



УДК 615.214.2.099.074:54.056:543

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ СУДЕБНО-ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА РИСПЕРИДОНА

THE CHOICE OF OPTIMAL CONDITIONS OF A FORENSIC CHEMICAL ANALYSIS OF RISPERIDONE

**И.П. Ремезова, Д.С. Лазарян, А.В. Воронков, Н.С. Авраменко,
Д.Ю. Санжиева, А.С. Рыбасова**
**I.P. Remezova, D.S. Lazaryan, A.V. Voronkov, N.S. Avramenko,
D.Yu. Sanzhieva, A.S. Rybasova**

*Пятигорский медико-фармацевтический институт-филиал ГБОУ ВПО «ВолгГМУ» Минздрава России
Россия, 357532, г. Пятигорск, проспект Калинина, 11*

*Pyatigorsk medical and pharmaceutical Institute, a branch of the state budgetary educational institution of higher professional education «Volograd state medical University» of the Ministry of health of the Russian Federation
Russia, 357532, Pyatigorsk, Kalinina Av., 11*

E-mail: i.p.remezova@pmedpharm.ru

Ключевые слова: рисперидон, изолирование, обнаружение, ВЭЖХ, валидация, судебно-химический анализ.

Key words: risperidone, isolation, detection, HPLC, validation, forensic chemical analysis.

Аннотация. Изучено влияние природы органического растворителя, pH среды, наличие электролита, время и кратности экстракции на изолирование рисперидона. Проведено изолирование рисперидона из модельных образцов внутренних органов трупа (печень и почки) общими и частными методами: Стаса-Отто, А.А. Васильевой, В.Ф. Крамаренко. Полученные данные свидетельствуют о том, что этими методами рисперидон изолируется из трупной печени и почек менее 50%, что свидетельствует о необходимости совершенствования методики его изолирования. Разработана методика изолирования рисперидона с помощью извлекателя 40% этанола при оптимальном значении pH среды. Разработанная методика изолирования валидирована по показателям: специфичность, линейность, прецизионность, правильность, предел количественного определения, степень извлечения, стабильность аналита. Осуществлена рекомендация по выбору внутренних органов для судебно-химического исследования рисперидона после создания модели острого отравления на белых мышках.

Resume. The influence of organic solvent nature, pH, presence of electrolyte, time, and frequency extraction for isolation of risperidone. Conducted isolation of risperidone from model samples of internal organs of the body (liver and kidneys) and General scientific methods: Stas-Otto, A. A. Vasilyeva, V. F. Kramarenko. The data obtained show that these methods risperidone is isolated from cadaveric liver and kidney less than 50%, indicating the need for improved methods of isolation. A procedure is developed for isolation of risperidone using the extractor 40% ethanol at optimum pH. The technique of isolating validated by the following indications: specificity, linearity, precisionist, accuracy, quantification limit, recovery, stability of the analyte. Made recommendations on the choice of the internal organs for forensic-chemical studies of risperidone after creating a model of acute toxicity on white mice.

Введение

Рисперидон – атипичный нейролептик, производное бензизоксазола, по химической структуре представляет собой 3[2-[4-(6-фтор-1,2-бензизоксазол-3-ил)пиперидино]этил]-6,7,8,9-тетрагидро-2-метил-4Н-пиридо [1,2-а]пиримидин-4-он). Рисперидон оказывает свое действие преимущественно за счет влияния лишь на 2 типа рецепторов – дофаминовые и серотонинергические. Способность блокировать серотонинергические рецепторы у него превосходит способность связываться с дофаминовыми рецепторами типа D2. Применяется для лечения психозов при шизофрении, психических депрессий, биполярных расстройств [Мальхин, 2003].

Известны случаи отравления рисперидоном со смертельным исходом [Мансурова, Смирнова, 2007]. Клиника отравлений рисперидоном нехарактерна. Поэтому необходимо разработать надежные методики изолирования, обнаружения и количественного определения рисперидона в биологических объектах [Булатов и др., 2011].

Цель

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния некоторых факторов экстракции рисперидона из водных растворов, разработка оптимальной методики изолирования рисперидона из модельных смесей печени и почек трупа и ее валидация, выбор оптимальных внутренних органов для целей судебно-химического исследования рисперидона после создания модели острого отравления на белых мышах.

Объекты и методы исследований

Приготовление модельных смесей печени и почек. К 10 г измельченных до размера $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ см³ трупной печени и почек (по отдельности) добавляли раствор рисперидона в терапевтической [Стандарты/протоколы оказания помощи больным шизофренией под ред. Краснова и др.], токсической и летальной концентрации [Maximilian Gahr et al., 2011]. Таким образом, концентрация рисперидона во внутренних органах была 0.6; 20.0; 43.0 мкг/г. Внутренние органы оставляли на 24 часа при комнатной температуре.

