

Разработка методики определения рисперидона и 9-гидроксирисперидона на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии для химико-токсикологического анализа

БУЛАТОВ Р.М.
МАЛКОВА Т.Л.

аспирант кафедры токсикологической химии, e-mail: gustavfarm@mail.ru
к.фарм.н., доцент, зав. кафедрой токсикологической химии, e-mail: kaftox@mail.ru (Пермская государственная фармацевтическая академия, кафедра токсикологической химии, 614990, г.Пермь, ул. Большевикская, 101 (юридический адрес); 614070, г.Пермь, а/я 2600

Атипичный нейролептик рисперидон эффективно контролирует позитивные и негативные симптомы шизофрении и является препаратом первого выбора. В организме он метаболизируется до 9-гидроксирисперидона (палиперидона), который обладает аналогичным фармакологическим действием. Фармацевтической компанией налажено производство палиперидона в специально разработанной капсуле под торговым названием «инвега». В зарубежной и отечественной литературе описаны случаи острых отравлений рисперидоном, в том числе с летальным исходом. На кафедре токсикологической химии была разработана методика определения рисперидона и 9-гидроксирисперидона в биологической жидкости (моче) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием прибора Shimadzu LC-20 Prominence для проведения химико-токсикологического анализа, терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ) рисперидона и палиперидона при лечении.

Ключевые слова: шизофрения, антипсихотические препараты (нейролептики), химико-токсикологический анализ, высокоэффективная жидкостная хроматография, терапевтический лекарственный мониторинг

Введение

Для лечения шизофрении уже более 40 лет применяются антипсихотические препараты (нейролептики). Однако при использовании классических нейролептиков, таких, как аминазин, галоперидол, частота возникновения побочных эффектов была достаточно высокой, что привело к необходимости поиска новых более безопасных лекарств [14].

Таким образом, были получены новые препараты, которые, несмотря на большую химическую и фармакологическую гетерогенность, получили общее название класса атипичных нейролептиков. Данные препараты за последние годы стали неотъемлемой частью лечения больных шизофренией [1]. Причины популярности этих соединений у психиатров хорошо известны и сводятся, во-первых, к отсутствию возникновения неврологических побочных эффектов, характерных для классических нейролептиков, во-вторых, обусловлены тем, что при их применении можно рассчитывать на наступление какого-то улучшения у больных шизофренией с явлениями терапевтической резистентности и негативной симптоматикой [5].

Одним из представителей атипичных нейролептиков является рисперидон, производное бензизоксазола. Применяется чаще всего для лечения психозов при шизофрении, а также в терапии некоторых форм биполярного расстройства, психотической депрессии [4, 13]. Антипсихотическое действие препарата об-

условлено блокадой дофаминовых D₂-рецепторов мезолимбической и мезокортикальной системы. Помимо этого он оказывает достаточно выраженное седативное, противорвотное и гипотермическое действие [6]. Фармакокинетические данные свидетельствуют о том, что рисперидон при приеме внутрь абсорбируется быстро и полностью, при этом пища не влияет на полноту и скорость абсорбции. Максимум концентрации препарата в плазме крови достигается через 1—2 ч. Он на 90% связывается с белками плазмы крови и достаточно быстро проникает в центральную нервную систему [12].

В организме данный препарат метаболизируется до активного метаболита 9-гидроксирисперидона, который обладает аналогичным фармакологическим действием. Его удалось синтезировать и в настоящее время он известен под названием *палиперидон*. Попадая в организм, он уже практически не поступает в печень, а сразу начинает воздействовать на мозговые структуры. Фармацевтической компанией налажен выпуск лекарственного препарата на основе палиперидона в оригинальной форме таблеток пролонгированного действия под торговым названием «инвега» [3].

В зарубежной и отечественной литературе описаны случаи острых отравлений, нередко с летальным исходом. Как правило, это связано с возникновением побочных эффектов и передозировкой рисперидона.

