

ВИЗНАЧЕННЯ РИСПЕРИДОНУ В БІОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ МЕТОДОМ УЛЬТРАЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

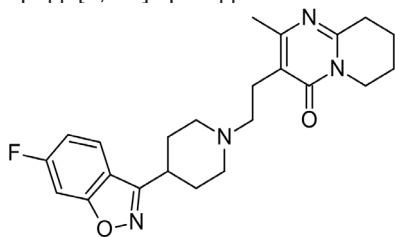
© Г. С. Труш, І. Й. Галькевич

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Резюме: запропоновано умови ідентифікації та кількісного визначення рисперидону методом ультраефективної рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією на колонці ВЕН С18 в зразках біологічного матеріалу. Витяжки отримували шляхом настоювання гомогенізованих проб печінки та мозку з водою, підкисленою оксалатною кислотою. Кислі витяжки очищали методом флеш-хроматографії на колонках GraceResolv™ Silica 5g / 25ml (Grace, USA). Як елюент використано 0,5 % розчин аміаку в 96 % етанолі.

Ключові слова: рисперидон, мозок, печінка, флеш-хроматографія, ультраефективна рідинна хроматографія (УЕРХ/МС/МС).

Вступ. Рисперидон – представник препаратів із групи нейролептиків з антипсихотичною дією. Призначається для лікування шизофренії, маніакальних станів, психотичних депресій та аутизму [1]. За хімічною будовою рисперидон належить до похідних бензізоксазолу – 3-[2-[4-(6-флюоро-1,2-бензізоксазол-3-іл)-1-піперидиніл]етил]-6,7,8,9-тетрагідро-2-метил4Н-піrido[1,2-а]піримідин-4-он:



Фармакологічні властивості рисперидону зумовлені тим, що цей препарат є селективним моноамінергічним антагоністом, проявляє високу афінність до 5-HT₂-серотонінергічних і D₂-дофамінергічних рецепторів [2, 3]. Даний препарат призначають у дозі від 0,5 до 8 мг/денно. При передозуванні спостерігаються побічні ефекти, серед яких найнебезпечнішими для життя є кардіотоксична дія препарату, спричинена подовженням інтервалу QT на ЕКГ, та злякисний нейролептичний синдром [4, 5]. Описано смертельні випадки отруєнь рисперидоном [6].

У ряді робіт наводяться методики визначення рисперидону в біологічних рідинах (крові, плазмі, сечі та слині) із застосуванням ТШХ, ГХ-МС, ВЕРХ-МС та інших методів [7, 8]. Також описано методики ізолювання рисперидону із тканин організму, які є об'єктами аналізу токсикологічних відділень бюро судово-медичної експертизи. Як показує ряд досліджень, результати кількісного визначення рисперидону в біологічних пробах залежать від методу ізолювання та

очистки від супутніх домішок. Сучасні фізико-хімічні методи аналізу потребують високого ступеня очистки проб від компонентів біологічної матриці, що дозволяє якісно та ефективно провести токсикологічні дослідження.

Мета дослідження – опрацювання умов ідентифікації та кількісного визначення рисперидону методом ультраефективної рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією (УЕРХ/МС/МС) в пробах, отриманих при очистці витяжок із біологічного матеріалу (печінка, мозок) методом флеш-хроматографії.

Методи дослідження. Для виготовлення серії розчинів використовували стандартний зразок рисперидону (Sigma-Aldrich, USA). Метанол відповідав кваліфікації Graduate for HPLC (Merck). Ацетонітрил та форміатна кислота виробництва Darmstadt (Germany), яку поставляє фірма Merck. 96 % етанол, 25 % аміак та оксалатна кислота відповідали кваліфікації х. ч. Для виготовлення розчину форміатної кислоти використовували воду, додатково очищену з допомогою Milli-Q Ultrapure Water System (Waters).