Для изолирования рисперидона использовали классические методы: Стаса-Отто, основанный на том, что токсические вещества извлекают спиртом, подкисленным щавелевой кислотой до pH 2-2.5, затем их экстрагируют хлороформом из кислой и щелочной среды; А.А. Васильевой, основанный на том, что токсические вещества извлекают водой, подкисленной щавелевой кислотой до pH 2-3; В.Ф. Крамаренко, основанный на том, что токсические вещества извлекают водой, подкисленной серной кислотой, проводят очистку эфиром из кислой среды. Рисперидон из водных извлечений экстрагировали хлороформом из щелочной среды. Растворители удаляли при комнатной температуре. Сухие остатки, полученные после испарения экстрагента, растворяли в 5 мл 95% этанола.

Булатовым [2009] были проведены исследования по разработке ВЭЖХ-методики обнаружения рисперидона. Нами для обнаружения рисперидона в извлечениях 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 – 0,34 с; температура термостата колонки – 35°C; объем пробы – 10 мкл.

Экспериментальные исследования по изучению распределения токсических веществ при острых отравлениях проводили на белых мышах обоего пола массой 23,5–26,8 г. Уход за животными и их содержание осуществляли в соответствии с требованиями приказа Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики». Рисперидон вводили в виде суспензии в желудок в токсической концентрации 0.73 мг/кг [Maximilian Gahr et al., 2011]. По истечении 24 часов животных вводили в наркоз, декапитуировали и отбирали внутренние органы.

Результаты и их обсуждение

Для разработки оптимальной методики изолирования рисперидона из внутренних органов первоначально нами были изучено влияние условий экстракции (природа растворителя, pH среды, наличие электролита, время и кратность экстракции) на изолирование рисперидона из водных растворов.

Изучение экстракции рисперидона органическими растворителями (метилхлорид, этилацетат, бензол, толуол, четыреххлористый углерод, хлороформ и смесь бутилацетат: бутанол (9:1)) проводили по следующей методике: 1 мл раствора рисперидона в 95% этаноле с концентрацией 80 мкг/мл помещали в коническую колбу объемом 25 мл, добавляли 0.1 М раствор кислоты хлористоводородной до pH 6; 5; 4; 3; 2 или 25% раствор аммиака до pH 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 95% этанола. 2.5 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили 95% этанолом до метки. Расчет степени извлечения (X, %) проводили по удельному показателю поглощения при длине волны 275 нм, рассчитанному экспериментально и равному 104.4 [Ремезова, 2010]. Полученные данные представлены на рис. 1.

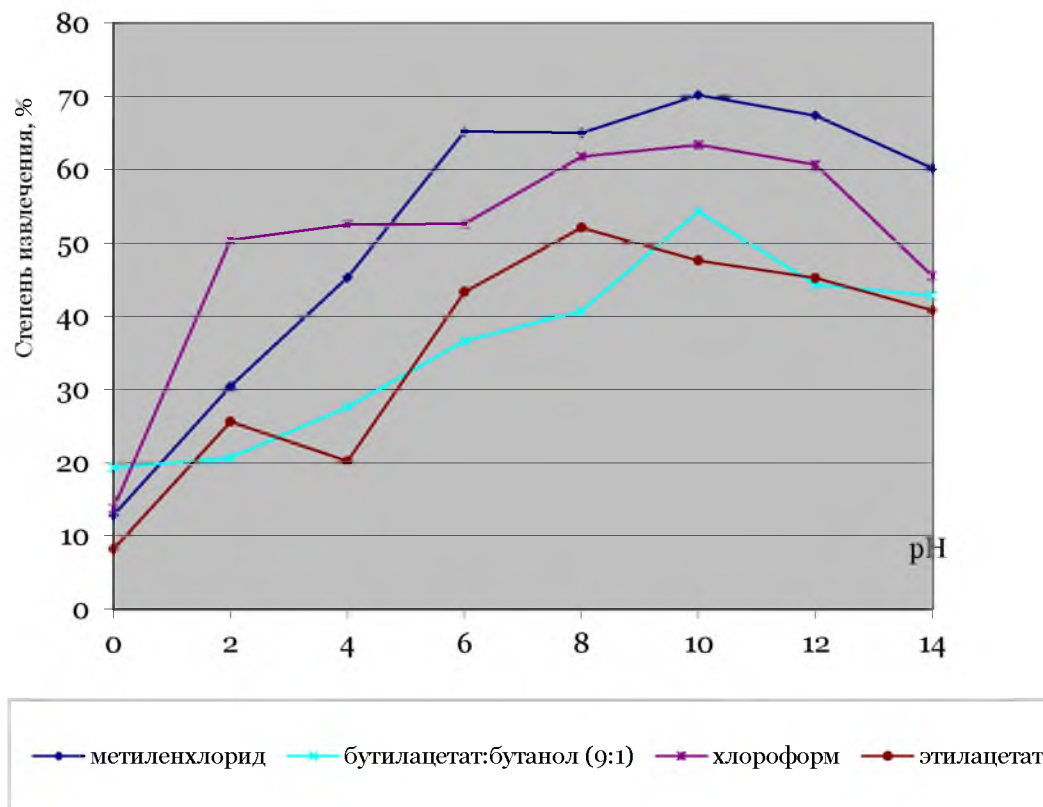


Рис. 1. Зависимость степени извлечения рисперидона от pH среды и природы органического растворителя
Fig.1. The dependence of the degree of extraction of risperidone from pH and nature of organic solvent

Установлено, что оптимальным органическим растворителем для экстракции рисперидона из растворов является метиленхлорид, который экстрагирует исследуемое вещество при pH=10 в максимальном количестве. Четыреххлористый углерод, бензол и толуол рисперидон не экстрагируют.

