

УДК 615.9:615.065:615.099:543.544

ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТОЛПЕРИЗОНА

Петухова Н.Н.^{1,2}, Крохин И.П.², Малкова Т.Л.¹

¹ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, Пермь, Россия (614090, г. Пермь, ул. Полевая, 2), e-mail: kaftox@mail.ru

²СХО ГКУЗОТ «ПКБ СМЭ», г. Пермь, Россия (614002, г. Пермь, ул. Фонтанная, 12), e-mail: kaftox@mail.ru

Данные статистики отравлений свидетельствуют о неблагоприятной обстановке, сложившейся в Пермском крае в связи со злоупотреблением лекарственными препаратами – миорелаксантами. Фиксируемые случаи острых и летальных отравлений обусловлены значительным превышением терапевтических доз. Для своевременной и объективной диагностики интоксикаций особое значение приобретают результаты химико-токсикологического анализа. Необходимо также совершенствование существующих методик и условий проведения химико-токсикологического анализа с использованием физико-химических методов на основе новейшей приборной базы и научных достижений. Все вышеназванное делает актуальной разработку унифицированных методик изолирования, обнаружения и количественного определения миорелаксанта толперизона в биологических объектах для целей химико-токсикологического анализа.

Ключевые слова: мышечная боль, миорелаксанты, толперизон, хроматографический анализ

CHEMICAL-TOXICOLOGICAL STUDIES TOLPERISONE

Petukhova N.N.^{1,2}, Krokhin I.P.², Malkova T.L.¹

¹Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia (614990, Perm, Poleyvaya street, 2), e-mail: kaftox@mail.ru

²Perm Regional Bureau of Forensic Medical Expertise Perm, Russia (614002, Perm, Fountain street, 12), e-mail: kaftox@mail.ru

The statistics indicate poisoning unfavorable situation prevailing in the Perm region in connection with the abuse of drugs - muscle relaxants. Retentive cases of severe and fatal poisonings due to significant excess of the therapeutic dose. For timely and objective diagnosis of intoxication are particularly important results of chemical-toxicological analysis. It is also necessary to improve existing methods and conditions of the chemical-toxicological analysis using physical and chemical methods based on the newest instrument base and scientific achievements. All the above mentioned makes it relevant to the development of standardized methods of isolation, detection and quantification of muscle relaxant tolperisone in biological objects for chemical-toxicological analysis.

Keywords: muscle pain, muscle relaxants, tolperisone, chromatographic analysis

Многие люди в своей жизни неоднократно сталкивались с миалгией – мышечной болью, возникающей в состоянии покоя или при напряжении мышц. Эти болевые ощущения создают массу неудобств и значительно снижают качество жизни. Современный рынок предлагает широкий спектр препаратов для купирования мышечной боли. Наиболее эффективны в борьбе с миалгией лекарственные средства группы миорелаксантов.

Нами были проведены исследования эпизодического характера по анализу фармацевтического рынка препаратов группы миорелаксантов центрального действия. Для получения исходной информации были обработаны оборотные ведомости ряда аптечных пунктов сети «Планета Здоровья» г. Перми с разным объемом товарооборота и территориальным расположением за 2014 г., а также данные продаж по Российской Федерации за 5 лет. Для анализа ситуации был взят ряд лекарственных препаратов с различной дозировкой действующего вещества и лекарственной формой: баклофен (ТН: Баклофен, Баклосан, Лиорезал), тизанидин (ТН: Сирдалуд) и толперизон (ТН: Мидокалм,

Толперизона гидрохлорид, Толперизон-OBL) [1, 2, 3]. Данные динамики продаж отражены на рисунках 1, 2. Результаты свидетельствуют о том, что миорелаксанты центрального действия все чаще применяются в клинической практике, лидирующее место занимает толперизон.