Во-первых, это касается синдрома удлиненного интервала QT (СУИ QT) [2, 10], который характеризует электрическую систолу желудочков и зависит от пола, возраста и частоты сердечных сокращений [7, 9]. Описано незначительное увеличение интервала QT (4 мс) при приеме рисперидона без достоверных изменений дисперсии QT. При передозировке рисперидона (24 мг в сутки) регистрируются значительные изменения на ЭКГ. Описан случай летального исхода, связанный с кардиотоксическим действием препарата [19].

Во-вторых, причиной острых отравлений и летальных случаев является злокачественный нейролептический синдром (ЗНС). Среди опубликованных клинических наблюдений, исключая те, где вместе с препаратами нового поколения больной принимал и типичные нейролептики, в 21 наблюдении сообщают о ЗНС при лечении рисперидоном [18].

В-третьих, немедицинское использование рисперидона и палиперидона больными с целью суицида могут приводить к острым отравлениям, часто заканчивающимся летальным исходом [8, 11, 15, 16, 17]. Как правило, это возникает у пациентов, использующих данные лекарственные препараты в лечении. Несистематический прием препаратов или отказ от них приводит к обострению болезни, в связи с чем увеличивается вероятность суицида, в том числе с использованием данных лекарственных препаратов.

В-четвертых, при изменении лечения и при переходе с традиционных нейролептиков, таких, как аминазин, галоперидол, на рисперидон могут возникать случаи неправильной дозировки лекарственного средства, приводящие к увеличению побочных реакций, интоксикациям, отравлениям.

В последние годы все больше внимания уделяется проведению терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ). Он основан на определении концентрации лекарственного вещества и его метаболитов в плазме крови или других биологических жидкостях организма. Мониторинг проводят для контроля за лекарственной терапией с тем, чтобы концентрация лекарственного вещества не превысила минимальную токсическую и не была ниже минимальной терапевтической.

Данные, полученные при ТЛМ, незамедлительно используют для установления индивидуальных особенностей фармакокинетики принимаемых лекарств у данного больного и оптимизации лекарственной терапии.

Клиника течения отравлений рисперидоном во многом зависит от возраста, пола, дозы принятого лекарства и не является характерной и специфичной. Поэтому важную роль играет химико-токсикологический анализ, позволяющий установить присутствие

данного вещества в организме, с использованием максимально чувствительных физико-химических методов определения: хроматографических, спектроскопических, иммунохимических.

Анализ данных литературы свидетельствует о том, что не было проведено систематических исследований по разработке методик изолирования из биологических объектов, а также идентификации рисперидона и его активного метаболита 9-гидроксирисперидона. В 2007 г. Р.Г. Мансурова с соавторами сообщили о подходах к проведению судебно-химического анализа рисперидона в трупном материале хроматографическими методами [8].

Таким образом, *целью данной работы* является разработка методики обнаружения и количественного определения рисперидона и 9-гидроксирисперидона в биологической жидкости (моче) при совместном присутствии с галоперидолом и аминазином для целей химико-токсикологического анализа.

Объект и методы исследования

В своей работе мы использовали обращенно-фазный вариант ВЭЖХ с применением жидкостного хроматографа Shimadzu LC-20 Prominence с программным комплексом LC Solutions, оснащенный диодно-матричным детектором. Разделение исследуемых веществ производили на хроматографической колонке Discovery C18 диаметром 4,6 мм, длиной 25 см, диаметр зерен сорбента 5 мкм. Выбор оптимального состава подвижной фазы (элюента) проводили с использованием воды, буферных растворов (фосфатный pH 3,2, 6,4, ацетатный pH 3,2, 4,0, 5,2, 6,4) в смеси с ацетонитрилом и добавлением поверхностно-активных веществ (гексилсульфонат натрия (ГСН), лаурилсульфонат натрия (ЛСН)).

В качестве стандартных образцов были приготовлены метанольные растворы рисперидона, 9-гидроксирисперидона с концентрацией 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 мкг/мл, а также галоперидола и аминазина.