Изучение влияния электролита (натрия хлорид 20%, натрия хлорид насыщенный, натрия сульфат 5%, натрия сульфат насыщенный, аммония сульфат 20%, аммония сульфат насыщенный, натрия карбонат 10%, натрия карбонат насыщенный) на экстракцию рисперидона проводили по следующей методике: 1 мл раствора рисперидона в 95% этаноле с концентрацией 80 мкг/мл помещали в коническую колбу объемом 25 мл, добавляли 25% раствор аммиака до pH 10, 1 мл электролита и 3 мл метиленхлорида. 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 95% этанола. 2,5 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили 95% этанолом до метки. Расчет степени извлечения рисперидона (X, %) проводили по удельному показателю поглощения при длине волны 275 нм. Полученные данные шести параллельных определений представлены в табл. 1.

Таблица 1
Table. 1

Определение степени извлечения рисперидона в зависимости от добавленного электролита
Determination of the degree of extraction of risperidone depending on the electrolyte added

Используемый электролит	Степень извлечения, %
Раствор натрия хлорида 20%	63.26
Раствор натрия хлорида насыщенный	63.06
Раствор натрия сульфата 5%	62.84
Раствор натрия сульфата насыщенный	63.13
Раствор аммония сульфата 20%	59.82
Раствор аммония сульфата насыщенный	60.53
Раствор натрия карбоната 10%	65.43
Раствор натрия карбоната насыщенный	54.81



Полученные данные свидетельствуют о том, что раствор натрия карбоната 10% обладает всаливающим действием для рisperидона. Всаливающим действием для рisperидона обладает раствор натрия карбоната насыщенный.

Изучение влияния времени экстрагирования на степень извлечения рisperидона проводили по следующей методике: 1 мл раствора рisperидона в 95% этаноле с концентрацией 80 мкг/мл помещали в коническую колбу объемом 25 мл, добавляли 25% раствор аммиака до pH 10, 1 мл 10% раствора натрия карбоната и 3 мл хлороформа. Содержимое колбы взбалтывали в течение 3; 5; 7 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 95% этанола. 2,5 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили 95% этанолом до метки. Расчет степени извлечения рisperидона (X, %) проводили по удельному показателю поглощения при длине волны 275 нм. Полученные данные шести параллельных определений представлены в табл. 2.

Таблица 2
Table. 2

Определение степени извлечения рisperидона в зависимости от времени экстракции
Determination of the degree of extraction of risperidone depending on time of extraction

Время, мин	Степень извлечения, %
3	65.43
5	65.28
7	65.40

Как следует из представленных данных на изолирование рisperидона время экстракции не влияет.

Изучение влияния кратности на экстракцию рisperидона проводили по следующей методике: 1 мл раствора рisperидона в 95% этаноле с концентрацией 80 мкг/мл помещали в коническую колбу объемом 25 мл, добавляли 25% раствор аммиака до pH 10, 1 мл 10% раствора натрия карбоната и 3 мл хлороформа. Содержимое колбы взбалтывали в течении 3 минут и помещали в делительную воронку. После разделения фаз отделяли слой органического растворителя. Экстракцию повторяли дважды и трижды порциями по 10 мл хлороформа. Извлечения объединяли. Растворители удаляли при комнатной температуре. Сухие остатки, полученные после испарения экстрагента, растворяли в 5 мл 95% этанола. 2,5 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили 95% этанолом до метки. Расчет степени извлечения рisperидона (X, %) проводили по удельному показателю поглощения при длине волны 275 нм. Полученные данные шести параллельных определений представлены в табл. 3.

Таблица 3
Table. 3

Определение степени извлечения рisperидона в зависимости от кратности
Determination of the degree of extraction of risperidone depending on the multiplicity

Кратность	Степень извлечения, %
Однократная	65.43
Двухкратная	65.38
Трехкратная	64.97

На изолирование рisperидона кратность экстракции не влияет.

Судебно-химический анализ рisperидона может проводиться как направленно, так и ненаправленно. Поэтому нами проведено изолирование рisperидона из модельных смесей трупной печени и почек общими и частными методами: Стаса-Отто, А.А. Васильевой, В.Ф. Крамаренко. Поскольку при судебно-химическом исследовании используют предпочтительно печень и почки для анализа, нами также были приготовлены модельные смеси на основе этих органов.

При изолировании рisperидона из модельных смесей трупной печени и почек методом Стаса-Отто получены результаты, представленные в табл. 4 и 5.