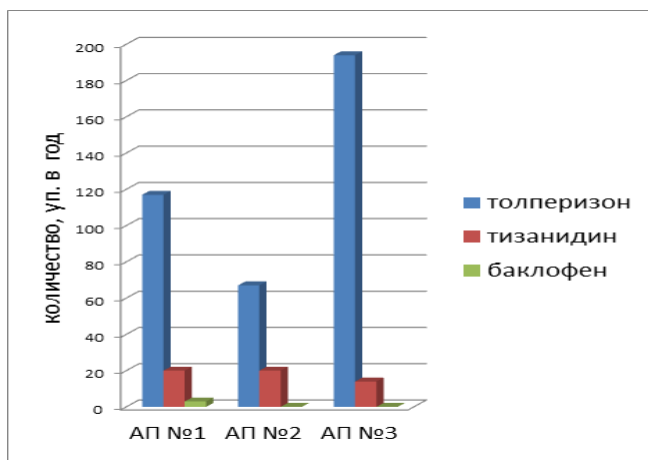


Рис. 1. Динамика продаж центральных миорелаксантов на примере ряда аптечных пунктов сети «Планета Здоровья» за 01.01.2014 – 31.12.2014 гг.

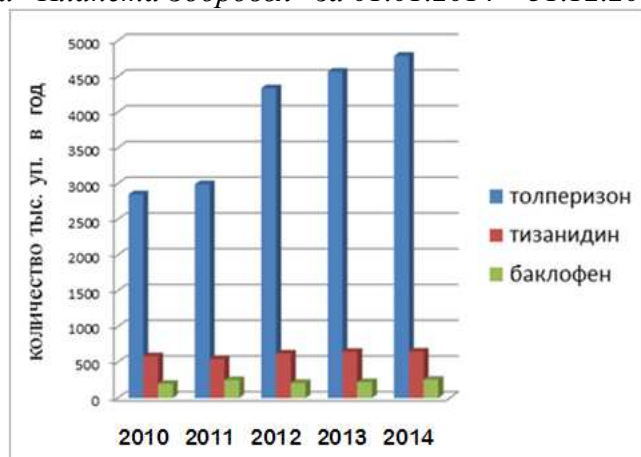


Рис. 2. Динамика продаж центральных миорелаксантов по Российской Федерации за 2010–2014 гг.

В настоящее время все чаще встречаются отравления миорелаксантами центрального действия. По данным годовой статистической отчетности химико-токсикологической лаборатории ГБУЗ «Пермский краевой наркологический диспансер» за 2014 г. были зафиксированы случаи обнаружения как отдельных представителей центральных миорелаксантов, так и в комбинации с препаратами других фармакологических групп.

Таблица 1

Результаты химико-токсикологических исследований ХТЛ ГБУЗ «Пермский краевой наркологический диспансер» за 2014 г.

Миорелаксанты центрального действия	Препараты других фармакологических групп
Баклофен	Барбитураты
Тизанидин	Производные 1,4-бензодиазепина

Толперизон	Противоэпилептические средства
	Опиаты
	Амфетамины
	Антигистаминные средства
	Дизайнерские наркотики
	Прочие

Особое место в группе миорелаксантов занимает препарат толперизон — применяется при лечении повышенного мышечного тонуса и спазмов поперечнополосатой мускулатуры. При пероральном приеме толперизона наблюдаются те же побочные реакции, что и у других миорелаксантов. Передозировка и неконтролируемый прием препарата могут привести к трагическим последствиям. В экспертной практике регистрируются положительные результаты химико-токсикологических исследований СХО ГКУЗОТ «ПКБ СМЭ» по доказательству отравлений толперизоном.

Анализ литературных источников показал, что данные химико-токсикологического анализа толперизона разрознены, нет систематических исследований по разработке методик изолирования из различных биологических объектов, обнаружения и количественного определения толперизона и его метаболитов [4].

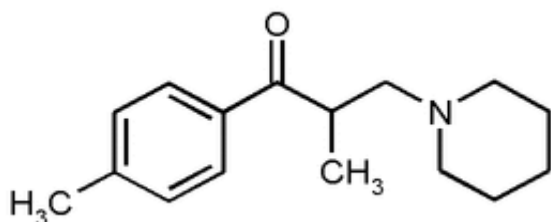
Цель исследования

Разработать методики определения толперизона в вещественных доказательствах и извлечениях из биологической жидкости (крови) для целей химико-токсикологического анализа.