Для изолирования исследуемых веществ использовали метод жидкость-жидкостной экстракции. Выбор оптимального значения pH и экстрагента (диэтиловый эфир, хлороформ, хлороформ-бутанол (9:1), хлороформ-изопропанол (9:1), метилхлорид, этилацетат) проводили с использованием свежеприготовленного раствора Бриттона—Робинсона. Контролировали pH с помощью универсального иономеров ЭВ-74.

Полученные на стандартных растворах условия экстракции применяли к образцам мочи больных из ОГУЗ «Свердловская областная клиническая психиатрическая больница».

Результаты и их обсуждение

По результатам проведённых исследований предложены следующие условия анализа рисперидона, 9-гидроксирисперидона, галоперидола, аминазина при совместном присутствии (рис. 1) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Shimadzu LC-20 Prominence:

- подвижная фаза: ацетонитрил : буферный раствор (ацетатный pH=5,2), режим элюирования — градиентный (увеличение содержания ацетонитрила от 20 до 90% за 10 мин, 90% с 10 до 13 мин, от 90 до 20% с 13 до 20 мин);
- объём вводимой пробы — 30 мкл;
- детектор диодно-матричный (длины волн 280, 275, 253, 243 нм);
- скорость потока элюента — 1 мл/мин;
- температура колонки — 40°C.

В качестве параметра идентификации использовали УФ-спектры определяемых веществ. Времена удерживания рисперидона, 9-гидроксирисперидона, галоперидола, аминазина составляют 9,33, 9,82, 10,12, 11,44 мин соответственно.

В разработанных условиях наблюдается хорошее разделение исследуемых веществ, полученные пики имеют правильную и симметричную форму. Добавление поверхностно-активных веществ ГСН, ЛСН и повышение температуры термостата колонки с 40 до 80°C не повлияло на эффективность хроматографирования.

Для количественного определения исследуемых веществ нами предложен метод абсолютной калибровки. В качестве параметра, характеризующего содержание исследуемого вещества в пробе, мы использовали площадь хроматографического пика.

Для построения калибровочного графика готовили стандартные растворы рисперидона и 9-гидроксирисперидона в метаноле в диапазоне концентраций 0,625—10 мкг/мл. Растворы хроматографировали в разработанных условиях, измеряли площади хроматографических пиков и строили калибровочный график. Каждая точка на калибровочном графике была получена как среднее пяти параллельных измерений.

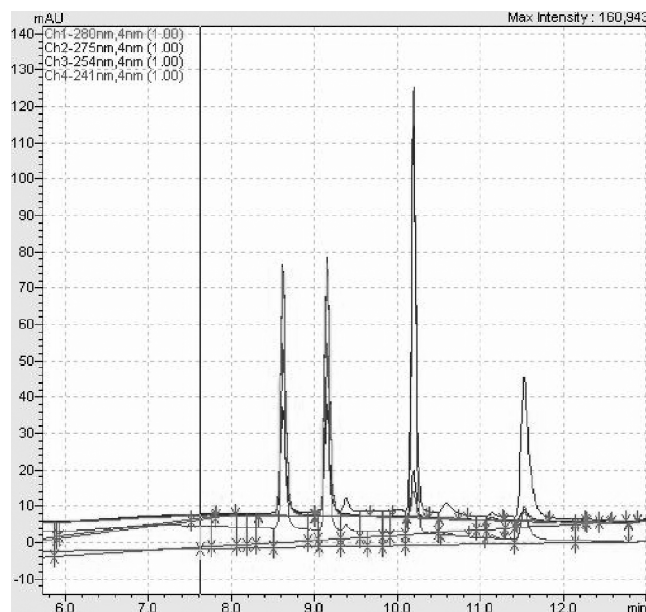


Рис. 1. Хроматограмма исследуемых веществ (рисперидон, 9-гидроксирисперидон, галоперидол, аминазин)

В таблице представлены полученные значения площадей хроматографических пиков растворов исследуемых веществ с известными концентрациями.