Таблица 4
Table. 4

Степень извлечения рисперидона из печени
The degree of extraction of risperidone from the liver

Внесено, мкг	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики
Метод Стаса-Отто		
0.6	32.15; 35.83; 30.74; 29.44; 31.41; 36.24	$\bar{X}=32,64\%$; SD=2,78; $\Delta\bar{X}=2,92$; $\epsilon=8,95\%$
2.0	30.84; 32.78; 35.76; 32.14; 34.45; 33.38	$\bar{X}=33,23\%$; SD=1,73; $\Delta\bar{X}=1,82$; $\epsilon=5,47\%$
43	36.41; 32.25; 31.54; 31.83; 34.67; 30.81	$\bar{X}=32,91\%$; SD=2,16; $\Delta\bar{X}=2,26$; $\epsilon=6,87\%$
Метод А.А. Васильевой		
0.6	42.12; 41.65; 42.16; 39.23; 40.48; 37.62	$\bar{X}=40,54\%$; SD=1.82; $\Delta\bar{X}=1,91$; $\epsilon=4,71\%$
2.0	38.66; 43.6; 42.53; 39.28; 40.52; 41.68	$\bar{X}=41,09\%$; SD=1.98; $\Delta\bar{X}=2,08$; $\epsilon=5,06\%$
43	40.05; 43.62; 37.55; 42.13; 41.54; 40.28	$\bar{X}=40,86\%$; SD=2.08; $\Delta\bar{X}=2,18$; $\epsilon=5,34\%$
Метод В.Ф. Крамаренко		
0.6	35.76; 30.83; 31.47; 32.14; 33.52; 37.39	$\bar{X}=33,52\%$; SD=2.58; $\Delta\bar{X}=2,71$; $\epsilon=8,08\%$
2.0	37.45; 33.26; 32.42; 36.72; 30.57; 30.34	$\bar{X}=33,46\%$; SD=3.03; $\Delta\bar{X}=3,17$; $\epsilon=9,49\%$
43	31.57; 33.12; 36.24; 36.88; 37.57; 30.73	$\bar{X}=34,35\%$; SD=2.92; $\Delta\bar{X}=3,07$; $\epsilon=8,92\%$

Полученные данные свидетельствуют о том, что методом Стаса-Отто из печени изолируется 32.64–33.23% рисперидона, методом А.А. Васильевой – 40.54–41.09%, методом В.Ф. Крамаренко – 33.46–34.35%.

Таблица 5
Table. 5

Степень извлечения рисперидона из почек
The degree of extraction of risperidone from the kidneys

Внесено, мкг	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики
Метод Стаса-Отто		
0.6	28.05; 29.56; 33.91; 30.07; 30.46; 27.94	$\bar{X}=30,00\%$; SD=2.18; $\Delta\bar{X}=2,29$; $\epsilon=7,62\%$
2.0	30.27; 27.25; 31.89; 29.46; 30.74; 33.79	$\bar{X}=30,57\%$; SD=2.21; $\Delta\bar{X}=2,32$; $\epsilon=7,60\%$
43	29.66; 30.79; 30.95; 26.15; 28.47; 32.25	$\bar{X}=30,38\%$; SD=2.56; $\Delta\bar{X}=2,69$; $\epsilon=8,84\%$
Метод А.А. Васильевой		
0.6	39.08; 40.45; 37.61; 38.56; 32.44; 39.33	$\bar{X}=37,91\%$; SD=2.84; $\Delta\bar{X}=2,98$; $\epsilon=7,85\%$
2.0	39.56; 38.48; 39.13; 33.43; 37.62; 35.75	$\bar{X}=37,33\%$; SD=2.34; $\Delta\bar{X}=2,45$; $\epsilon=6,57\%$
43	35.62; 39.74; 34.65; 41.34; 38.30; 39.37	$\bar{X}=38,17\%$; SD=2.56; $\Delta\bar{X}=2,69$; $\epsilon=7,05\%$
Метод В.Ф. Крамаренко		
0.6	35.08; 33.77; 29.41; 34.99; 31.85; 30.16	$\bar{X}=32,54\%$; SD=2.46; $\Delta\bar{X}=2,57$; $\epsilon=7,88\%$
2.0	30.82; 34.35; 35.68; 32.04; 31.93; 35.37	$\bar{X}=33,37\%$; SD=2.03; $\Delta\bar{X}=2,13$; $\epsilon=6,39\%$
43	33.33; 35.62; 34.74; 29.87; 30.13; 31.29	$\bar{X}=32,50\%$; SD=2.43; $\Delta\bar{X}=2,55$; $\epsilon=7,83\%$



Полученные данные свидетельствуют о том, что методом Стаса-Отто из почек изолируется 30.00–30.57 % рisperидона, методом А.А. Васильевой – 37.33–38.17%, методом В.Ф. Крамаренко – 32.50–33.37 %.

На основании полученных данных при изолировании рisperидона из водных растворов нами разработана оптимальная методика изолирования рisperидона из внутренних органов. Навеску измельченного объекта заливали 40% раствором этанола (1:2), подщелачивали 25% раствором аммиака до рН 10, прибавляли 1 мл 10% раствора натрия карбоната и 3 мл хлороформа. Содержимое колбы взбалтывали в течение 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 95% этанола и анализировали.