Задачи, которые предстояло решить для достижения поставленной цели:

- изучить литературу по медицинскому применению толперизона, по методам изолирования и обнаружения лекарственных средств;
- определить хроматографические параметры толперизона в условиях метода тонкослойной (ТСХ) и газовой хроматографии с масс-селективной детекцией (ГХ/МС);
- оценить пригодность разработанной методики определения толперизона в практике химико-токсикологического анализа путем апробации на модельных смесях крови.

Толперизон (Tolperisone). Химическое название: 2-метил-1-(4-метилфенил)-3-(1-пиперидинил)-1-пропанон (гидрохлорид).



$C_{16}H_{23}NO$; М.м. = 245,0 г.

Также существует в виде соли толперизона гидрохлорида: $C_{16}H_{23}NO, HCl$; М.м. = 281,8г.

Растворим в воде, этаноле и метаноле. Температура плавления 166–177⁰ С. УФ-спектр толперизона в воде имеет максимум поглощения при 260 нм, в метаноле — 254 нм [5, 6].

Объекты исследования

- стандартные растворы толперизона различной концентрации (водные, спиртовые);
- модельные смеси крови.

В эксперименте была использована субстанция толперизона с содержанием действующего вещества 99,5% (НД 42-11633-01), из которой готовили рабочие стандартные растворы с различной концентрацией.

Для приготовления модельных смесей применялись образцы крови, полученные от здоровых добровольцев, не принимавших лекарственные препараты в течение месяца до отбора проб. Модельные смеси крови готовили путем добавления рабочего стандартного раствора толперизона водного с концентрацией 10 мг/мл к биологической жидкости – крови до получения концентраций 1,0; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0; 15,0 мкг/мл. Приготовленные модельные смеси выдерживали в течение 24 ч при комнатной температуре и исследовали в соответствии с планом эксперимента.

Характеристика методов изолирования

Изолирование из модельных смесей вели прямой экстракцией хлороформом при рН 9-10 двукратно порциями по 5 мл. Органическую фазу отделяли в делительной воронке, фильтровали через бумажный фильтр с натрия сульфатом безводным. Хлороформный экстракт концентрировали до 1 мл и анализировали методами ТСХ, ГХ/МС. Параллельно основному исследованию в тех же условиях вели изолирование и анализ контрольного образца.

Идентификация с помощью метода ТСХ

Сухие остатки извлечений после их растворения в 100 мкл этанола наносили на пластину в виде полос шириной не более 3 мм, длиной 2 см. Параллельное нанесение на пластину 10 мкл растворов образцов анализируемого соединения, а также экстракта «холостой» пробы способствовало повышению достоверности получаемых результатов по идентификации веществ. Скрининг проводили в системах растворителей различного состава и полярности. Просматривали пластины в УФ-свете при длине волны 254 нм. На хроматограммах обнаруживали зоны абсорбции вещества с четкими границами. В качестве визуализирующих реагентов для обнаружения были применены: серная кислота концентрированная, азотная кислота концентрированная, реактив FPN, реактив Марки,

реактив Манделина, реактив Драгендорфа (модифицированный по Мунье), пары йода. Полученные в ходе эксперимента данные отражены в таблицах 2, 3.

Таблица 2

Значение Rf миорелаксантов центрального действия в зависимости от состава системы растворителей и типа хроматографической пластинки (n=5)

Хроматографические системы	Значения Rf толперизона	
	«Silufol UV 254»	«Sorbfil ПТСХ – АФ – В – УФ»
1. Хлороформ-ацетон (9:1)	0,03±0,05	0,05±0,05
2. Хлороформ-ацетон (7:3)	0,10±0,05	0,19±0,05
3. Хлороформ-ацетон (1:1)	0,15±0,05	0,45±0,05
4. Хлороформ-ацетон (3:7)	0,20±0,05	0,52±0,05
5. Диаксан-хлороформ-ацетон-25% p-p NH ₄ OH (14,3:13,5:1,5:0,75)	0,90±0,05	0,93±0,05
6. Тoluол-ацетон-этанол-25% p-p NH ₄ OH (13,5:13,5:2,25:0,75)	-	0,93±0,05