Калибровочные графики определения исследуемых веществ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии приведены на рис. 2, 3.

Линейная зависимость между концентрацией растворов и площадью хроматографического пика наблюдается во всем интервале выбранных концентраций.

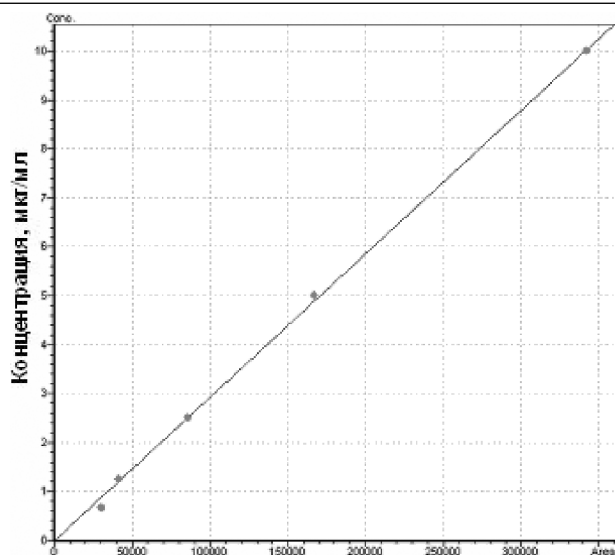
Предел обнаружения веществ был рассчитан при помощи программного обеспечения хроматографа LC Solutoins, и составил 8,87 нг и 7,18 нг для рисперидона и 9-гидроксирисперидона соответственно.

Изучение условий экстракции токсических веществ органическими растворителями имеет значение как для выделения их из водных растворов, так и для разработки наиболее эффективных методов изолирования этих веществ из биологических объектов.

Таблица

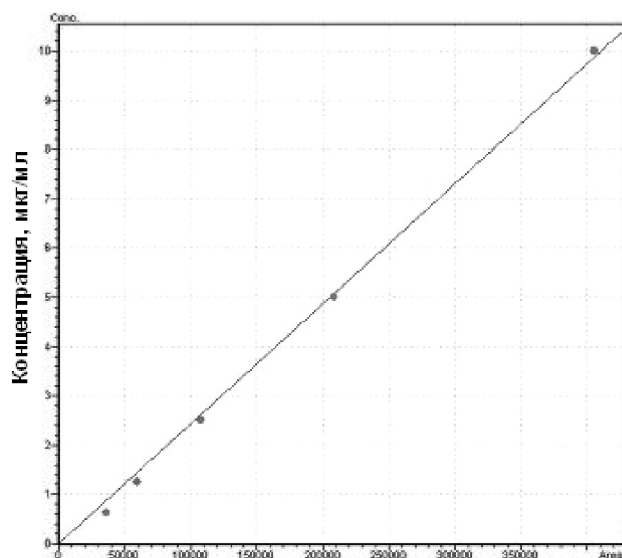
Зависимость площади хроматографического пика от концентрации стандартных растворов рисперидона и 9-гидроксирисперидона

Концентрация растворов, мкг/мл	Площадь хроматографического пика (S), Au*мкл (средний результат пяти параллельных измерений)	
	Рисперидон	9-гидроксирисперидон
0,625	29 372	35 962
1,25	41 338	59 217
2,5	85 707	108 003
5	168 935	208 802
10	342 092	405 458



Площадь хроматографического пика, Аи 'мкл

Рис. 2. Калибровочный график количественного определения рисперидона методом ВЭЖХ



Площадь хроматографического пика, Аи 'мкл

Рис. 3. Калибровочный график количественного определения 9-гидроксирисперидона методом ВЭЖХ

Впервые нами было изучено влияние на процесс экстракции рисперидона и 9-гидроксирисперидона следующих факторов: природы органического растворителя и pH буферного раствора (рис. 4, 5). Значение степени извлечения рассчитывалось как среднее пяти параллельных измерений.