Обнаружение и количественное определение рisperидона проводили методом ВЭЖХ. Полученные данные представлены в табл. 6, 7.

Таблица 6
Table. 6

Степень извлечения рisperидона из печени
The degree of extraction of risperidone from the liver

Внесено, мкг	Извлечение из раствора с рН=10	
	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики
6	69.34; 68.51; 66.33; 66.08; 67.75; 66.16	\bar{X} =67.36%; SD=1.38; $\Delta\bar{X}$ =1.45; ϵ =2.15 %
20	68.85; 67.40; 66.23; 65.44; 68.12; 68.27	\bar{X} =66.89%; SD=1.53; $\Delta\bar{X}$ =1.60; ϵ =2.40 %
43	66.21; 66.46; 68.97; 67.42; 65.39; 69.24	\bar{X} =67.28%; SD=1.56; $\Delta\bar{X}$ =1.63; ϵ =2.43 %

Полученные данные коррелируют с результатами экстракции рisperидона из водных растворов. В извлечении из раствора с рН=10 удается обнаружить 66.89–67.36% рisperидона.

Таблица 7
Table. 7

Степень извлечения рisperидона из почек
The degree of extraction of risperidone from the kidneys

Внесено, мкг	Извлечение из раствора с рН=10	
	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики
6	64.81; 63.35; 62.99; 63.74; 64.15; 64.66	\bar{X} =64.13%; SD=1.42; $\Delta\bar{X}$ =1.49; ϵ =2.32%
20	66.22; 64.34; 63.51; 66.72; 66.50; 63.87	\bar{X} =65.19%; SD=1.44; $\Delta\bar{X}$ =1.51; ϵ =2.32%
43	63.67; 64.07; 65.44; 66.35; 62.41; 64.79	\bar{X} =64.46%; SD=1.39; $\Delta\bar{X}$ =1.46; ϵ =2.26%

В извлечении из раствора с рН=10 обнаруживается 64.13–65.19% рisperидона.

Разработанные методики анализа рisperидона в извлечениях из печени и почек валидированы по показателям: специфичность, линейность, прецизионность, правильность, предел количественного определения, степень извлечения и стабильность аналита.

Нами был установлен предел количественного определения рisperидона в извлечениях из печени с помощью метода «десяти сигма». Результаты установления предела обнаружения представлены в табл. 8.

Таблица 8
Table. 8

Результаты вычисления предела количественного определения рисперидона в печени
The results of calculation of limit of quantification definition of risperidone in the liver

Площади пиков фоновых сигналов	Концентрация определяемого вещества, мкг/г	Площадь пика	Коэффициент чувствительности
11	5	48.2	SD=4.09 S=7.30 LOQ=5.60 мкг/г
7	10	75.6	
9	15	117.1	
15	20	160.5	
5	25	200	
4	30	230.8	

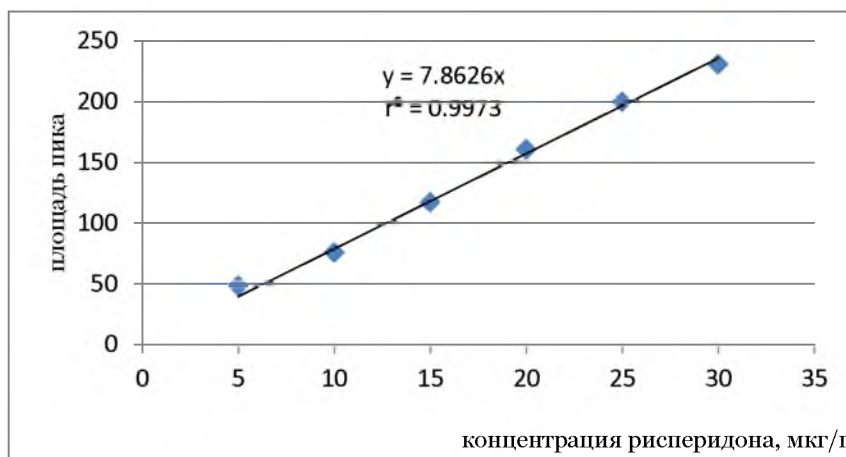


Рис. 2. Градуировочный график зависимости площади пика от концентрации рисперидона в печени
 Fig. 2. Calibration graph of peak area the concentration of risperidone in the liver

Как следует из представленных данных, с помощью разработанной методики можно определить 5.60 мкг/г рисперидона в печени.

Результаты определения прецизионности и правильности определения рисперидона в извлечениях из печени методом ВЭЖХ в течение первого дня (intra-day) и второго дня (inter-day) исследований представлены в табл. 9.