Умови хроматографічного аналізу. Для виявлення і кількісного визначення рисперидону опрацьовано умови методу УЕРХ/МС/МС. Роботу проводили на хроматографі Waters ACQUITY UPLC H-Class system (модель UPLC/MS/MS, Waters, Milford, USA). Детектування проводили за допомогою квадрупольного мас-детектора Waters Xevo TQD, колонка ВЕН С18 (2,1×50 мм, 1,7 мкм) (Waters, Milford, USA). Склад рухомої фази: 0,1 % водний розчин форміатної кислоти (розчин А), ацетонітрил (розчин В). Рідка фаза подавалася в лінійному градієнтному режимі, зі швидкістю 0,5 мл/хв. Протягом першої хвилини в колонку подавали розчин А, наступні 1,5 хв розчин А і В, взятих в об'ємному співвідношенні 4:6, потім 1 хв – розчин А. Аналіз виконували в режимі позитив-

ної електронної іонізації. Напруга на капілярі – 2 кВ, температура джерела – 120 °С, температура десольватації – 400 °С, швидкість потоку газу десольватації – 800 л/год, витрата газу на конусі – 25 л/год. Об'єм введеної проби 10 мкл. МRM моніторинг утворених іонів проводився за масами утворених іонів респеридону 411 > 191.

Виготовлення стандартних розчинів респеридону. Із стандартного зразку готували розчин респеридону в метанолі із концентрацією препарату 1 мг/мл. Шляхом розведення цього розчину метанолом готували по три серії розчинів із вмістом респеридону 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0; 100,0; 500,0 та 1000,0 нг/мл. Розчини використовували для побудови градувальних графіків. Градувальні графіки будували в межах концентрацій 0,5–20,0 нг/мл та 20,0–1000 нг/мл.

Підготовка біологічних зразків для аналізу. Ізолювали респеридон із модельних зразків біологічного матеріалу (печінки та мозку), в які вносили різні кількості респеридону. Трупні органи отримували у Львівському обласному бюро судово-медичної експертизи. Використовували біологічний матеріал, який попередньо був перевірений на відсутність лікарських речовин та наркотичних сполук. Біологічний матеріал зберігали при -60 °С.

Для виготовлення модельних зразків використовували по 10 г гомогенізованої печінки чи мозку. В досліджуваній гомогенізації вносили по 20, 50, 100, 500 та 1000 нг респеридону. Проби перемішували та інкубували при 36 °С протягом 6 та 24 год. Ізолювали респеридон із модельних зразків біологічного матеріалу водою, підкисленою оксалатною кислотою, а витяжки очищали методом флеш-хроматографії на колонках GraceResolv™ Silica 5g/25ml (Grace, USA). Для очистки проб методом флеш-хроматографії використовували об'єм витяжки, що відповідав 5 г біологічного матеріалу. Ізолювання та очистку витяжок проводили за методикою, яка опублікована нами раніше [9].

При очистці витяжок на колонках GraceResolv респеридон елюється з 16 по 23 мл елюенту (0,5 % розчину аміаку в 96 % етанолі). По 2 мл отриманих елюатів випаровували досуха в потоці азоту, сухі залишки розчиняли в 200 мкл метанолу та аналізували

методом УЕРХ/МС/МС. Паралельно досліджували контрольні проби із зразків відповідного біологічного матеріалу.

Результати й обговорення. На рисунку 1 наведено характер хроматограм, отриманих при дослідженні кислих витяжок із гомогенізації печінки та мозку після їх очистки на колонках GraceResolv.

Ідентифікували респеридон на хроматограмах за часом утримування ($t_r=2,91\pm 0,07$ хв) та наявністю сигналів при $411>119$ m/z/

У межах концентрацій респеридону від 0,5 до 20 нг/мл градувальний графік описується залежністю $Y=4,98\cdot 10^4 X-1,32\cdot 10^4$ (коефіцієнт кореляції $r=0,9998$), а в діапазоні концентрацій від 20 до 1000 нг/мл ця залежність має вигляд $Y=5,07\cdot 10^4 X-1,28\cdot 10^4$ ($r=0,99995$); де Y – площа піку, X – концентрація респеридону, нг/мл.

Межа виявлення респеридону методом УЕРХ/МС/МС у розчинах становить 0,3 нг/мл (співвідношення сигнал шум 1:3), а межа кількісного визначення 0,5 нг/мл (співвідношення сигнал шум 1:5).