Установлено, что рисперидон и 9-гидроксирисперидон лучше извлекаются из водного раствора метилхлоридом при pH 11 и степень извлечения составляет 67,24 и 69,01% соответственно.

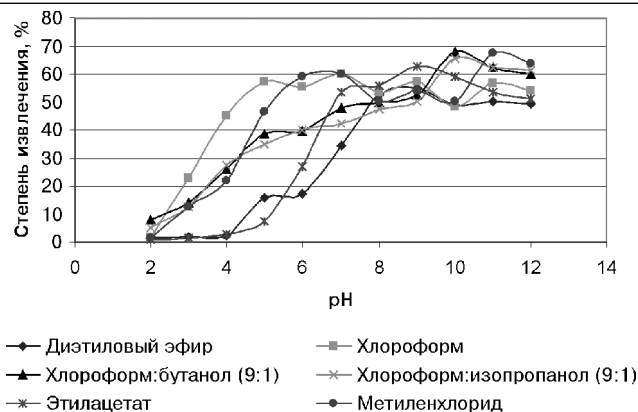


Рис. 4. Результаты экстракции рисперидона из водных растворов органическими растворителями

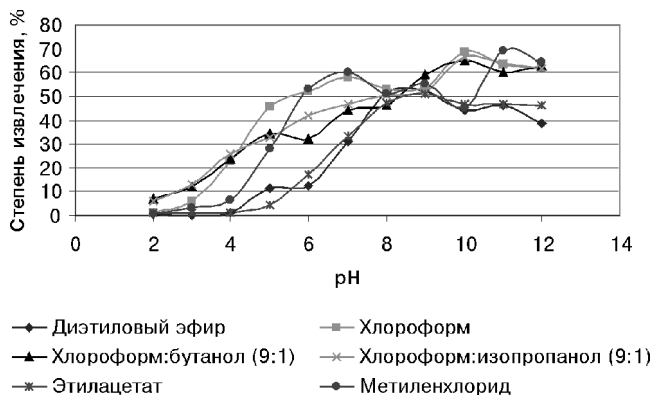


Рис. 5. Результаты экстракции 9-гидроксирисперидона из водных растворов органическими растворителями

Данная методика апробирована на реальной моче больного (рис. 6), которая была получена в ОГУЗ «Свердловская областная клиническая психиатрическая больница». Определено количественное содержание рисперидона и 9-гидроксирисперидона методом абсолютной калировки, которое составило 2,26 и 0,49 мкг/мл.

Предлагаемая методика отличается высокой чувствительностью, даёт хорошо воспроизводимые результаты, позволяет определять как токсические, так и терапевтические концентрации исследуемых веществ.

Таким образом, она может быть использована и для проведения ТЛМ рисперидона и лекарственного препарата, созданного на основе палиперидона («инвега») при лечении.