Таблица 9
Table. 9

Результаты оценки прецизионности и правильности изолирования рисперидона из печени
The results of the evaluation and correctness precisionist the isolation of risperidone from the liver

№ п/п	Уровень	Внесено, мкг	Найдено, мг	R, %	Метрологические характеристики
intra-day					
1	1	10.0	6.5019	65.02	$\bar{R}=64.60\%$; SD=2.57 RSD=3.98%; $\varepsilon=\pm 9.85\%$
2	1	10.0	6.0357	60.36	
3	1	10.0	6.8431	68.43	
4	2	20.0	12.3580	61.79	$\bar{R}=65.25\%$; SD=1.90 RSD=2.91%; $\varepsilon=\pm 7.22\%$
5	2	20.0	13.4238	67.12	
6	2	20.0	13.3696	66.85	
7	3	30.0	19.9052	66.35	$\bar{R}=66.16\%$; SD=1.68 RSD=2.54%; $\varepsilon=\pm 6.31\%$
8	3	30.0	19.0225	63.41	
9	3	30.0	20.6163	68.72	
inter-day					
1	1	10.0	6.4331	64.33	$\bar{R}=64.87\%$; SD=1.46 RSD=1.87%; $\varepsilon=\pm 5.59\%$
2	1	10.0	6.7403	67.40	
3	1	10.0	6.2880	62.88	
4	2	20.0	12.6084	63.04	$\bar{R}=63.62\%$; SD=1.09 RSD=1.64%; $\varepsilon=\pm 4.23\%$
5	2	20.0	12.4539	62.27	
6	2	20.0	13.1096	65.55	
7	3	30.0	19.6825	65.61	$\bar{R}=63.19\%$; SD=1.35 RSD=2.14%; $\varepsilon=\pm 5.32\%$
8	3	30.0	18.7178	62.39	
9	3	30.0	18.4680	61.56	



Относительное стандартное отклонение и относительная ошибка не превышает 20% для минимальной концентрации и 15% – для остальных концентраций [Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2001; Guideline on validation of bioanalytical methods (draft), 2009].

Для установления предела количественного определения рисперидона в извлечениях из почек также использовался метод «десяти сигма». Результаты установления предела количественного определения представлены в табл. 10.

Таблица 10
Table. 10

Результаты вычисления предела количественного определения рисперидона в извлечении из почек
The results of calculation of limit of quantification definition of risperidone in the extract from the kidneys

Площади пиков фоновых сигналов	Концентрация определяемого вещества, мкг/г	Площадь пика	Коэффициент чувствительности
6	5	45.6	SD=3.98 S=7.85 LOQ=5.07 мкг/г
1	10	78.4	
7	15	125.7	
10	20	156.4	
4	25	202.1	
12	30	241.9	

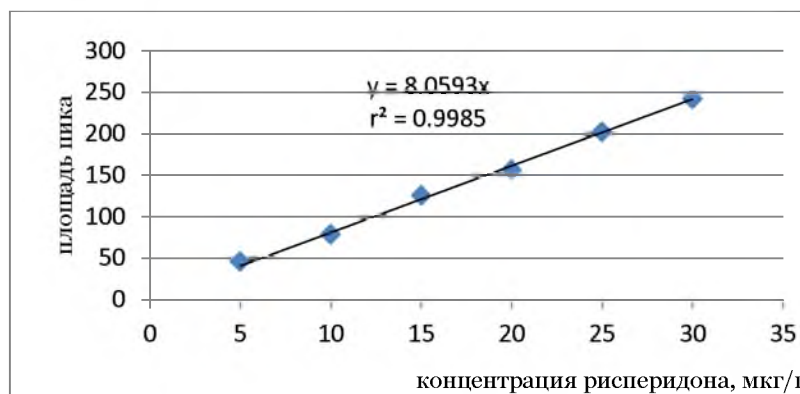


Рис. 3. Градуировочный график зависимости площади пика от концентрации рисперидона в почках
Fig. 3. Calibration graph of peak area the concentration of risperidone the kidneys

Как следует из представленных данных, с помощью разработанной методики можно определить 5.07 мкг/г рисперидона в почках.

Результаты определения прецизионности и правильности определения рисперидона в извлечениях из печени методом ВЭЖХ в течение первого дня (intra-day) и второго дня (inter-day) исследований представлены в табл. 11.

Таблица 11
Table. 11

Результаты оценки прецизионности и правильности количественного определения рисперидона из почек
The results of the evaluation and correctness precisionist for the quantitative determination of risperidone from the kidneys

№ п/п	Уровень	Внесено, мкг	Найдено, мкг	R, %	Метрологические характеристики
intra-day					
1	1	5.0	3.3175	66.35	\bar{R} =66.16 %; SD=1.68 RSD=2.54%; ϵ =±6.31%
2	1	5.0	3.1705	63.41	
3	1	5.0	3.4360	68.72	
4	2	15.0	9.2685	61.79	\bar{R} =65.25 %; SD=1.90 RSD=2.91%; ϵ =±7.22%
5	2	15.0	10.0681	67.12	
6	2	15.0	10.0275	66.85	