Встановлено, що компоненти біологічної матриці, які містяться в пробах після очистки витяжок, не впливають на результати визначення вмісту респеридону методом УЕРХ/МС/МС.

Межа виявлення респеридону в тканині печінки становить – 1 нг/г, а в мозку – 1,4 нг/г, межа кількісного визначення в печінці – 1,6 нг/г, в мозку – 2 нг/г.

Залежність результатів визначення вмісту респеридону в біологічних пробах від вмісту препарату наведено в таблиці 1.

Представлені результати свідчать, що при використанні колонок GraceResolv™ Silica 5 g /25 ml із кислих витяжок з печінки ізолюється 76,90 – 82,27 % респеридону, а з мозку – від 75,3 до 81,08 %. Результати паралельних серій досліджень є відтворюваними. Після застосування флеш-хроматографії для очищення витяжок максимальна внутрішньосерійна відносна похибка визначення респеридону у пробах із печінки не перевищує 12,8 та 16,6 % (при дослідженні зразків біологічного матеріалу через 6 год 24 год відповідно), а при дослідженні зразків з тканиною мозку – 13,2 та 18,1 % відповідно.

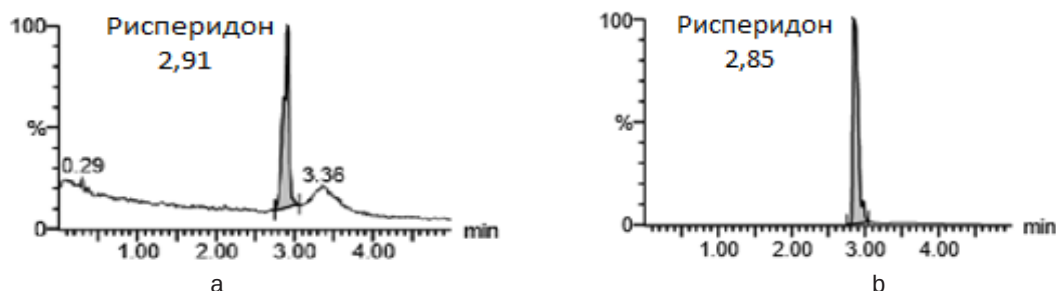


Рис. 1. Хроматограми респеридону:
а – ізолюваного з мозку; б – ізолюваного з печінки.

Таблиця 1. Результати визначення вмісту рисперидону в біологічних пробах методом УЕРХ/МС/МС (n=5)

Об'єкт дослідження	Внесено рисперидону (нг) до 10 г органа	Визначено рисперидону (через 6 год)		RSD,%	Визначено рисперидону (через 24 год)		RSD,%
		нг ±SD	%		нг±SD	%	
Печінка	20	15,84±2,03	79,20	12,8	15,38±2,55	76,90	16,6
	50	39,70±3,93	79,40	9,9	38,70±4,57	77,40	11,8
	100	81,06±3,32	81,06	4,1	78,76±4,01	78,76	5,1
	500	405,44±15,41	81,09	3,8	396,34±16,20	79,27	4,1
	1000	822,72±22,22	82,27	2,7	809,5±27,587	80,95	3,4
Мозок	20	15,22±2,01	76,10	13,2	15,06±2,72	75,30	18,1
	50	38,04±4,29	76,08	11,3	38,06±4,44	76,12	11,7
	100	78,06±3,19	78,06	4,1	77,74±4,96	77,74	6,4
	500	395,2±13,04	79,04	3,3	393,7±17,58	78,74	4,5
	1000	810,8±25,95	81,08	3,2	806,3±99,83	80,63	3,7

Висновки. 1. Запропоновано умови ідентифікації та кількісного визначення рисперидону методом ультраефективної рідинної хроматографії на колонці ВЕН С18 в режимі MRM за сигналами m/z 411 > 191 у пробах із біологічного матеріалу.

Встановлено, що із використанням колонок GraceResolv™ Silica із витяжок із тканини печінки

можна ізолювати 76,9-82,3 % рисперидону, а з тканини мозку – 75,3-80,95 % досліджуваної сполуки.

