0	46,46; 47,78; 49,53; 52,12; 55,59; 51,30	$\bar{X}=50,46\%$ ; $SD=3,28$ ; $\Delta\bar{X}=3,44$ ; $\varepsilon=6,82\%$

Полученные данные свидетельствуют о том, что методом В.Ф. Крамаренко из почек изолируется 50,46 – 51,11 % оланзапина. Относительная ошибка определения не превышает  $\pm 7\%$ .

Как следует из представленных данных, наибольшее количество оланзапина (из почек 57,98 – 58,71 % и из печени 60,73 – 61,68 %) изолируется методом А.А. Васильевой. Тем не менее, это количество не приближается к максимальному.

Для разработки оптимальной методики изолирования оланзапина из модельных проб внутренних органов первоначально нами изучено влияние некоторых факторов на его экстракцию из растворов. Оптимальным органическим растворителем для экстракции оланзапина в максимальном количестве из водных растворов является хлороформ при рН=2 и 12. Натрия сульфат насыщенный – электролит, который обладает высаливающим действием для оланзапина (степень экстракции 93,26%)[1].

*Изолирование оланзапина из внутренних органов по разработанной методике.* Навеску измельченного объекта заливали 40% раствором этанола (1:2), подкисляли 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты до рН=2, проводили настаивание 2 ч при периодическом взбалтывании. К водной фазе добавляли 5 мл диэтилового эфира, органический слой отбрасывали. К водной фазе прибавляли 1 мл раствора натрия сульфата насыщенного и 3 мл хлороформа. Содержимое колбы взбалтывали в течении 5 минут 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 и проводили количественное определение оланзапина методом ВЭЖХ. Водную фазу подщелачивали 25% раствором аммиака до рН 12, прибавляли 1 мл раствора натрия сульфата насыщенного и 3 мл хлороформа. Содержимое колбы взбалтывали в течении 5 минут 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. Обнаружение и количественное определение оланзапина проводили методом ВЭЖХ [3].

Полученные данные представлены в таблицах 7, 8.

Степень извлечения оланзапина из печени

Внесено, мкг	Извлечение из раствора с pH=2		Извлечение из раствора с pH=12	
	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики
1,5	79,28; 77,31; 80,26; 73,44; 76,58; 78,35	$\bar{X}=77,54\%$ ; $SD=2,40$ ; $\Delta\bar{X}=2,52$ ; $\varepsilon=3,25\%$	86,43; 89,90; 82,33; 87,65; 85,41; 88,54	$\bar{X}=86,71\%$ ; $SD=2,66$ ; $\Delta\bar{X}=2,79$ ; $\varepsilon=3,21\%$
4,0	73,37; 79,23; 78,47; 81,02; 77,17; 75,14	$\bar{X}=77,40\%$ ; $SD=2,79$ ; $\Delta\bar{X}=2,93$ ; $\varepsilon=3,79\%$	83,57; 86,72; 89,62; 85,35; 87,28; 88,80	$\bar{X}=86,89\%$ ; $SD=2,22$ ; $\Delta\bar{X}=2,33$ ; $\varepsilon=2,68\%$
8,5	80,54; 76,21; 79,42; 80,09; 74,31; 75,41	$\bar{X}=77,66\%$ ; $SD=2,67$ ; $\Delta\bar{X}=2,80$ ; $\varepsilon=3,61\%$	86,37; 90,05; 84,21; 87,36; 83,75; 88,19	$\bar{X}=86,16\%$ ; $SD=2,76$ ; $\Delta\bar{X}=2,90$ ; $\varepsilon=3,36\%$

В извлечении из раствора с pH=2 удается обнаружить 77,40-77,66 % оланзапина, в то время как в извлечении из раствора с pH=12 – 86,16 -86,89%.

Таблица 8

Степень извлечения оланзапина из почек

Внесено, мкг	Извлечение из раствора с pH=2		Извлечение из раствора с pH=12	
	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики
1,5	69,23; 74,38; 75,62; 70,77; 72,16; 71,49	$\bar{X}=72,28\%$ ; $SD=2,36$ ; $\Delta\bar{X}=2,47$ ; $\varepsilon=3,42\%$	82,44; 86,55; 81,06; 83,49; 80,83; 83,24	$\bar{X}=82,94\%$ ; $SD=2,08$ ; $\Delta\bar{X}=2,18$ ; $\varepsilon=2,63\%$
4,0	68,35; 72,61; 71,00; 75,42; 73,19; 70,24	$\bar{X}=71,80\%$ ; $SD=2,48$ ; $\Delta\bar{X}=2,60$ ; $\varepsilon=3,62\%$	85,48; 81,23; 82,65; 80,41; 84,57; 84,12	$\bar{X}=83,08\%$ ; $SD=1,99$ ; $\Delta\bar{X}=2,08$ ; $\varepsilon=2,51\%$
8,5	70,11; 71,85; 72,42; 73,39; 74,58; 75,93	$\bar{X}=73,05\%$ ; $SD=2,06$ ; $\Delta\bar{X}=2,16$ ; $\varepsilon=2,96\%$	80,26; 86,39; 84,43; 85,03; 81,18; 82,21	$\bar{X}=83,25\%$ ; $SD=2,40$ ; $\Delta\bar{X}=2,51$ ; $\varepsilon=3,02\%$

Полученные данные коррелируют с результатами экстракции оланзапина из водных растворов. В извлечении из раствора с pH=2 удается обнаружить 71,80- 73,05 % оланзапина, в то время как в извлечении из раствора с pH=12 – 82,94- 83,25 % [4].

Разработанные методики количественного определения оланзапина из печени и почек с использованием ВЭЖХ валидированы по показателям: специфичность, линейность, прецизионность, правильность, предел количественного определения, степень извлечения и стабильность аналита. Так как степень извлечения оланзапина из раствора с рН=2 и из раствора с рН=12 более 50%, то нами рекомендуется использовать при направленном анализе извлечение как из раствора с рН=2, так и с рН=12. Оценку методики изолирования оланзапина из печени и почек проводили, используя результаты определения оланзапина в извлечении из раствора с рН=12 [3].

#### **Выводы:**

1. Определена степень извлечения оланзапина из модельных проб печени и почек классическими методами.
2. Наибольшее количество оланзапина (из почек 57,98 – 58,71 % и из печени 60,73 – 61,68%) изолируется методом А.А. Васильевой.
3. Разработана оптимальная методика изолирования оланзапина из модельных проб печени и почек.

#### **Список литературы**

1. Изолирование, обнаружение и количественное определение оланзапина в биологических объектах/ И.П. Ремезова, Д.С. Лазарян, А.В. Воронков и др.// Фундаментальные исследования. – 2015. - №2-24. – С.5416-5420.
2. Изучение влияния природы растворителя и рН на изолирование оланзапина из объектов небιологического 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. Максименко 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. Максименко и др.// Фармация и фармакология.-2014.-№6 (7).-С.54-59.
5. 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).

#### **Рецензенты:**

Коновалов Д.А., д.фарм.н., заместитель директора по науке, заведующий кафедрой

фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института - филиала ГБОУ ВПО «Волгоградский медицинский университет» Минздрава РФ, г. Пятигорск;

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