Продолжение таблицы 11

7	3	25.0	16.2553	65.02	$\bar{R}=65.60\%$; $SD=2.56$ $RSD=3.90\%$; $\varepsilon=\pm 9.85\%$
8	3	25.0	15.0912	60.36	
9	3	25.0	17.1075	68.43	
inter-day					
1	1	5.0	3.2805	65.61	$\bar{R}=63.19\%$; $SD=1.35$ $RSD=2.14\%$; $\varepsilon=\pm 5.32\%$
2	1	5.0	3.1195	62.39	
3	1	5.0	3.0779	61.56	
4	2	15.0	9.4561	63.04	$\bar{R}=63.62\%$; $SD=1.09$ $RSD=1.71\%$; $\varepsilon=\pm 4.23\%$
5	2	15.0	9.3405	62.27	
6	2	15.0	9.8325	65.55	
7	3	25.0	16.0825	64.33	$\bar{R}=64.87\%$; $SD=1.46$ $RSD=2.25\%$; $\varepsilon=\pm 5.59\%$
8	3	25.0	16.8500	67.40	
9	3	25.0	15.7197	62.88	

Относительное стандартное отклонение и относительная ошибка не превышает 20% для минимальной концентрации и 15% – для остальных концентраций [Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2001; Guideline on validation of bioanalytical methods (draft), 2009].

Таким образом, разработанная методика может быть использована для обнаружения рисперидона в извлечениях из внутренних органов.

Приказ Минздрава России от 12 мая 2010 года «Об утверждении порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации» рекомендует для судебно-химических экспертиз использовать различные внутренние органы, учитывая распределение, скорость выведения, фармакокинетику токсических веществ. Поэтому нами была осуществлена рекомендация по выбору внутренних органов после создания модели острого отравления на белых мышках.

Изолирование рисперидона из печени, почек, головного мозга, сердца, желудка и кишечника с содержимым проводили по методу А.А. Васильевой, основанном на извлечении токсических веществ водой, подкисленной щавелевой кислотой до pH 2-2.5, поскольку полученные данные по изолированию рисперидона из модельных смесей свидетельствуют о максимальном его извлечении при использовании классических методов. Также для сравнения использовали разработанную нами методику изолирования рисперидона. Экстракцию рисперидона осуществляли из щелочной среды. Растворители удаляли при комнатной температуре. Сухие остатки, полученные после испарения экстрагента, растворяли в 5 мл 95% этанола и анализировали.

Обнаружение и количественное определение рисперидона проводили методом ВЭЖХ. Данные и статистическая обработка результатов определения рисперидона в печени, почках, мозге представлены в табл. 12.

Таблица 12
Table. 12

Степень извлечения рисперидона из внутренних органов
The degree of extraction of risperidone from the internal organs

Внутренний орган	Метод А.А. Васильевой		Разработанная методика	
	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики
Печень	2.68; 1.72; 2.03; 2.27; 2.31; 2.47	$\bar{X}=2.25\%$; $SD=0.34$; $\Delta\bar{X}=0.36$; $\varepsilon=15.72\%$	3.45; 3.88; 4.62; 4.29; 4.71; 4.94	$\bar{X}=4.32\%$; $SD=0.56$; $\Delta\bar{X}=0.59$; $\varepsilon=13.66\%$
Почки	3.15; 2.46; 2.78; 2.02; 2.93; 3.37	$\bar{X}=2.79\%$; $SD=0.49$; $\Delta\bar{X}=0.51$; $\varepsilon=18.36\%$	5.05; 5.21; 4.74; 4.83; 4.26; 4.44	$\bar{X}=4.76\%$; $SD=0.36$; $\Delta\bar{X}=0.38$; $\varepsilon=7.91\%$
Мозг	7.84; 8.02; 7.11; 8.24; 7.66; 7.30	$\bar{X}=7.70\%$; $SD=0.43$; $\Delta\bar{X}=0.45$; $\varepsilon=5.86\%$	9.32; 7.87; 8.35; 8.50; 7.91; 8.65	$\bar{X}=8.43\%$; $SD=0.54$; $\Delta\bar{X}=0.56$; $\varepsilon=6.66\%$

На основании полученных результатов нами рекомендуется в качестве оптимального биологического объекта при исследовании внутренних органов на рисперидон использовать почки и мозг. Уступающим по содержанию рисперидона биологическим объектом является печень. В желудке с содержимым и кишечнике с содержимым рисперидон не определялся.



Заключение

Изучено влияние природы органического растворителя, pH среды, наличие электролита, время и кратность экстракции на изолирование рисперидона. Для экстракции рисперидона из растворов оптимальным органическим растворителем является метиленхлорид, который экстрагирует исследуемое вещество при pH=10 в максимальном количестве. Установлено, что раствор натрия карбоната 10% обладает высаливающим действием для рисперидона. Увеличение времени и кратности экстракции рисперидона на изолирование не влияет. Проведено изолирование рисперидона из модельных образцов внутренних органов трупа (печень и почки) общими и частными методами: Стаса-Отто, А.А. Васильевой, В.Ф. Крамаренко. Полученные данные свидетельствуют о том, что этими методами рисперидон изолируется из трупной печени и почек менее 50%, что свидетельствует о необходимости совершенствования методики его изолирования. Разработана методика изолирования рисперидона с помощью извлекателя 40% этанола при оптимальном значении pH среды. Предложено применять дополнительную очистку извлечений с помощью диэтилового эфира. Разработанная методика изолирования валидирована по показателям: специфичность, линейность, прецизионность, правильность, предел количественного определения, степень извлечения, стабильность анализа. Результаты проведенных исследований на модели острого отравления белых мышей позволили сделать выбор объектов судебно-химического анализа на рисперидон.