При застосуванні розроблених умов аналізу межа виявлення рисперидону в тканині печінки становить 1 нг/г, а в тканині мозку – 1,4 нг/г; межа кількісного визначення цієї сполуки у відповідних тканинах становить 1,6 нг/г та 2 нг/г.

Список літератури

1. Importance of Expectations on Side Effects of IM Risperidone / X. Fluvia, D. Gommel, R. Pastor, T. Salva // Asian Journal of Psychiatry. – 2011. – Vol. 4, № 1. – P. 45.
2. Gao J. Time-dependence of risperidone and asenapine sensitization and associated D2 receptor mechanism / J. Gao, M. Li // Behavioural Brain Research. – 2013. – Vol. 257. – P. 286–294.
3. Population pharmacokinetics and prediction of dopamine D2 receptor occupancy after multiple doses of RBP-7000, a new sustained-release formulation of risperidone, in schizophrenia patients on stable oral risperidone treatment / C. M. Laffont, R. Gomeni, B. Zheng [et al.] // Clinical Pharmacokinetics. – 2014. – Vol. 53. – P. 533–543.
4. Page C. B. Risperidone overdose causes extrapyramidal effects but not cardiac toxicity / C. B. Page, L. A. Calver, G. K. Isbister // Journal of Clinical Psychopharmacology. – 2010. – Vol.30, № 4. – P.387–390.
5. Taylor K. An unusual case of risperidone instability in a fatality presenting an analytical and interpretative challenge / K. Taylor, S. Elliott // Drug Test Analysis. – 2013. – Vol.5, № 9–10. – P. 748–752.
6. Linnet K. Postmortem Femoral Blood Concentrations of Risperidone / K. Linnet, S. S. Johansen // Journal of Analytical Toxicology. – 2014. – Vol. 38, № 1. – P.57–60.
7. Ремезова И. П. Химико-токсикологический анализ рисперидона и галоперидола в слюне / И.П. Ремезова, Д. С. Лазарян, Т. И. Максименко // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – Том 3, № 5. С 751–753.
8. Locatelli I. Simultaneous determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone enantiomers in human blood plasma by liquid chromatography with electrochemical detection / I. Locatelli, A. Mrhar, I. Grabnar // Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis. – 2009. – Vol. 50. – P. 905–910.
9. Труш Г.С. Використання флеш-хроматографії для очистки рисперидону / Г. С. Труш, І. Й. Галькевич // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2015. – Том 18, № 2. – С. 32–35.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РИСПЕРИДОНА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ МЕТОДОМ УЛЬТРАЗЭФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Г. С. Труш, И. И. Галькевич

Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого

Резюме: предложены условия идентификации и количественного определения рисперидона методом ультраэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией на колонке ВЕН С18 в образцах

биологического материала. Извлечения получали путем настаивания гомогенизированных проб печени и мозга с водой, подкисленной оксалатной кислотой. Кислые вытяжки очищали методом флэш-хроматографии на колонках GraceResolv™ Silica 5g / 25ml (Grace, USA). Как элюент использовали 0,5% раствор аммиака в 96 % этаноле.

Ключевые слова: ризперидон, мозг, печень, флэш-хроматография, ультраэффективная жидкостная хроматография (УЭЖХ/МС/МС).

DETERMINATION OF RISPERIDONE IN BIOLOGICAL MATERIAL BY ULTRA-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

H. S. Trush, I. Y. Halkevych

Danylo Halytskyi Lviv National Medical University

Summary: the aim of this study was elaboration conditions of identification and quantification of risperidone isolated from biological material by ultra-performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry (UPLC/MS/MS). Risperidone was isolated from brain and liver with water acidified by oxalic acid; and the extracts were purified on GraceResolv™ Silica 5g/25ml columns. An eluent was 0.5 % ammonia solution in ethanol. Liquid Chromatograph Waters ACQUITY UPLC H-Class system with column BEH C18 (2.1 × 50 mm, 1.7 μm) was applied. An analysed substance was detected on quadrupole mass-detector Waters Xevo TQD.

Key words: risperidone, brain, liver, flash chromatography, *ultra high liquid chromatography (UPLC-MS/MS)*.

Отримано 03.08.2016