Таблица 3

Результаты детектирования толперизона визуализирующими реагентами

№	Реагент	Цвет окрашивания (предел обнаружения, мкг)
1	Серная кислота концентрированная	-
2	Азотная кислота концентрированная	-
4	Реактив FPN	-
7	Реактив Марки	-
8	Реактив Манделина	-
9	Реактив Драгендорфа	оранжевое (0,25 мкг)
10	Йод кристаллический	желто-оранжевое (0,25 мкг)
11	УФ-свет (254 нм)	сорбция (0,25 мкг)

Было установлено, что оптимальный способ детектирования толперизона – облучение пластинки УФ-светом при длине волны 254 нм с последующей обработкой реактивом Драгендорфа. Предел обнаружения толперизона при облучении УФ-светом составил 0,25 мкг, при детектировании реактивом Драгендорфа – 0,25 мкг вещества в наносимой пробе.

Различий в чувствительности при работе с разными системами растворителей не установлено. Соэкстрактивные вещества не мешают хроматографическому разделению толперизона, так как имеют иную длину пробега.

Идентификация с помощью метода ГХ/МС

В исследовании использовались хроматограф Agilent 6850, масс-селективный детектор Agilent 5973N (Agilent Technologies (USA)), колонка HP-5MS. Программно-аппаратный комплекс включает в себя базу данных NIST® 2005 (банк данных на 275000 структурных графических формул).

Условия хроматомасс-спектрометрического анализа

Газ-носитель: гелий; скорость – 1,5 мл/мин; температура испарителя хроматографа 250⁰С; температура испарителя интерфейса детектора 280⁰С; ионизация электронным ударом (70

eV); регистрация масс-спектров в режиме полного сканирования ионов в интервале масс 40–550 а.е.м; объем пробы (1 мкл) — в режиме деления потока 1:10.

При анализе рабочего раствора методом ГХ/МС на полученных хроматограммах (проведено 5 повторений) присутствовал один основной пик со временем удерживания 10,31 мин (рис. 3). Для стандартного раствора толперизона установлены следующие характеристические ионы – 98, 119, 91, 84, 65, 55, 132, 160, 215, 230, 245. Масс-спектры совпадали с масс-спектром, приведенным в справочной литературе (библиотека масс-спектров NIST98) с вероятностью 94%, что наглядно проиллюстрировано на рисунке 4. Нами представлена структурная фрагментация молекулы толперизона с соответствующими отношениями масс к заряду (m/z) на рисунке 5. Полученные результаты были использованы нами при идентификации толперизона в извлечениях из модельных смесей. Исследование вели по разработанным для толперизона условиям. Было проанализировано 5 образцов. В таблице 4 представлены параметры идентификации толперизона в извлечениях из модельных смесей – времена удерживания, основные характеристические ионы и их интенсивности.

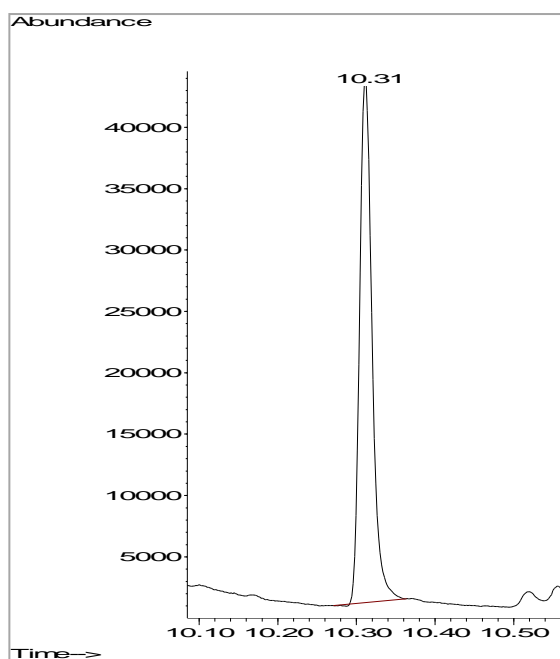


Рис. 3. Фрагмент хроматограммы основного пика стандартного раствора толперизона со временем удерживания 10,31 мин ($n=5$)