Список литературы References

- Булатов Р.М. 2009. Разработка методики обнаружения рисперидона, галоперидола и аминазина при совместном присутствии на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии. Актуальные вопросы судебно-химических, химико-токсикологических исследований и фармацевтического анализа: материалы Российской научно-практической конференции с международным участием (28 сентября – 3 октября 2009 г.). Пермь: 65–67.
- Bulatov R.M. 2009. Razrabotka metodiki obnaruzheniya risperidona, galoperidola i aminazina pri sovmestnom prisutstvii na osnove vysokoeffektivnoy zhidkostnoy khromatografii. Aktual'nye voprosy sudebno-khimicheskikh, khimiko-toksikologicheskikh issledovaniy i farmatsevticheskogo analiza [Development of a technique of detection of a risperidon, haloperidol and aminazine at joint presence on the basis of a highly effective liquid chromatography. Topical issues of judicial and chemical, chemical and toxicological researches and pharmaceutical analysis]: materialy Rossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem (28 sentyabrya – 3 oktyabrya 2009 g.). Perm': 65–67. (in Russian)
- Булатов Р.М., Малкова Т.Л., Саломатин Е.М. 2011. Химико-токсикологическое исследование рисперидона и его активного метаболита 9-гидроксирисперидона в биологических объектах. М., ФГБУ РЦСМЭ Минздрава России: 26.
- Bulatov R.M., Malkova T.L., Salomatin E.M. 2011. Khimiko-toksikologicheskoe issledovanie risperidona i ego aktivnogo metabolita 9-gidroksirisperidona v biologicheskikh ob"ektakh [Chemical and toxicological research of a risperidon and its active metabolite of a 9-gidroksirisperidon in biological objects]. М., FGBU RTsSME Minzdravsotsrazvitiya Rossii: 26. (in Russian)
- Мансурова Р.Г., Смирнова Л.Д. 2007. Изолирование рисперидона из биологического материала и его идентификация. Современные проблемы медико-криминал., судебно-химич. и химико-токсикол. экспертн. исслед.: сб. материалов Всерос. науч.-практ. конф. М.: 256–258.
- Mansurova R.G., Smirnova L.D. 2007. Izolirovanie risperidona iz biologicheskogo materiala i ego identifikatsiya [Isolation of a risperidon from biological material and its identification]. Sovremennye problemy mediko-kriminal., sudebno-khimich. i khimiko-toksikol. ekspertn. issled.: sb. materialov Vseros. nauch.-prakt. konf. М.: 256–258. (in Russian)
- Малыхин Н.В. 2003. Сравнительная эффективность рисперидона, клоzapина и галоперидола в лечении пизоаффективных расстройств с маниакальной симптоматикой. Медицинские новости. 5: 60–64.
- Malykhin N.V. 2003. Sravnitel'naya effektivnost' risperidona, klozapina i galoperidola v lechenii shizoaffektivnykh rasstroystv s maniakal'noy simptomatikoy [Comparative efficiency of a risperidon, clozapine and haloperidol in treatment the shizoaffektivnykh of frustration with maniacal symptomatology]. Meditsinskie novosti. 5: 60–64. (in Russian)
- Ремезова И.П. 2010. Разработка спектрофотометрической методики анализа рисперидона в таблетках и ее валидация. Вестник российского университета дружбы народов. Серия: Медицина.(4): 432–435.
- Remezova I.P. 2010. Razrabotka spektrofotometricheskoy metodiki analiza risperidona v tabletkakh i ee validatsiya [Development of a spektrofotometricheskoy technique of the analysis of a risperidon in tablets and its validation]. Vestnik rossiyskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Meditsina.(4): 432–435. (in Russian)
- Стандарты/протоколы оказания помощи больным пизофренией под ред. В.Н. Краснова, И.Я. Гуровича, С.Н. Мосолова, А.Б. Шмуклера. [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. (1 файл). URL: <http://www.labclinpharm.ru/35.html>.
- Standarty/protokoly okazaniya pomoshchi bol'nym shizofreniy [Standards/protocols of assistance to patients with schizophrenia] pod red. V.N. Krasnova, I.Ya. Gurovicha, S.N. Mosolova, A.B. Shmuklera [Elektronnyy resurs]. – Elektron. dan. (1 fayl). URL: <http://www.labclinpharm.ru/35.html>. (in Russian)
- Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2001. Washington, U.S. Government Printing Office, 22.
- Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). 2009. European Medicines Agency. London, Committee for medicinal products for human use, 23.
- Maximilian Gahr, Markus A Kölle, Carlos Schönfeldt-Lecuona, Peter Lepping, Roland W Freudemann. 2011. Paliperidone extended-release: does it have a place in antipsychotic therapy? Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3063117/>.