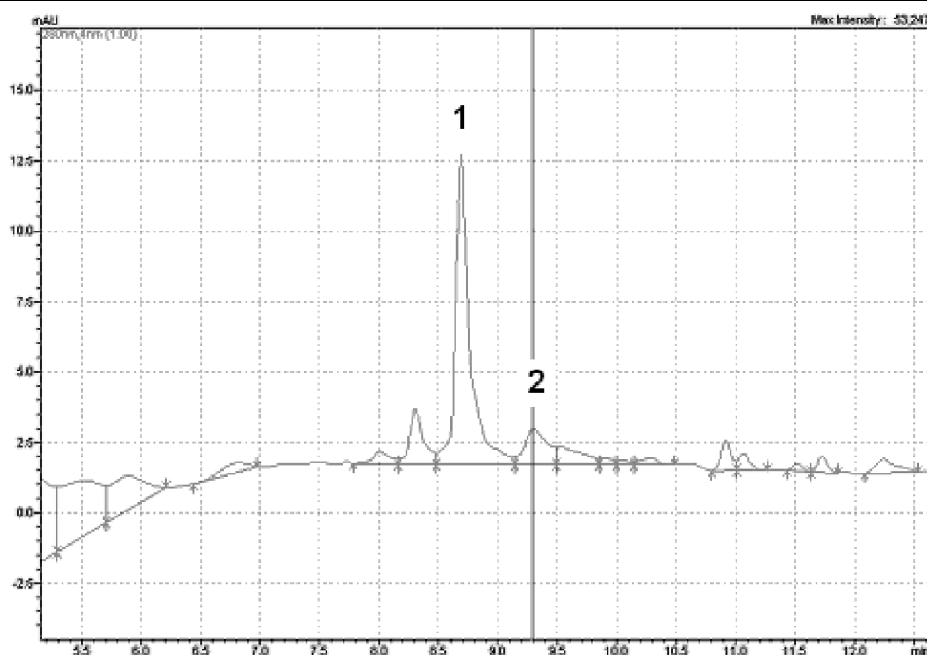


Рис. 6. Хроматограмма мочи больного: 1 — 9-гидроксирисперидон; 2 — рисперидон

Выводы

1. Атипичные нейролептики рисперидон и палиперидон эффективно контролируют позитивные и негативные симптомы шизофрении и являются препаратами первого выбора;

2. Побочные эффекты, передозировка, а также немедицинское использование рисперидона могут приводить к острым отравлениям;

3. В настоящее время отсутствуют методики определения рисперидона и 9-гидроксирисперидона для химико-токсикологического анализа;

4. Были выбраны оптимальные условия обнаружения и количественного определения рисперидона, 9-гидроксирисперидона методом ВЭЖХ при совместном присутствии с лекарственными препаратами (галоперидол, аминазин) с использованием прибора Shimadzu LC-20 Prominence, для химико-токсикологического анализа, которые могут быть использованы в работе аналитических служб учреждений здравоохранения (химико-токсикологических, клинко-диагностических лабораторий и судебно-химических отделений);

5. Изучены условия экстракции рисперидона и 9-гидроксирисперидона из водных растворов в зависимости от pH среды и природы органического растворителя;

6. Разработанная методика была применена в анализе проб биологических жидкостей (мочи), полученных от больных;

7. Данная методика может быть использована в терапевтическом лекарственном мониторинге рисперидона и палиперидона в лабораториях клинической фармакокинетики и фармакогенетики.

Список литературы

1. Бородин В.И. Атипичные антипсихотики — эффективная терапия при шизофрении // Здоров'я України. — 2007. — №6/1. — С. 68.
2. Брежев К. Суицид и шизофрения: дентификация факторов риска и превентивная стратегия // Русский медицинский сервер [Электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://www.rusmedserv.com/psychsex/suicide2.shtml>. — Загл. с экрана
3. Ветохина Т.Н., Федорова Н.В. Диагностика и лечение нейролептических экстрапирамидных расстройств: Методическое пособие. — М.: — 2006. — 17 с.
4. Регистр лекарственных средств России: энцикл. лекарств. Вып. 14 / Гл. ред. Г.Л. Вышковский. — М.: РЛС, 2006, 2005. — С. 786—787.
5. Калинин В.В. К проблеме отграничения новых нейролептиков от классических. Сопоставление клинического и нейрохимического подхода // Психиатрия и психофармакотер. — 2001. — №4. — С. 129—131.
6. Клиническая фармакология: Учеб. для мед. вузов / В.Г. Кулес, Д.А. Андреев, В.В. Архипов и др. / Под ред. В.Г. Кулеса. — 3-е изд-е перераб. и доп. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. — 936 с.: ил.
7. Лиманкина И.Н. Синдром удлиненного интервала QT и проблемы безопасности психофармакотерапии // Вестник аритмологии. — 2008. — С. 66—71.
8. Мансурова Р.Г., Смирнова Л.Д. Изолирование рисперидона из биологического материала и его идентификация // Современные проблемы медико-криминалистических, судебно-химических и химико-токсикологических экспертных исследований: Сб. материалов Всерос. науч.-практ. конф., посвящ. памяти проф. Ю.М. Кубицкого (31 октября — 01 ноября 2007 г., Москва) // Под ред. В.А. Клевню. —

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАРКОЛОГИИ

М.: РИО ФГУ «РЦСМЭ Росздрава», 2007. — С. 256—258.