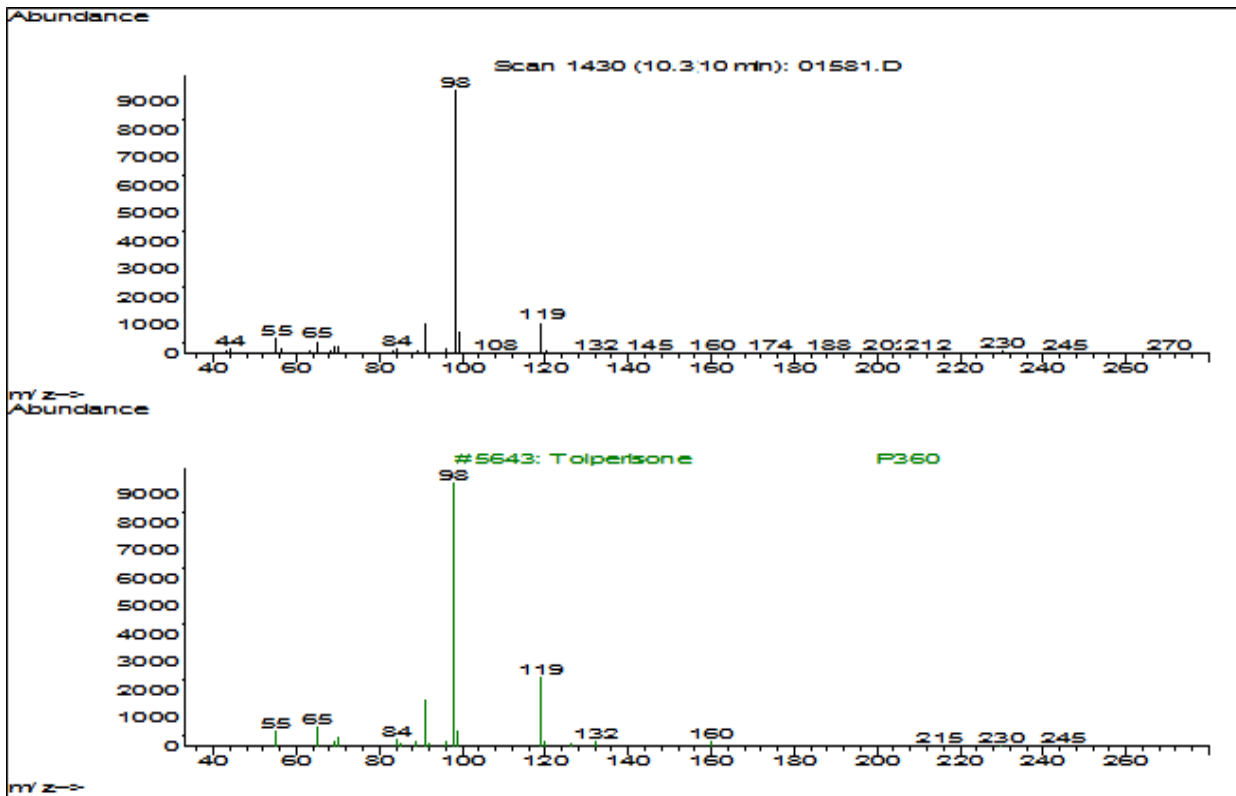


Рис. 4. Сравнение масс-спектра пика со временем удерживания 10,31 мин с масс-спектром толперизона, приведенным в справочной литературе (библиотека масс-спектров NIST98) ($n=5$)

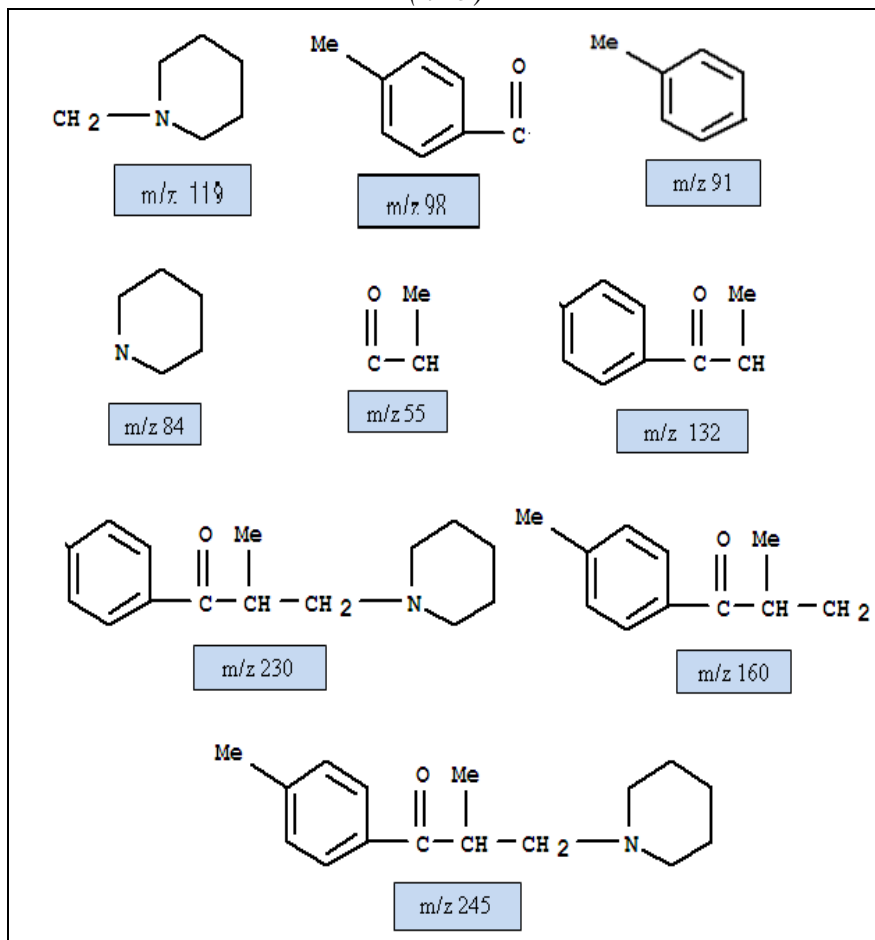


Рис. 5. Осколочные фрагменты молекулы толперизона с отношениями массы к заряду

Таблица 4

Сравнение результатов обнаружения толперизона в стандартных растворах
и в извлечениях из модельных смесей

Объект	T _R (мин)	Характеристические ионы
Раствор толперизона спиртовой 1 мкг/мл (n=5)	10,31	98, 119, 91, 84, 65, 55, 132, 160, 215, 230, 245
Модельная смесь (n=5)	10,31	98, 119, 91, 84, 65, 55, 108, 132, 145, 160, 174, 188, 212, 230, 245

Выводы

1. Подобраны оптимальные условия определения толперизона методом ТСХ. Предел обнаружения составил 0,25 мкг вещества в наносимой пробе.
2. Разработана методика идентификации толперизона методом ГХ/МС. Установлены параметры идентификации вещества в предложенных условиях: время удерживания, основные характеристические ионы масс-спектра.

Список литературы

1. Анатомо-терапевтическо-химическая классификация. Государственный реестр лекарственных средств, МЗ РФ, Москва, 2002.
2. Воробьева О.В. Мидокалм в лечении болезненного мышечного спазма // Украинський медичний часопис. – 2004. — № 3(41). – С. 28–31.
3. Государственный реестр лекарственных средств: <http://www.rlsnet.ru>.
4. Казарцев И.А. Химико-токсикологический анализ некоторых производных фенилалкиламина (кетамин, мидокалм, флуоксетин, сиднокарба): автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. фарм. наук (14.04.02)/ Казарцев И.А.; Пермь, 2011. – 25 с.
5. Clarke's analysis of drugs and Poisons / ed. By A.C. Moffat, M.D. Osselton, B.Widdop. - London: Pharmaceutical Press, 2004. — 1632 p.
6. United States Pharmacopoeia 24th ed. – The United States Pharmacopoeia Convention Inc, Rockville MD, 2000. – 2570 p. – CD-ROM version.

Рецензенты

Михайловский А.Г., д.фарм.н., профессор кафедры общей и органической химии ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, г. Пермь;

Терехин Г.А., д.м.н., профессор кафедры экстремальной медицины и товароведения ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, г. Пермь.