9. Орлов В.Н. Руководство по электрокардиографии. — М.: ООО «Медицинское информационное агентство». — 2001. — 526 с.

10. Резников М.К., Ширяев О.Ю. Изменение интервала QT на электрокардиограмме при применении антипсихотических препаратов (обзор литературы) // Прикладные информационные аспекты медицины. — 2007. — Т. 1. — №10. — С. 107—111.

11. Bodiford E., Springfield A.C. An overdose of risperidone // J. Anal. Toxicol. — 1996. — №20 (3). — P. 202—203.

12. Pharmacokinetics of risperidone in chronic schizophrenic patients / Borison R.L., Diamond B., Pastiraja A. et al. // Psychopharmaceutical Bull. — 1994. — №30. — P. 193—194.

13. Risperidone: clinical safety and efficacy in schizophrenia / Borison R.L., Pathiraja A.P., Diamond B.I., Meibach R.C. // Psychopharmacol. Bull. — 1992. — №28. — P. 213—218.

14. Bridler R., Umbricht D. Atypical antipsychotics in the treatment of schizophrenia // Swiss Med. Wkly. — 2003. — №133 (5—6). — P. 63—76.

15. New clinical manifestations of acute risperidone poisoning / M.A. Castro-Villamor, A. Duenas-Laita, J.C. Martin-Escudero, J.L. Perez-Castrillon // J. Toxicol. Clin. Toxicol. — 1999. — №37(7). — P. 893—895.

16. Catalano G., Catalano M., Taylor W. Acute risperidone overdose // Clin. Neuropharmacol. — 1997. — Feb. 20(1). — P. 82—85.

17. A case of risperidone overdose in early schizophrenia: a review of potential complications / C. Day, B. Dillman, D. Gardner, L.C. Kopala // J. Psychiatry Neurosci. — 1998. — Nov. 23(5). — P. 305—308.

18. Advances in the pharmacotherapy of psychotic disorders / J.M. Davis, P.G. Janicak, S. Preskorn, F.J. Jr. Ayd // Principles and Practice of Psychopharmacotherapy. — 1994. — №1. — P. 1—14.

19. Schwartz P.J. The long Q-T syndrome / A. Malliani, M. Periti, P.J. Schwartz // Am. Heart J. — 1975. — №89. — P. 378—390.

DEVELOPMENT OF METHOD DETERMINATION OF RISPERIDONE AND 9-HYDROXYRISPERIDONE USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR CHEMICAL TOXICOLOGICAL ANALYSIS

BULATOV R.M. Tel.: 8(342) 282-58-65, 89875799634, e-mail: gustavfarm@mail.ru

MALKOVA T.L. Tel.: 89222421907, e-mail: kaftox@mail.ru

The Perm state pharmaceutical academy (chair of toxicological chemistry),
614990, Perm, street Bolshevistskaya, 101;
614070, Perm, p.o. 2600

Atypical antipsychotic risperidone effectively controls the positive and negative symptoms of schizophrenia and a drug of first choice. In the body it is metabolized to 9-hydroxyrisperidone (paliperidone), which has a similar pharmacological action. Pharmaceutical company «Janssen-Silag» realized production of paliperidone in a specially designed capsule under the trade name «Invega». In foreign and domestic literature cases of acute poisoning by risperidone, including deaths, were described. At the chair of Toxicological Chemistry method of determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in biological fluids (urine) by high performance liquid chromatography using device «Shimadzu LC-20 Prominence» for the purposes of chemical toxicological analysis, therapeutic drug monitoring (TDM) of risperidone and paliperidone in processes of treatment have been developed.

Key words: schizophrenia, antipsychotic drugs (neuroleptics), chemical toxicological analysis, high performance liquid chromatography, therapeutic drug monitoring