



Г. С. Труш, І. Й. Галькевич

## Використання флеш-хроматографії для очистки рисперидону

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

**Ключові слова:** рисперидон,  
хроматографія, печінка.

У судово-хімічних дослідженнях якості результатів аналізу залежить від способу очищення біологічних проб, що є складними багатокомпонентними системами. З метою покращення результатів ізолювання рисперидону із біологічних тканин вивчили ефективність очистки кислих витяжок методом флеш-хроматографії. Встановили, що із тканини печінки водою, підкисленою оксалатною кислотою, осадження білкових компонентів амонію сульфатом та очищенні витяжок на колонках «GraceResolv™ Silica 5g/25ml», ізолюється до 78,4–83,4% рисперидону. Як елюент використали 0,5% розчин аміаку в етанолі. Це свідчить, що ці колонки ефективно можна використовувати у практичній роботі токсикологічних відділень бюро судово-медичної експертизи для очистки витяжок із біологічних тканин, концентрування рисперидону.

### Применение флеш-хроматографии для очистки рисперидона

Г. С. Труш, И. Й. Галькевич

В судебно-химических исследованиях качество результатов анализа зависит от способа очистки биологических проб, представляющих собой сложные многокомпонентные системы. С целью улучшения результатов изолирования рисперидона с биологических тканей изучена эффективность очистки кислых вытяжек методом флеш-хроматографии. Установлено, что из ткани печени водой, подкисленной оксалатной кислотой, осаждения белковых компонентов аммония сульфатом и очистке вытяжек на колонках «GraceResolv™ Silica 5g / 25ml», изолируется до 78,4–83,4% рисперидона. Как элюент использовано 0,5% раствор аммиака в этаноле. Это свидетельствует, что данные колонки можно эффективно использовать в практической работе токсикологических отделений бюро судебно-медицинской экспертизы для очистки вытяжек из биологических тканей и концентрирования рисперидона.

**Ключевые слова:** рисперидон, хроматография, печень.

*Актуальные вопросы фармацевтической и медицинской науки и практики. – 2015. – № 2 (18). – С. 32–35*

### Flash chromatography application for risperidone purification

G. S. Trush, I. Y. Halkevych

**Relevance.** Biological samples for forensic-chemical investigation are complicated multi-component systems.

**Aim** of our investigations is the study of robustness and validity of purification technique applying the flash chromatography for purification of acidic extracts from biological tissues.

**Methods and results.** It is established that 78.4 – 83.4 % of risperidone was isolated from liver tissues by water acidified with oxalic acid, than proteins precipitated by ammonia sulphate, and finally purified on GraceResolv™ Silica 5g/25ml cartridges. Eluent was 0.5% solution of ammonia in ethanol.

**Conclusion.** The data shows that tried columns can be effectively applied for extracts from biological tissues purification and risperidone concentrating in forensic-toxicological practice.

**Key words:** Risperidone, Chromatography, Liver.

*Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2015; № 2 (18): 32–35*

Фармацевтичні препарати, що належать до групи атипівних нейролептиків, за ефективністю значно переважають типові нейролептики. Під час їхнього застосування знижується ризик виникнення побічних екстрапірамідальних ефектів і пізньої дискінезії [1]. Одним із представників цієї групи препаратів є рисперидон, що характеризується високою антипсихотичною активністю і широко застосовується в психіатричній практиці для лікування шизофренії, деяких форм біполярних розладів, психотичних депресій та аутизму. Препарат є антагоністом моноамінів, характеризується високою спорідненістю до 5-HT<sub>2</sub>-серотонінових і D<sub>2</sub>-дофамінових рецепторів [2]. У хімічному відношенні рисперидон є 4-[2-[4-(6-фторбензо [d] ізооксазол -3 -іл) -1 -піперидил]

етил]-3 -метил -2,6 -діазобіцикло[4.4.0]дека-1,3-дієн-5-он і належить до класу похідних бензизоксазолу.

Препарат призначається в дозі від 0,5 до 8 мг/денно. При передозуванні (доза від 20 мг до 300 мг) спостерігаються побічні ефекти, серед них найнебезпечнішими для життя є кардіотоксична дія, що викликана подовженням інтервалу QT на ЕКГ, і злоякісний нейролептичний синдром [3,4].

У літературі описані випадки застосування рисперидону для посилення дії наркотичних засобів як галюциногену та засобу, що дурманить. Рисперидон часто вживають із метою суїциду, летальні випадки спостерігаються під час приймання цього препарату з циталопрамом, пароксетином, галоперидолом та іншими антипсихотичними засобами [5].

Наявність рисперидону в біологічних пробах при летальних отруєннях дає можливість встановити комплекс судово-хімічних досліджень. Дотепер розроблені методики виділення рисперидону з біологічних рідин (кров, слюна, сеча), які використовують в практиці фармакотерапевтичних та хіміко-токсикологічних досліджень гострих інтоксикацій [6,7]. Методи виділення цього препарату з об'єктів судово-хімічного дослідження (внутрішніх органів трупа), що описані в літературі, не показують сучасного стану практики хіміко-токсикологічного аналізу. В описаних методиках для очистки витяжок із трупних органів застосовують рідинну екстракцію та хроматографію в тонких шарах сорбенту. Але на стадіях такої комбінованої очистки та концентрування втрачаються значні кількості досліджуваної сполуки (ізолюється 24–44% рисперидону із модельних зразків біологічного матеріалу з препаратом) [8].

В останні роки в органічному синтезі та біотехнологічних процесах для розділення й очищення використовують метод флеш-хроматографії, що дає змогу отримувати чисті проби досліджуваних речовин і виконувати їхній аналіз високочутливими методами, зокрема ВЕРХ-МС, ГХ-МС тощо [9].

#### Мета роботи

Вивчення ефективності очистки кислих витяжок методом флеш-хроматографії при дослідженні біологічного матеріалу на вміст рисперидону.

#### Матеріали і методи дослідження

Для виготовлення розчинів використали стандартний зразок рисперидону (R-3030, Sigma, USA). Зі стандартного зразка готували розчин у 96% етанолі з концентрацією 1 мг/мл. Шляхом розведення цього розчину етанолом готували серію розчинів із вмістом 50; 100; 200; 500; 1000 мкг/мл препарату.

Ізолювання рисперидону здійснили з модельних зразків біологічного матеріалу. Для цього використовували печінку трупів людей, які загинули від травм і не містила лікарських препаратів. Біоматеріал отримали у відділенні судово-медичної токсикології Львівського обласного бюро судово-медичної експертизи. Біологічний матеріал зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Виділення рисперидону з модельних зразків біологічного матеріалу виконали водою, підкисленою оксалатною кислотою. Цей метод широко застосовується в роботі вітчизняних токсикологічних відділень бюро судово-медичної експертизи та у країнах СНД для ізолювання токсичних сполук із трупних органів [10]. Кислі витяжки очищували методом флеш-хроматографії на колонках «GraceResolv™ Silica 5g/25ml» (фірма Grace, Columbia, USA).

Ізолювання рисперидону з модельних зразків печінки. До 25 г подрібненої печінки вносили по 1 мл стандартних розчинів рисперидону із вмістом 50; 100; 200; 500; 1000 мкг/мл. Біологічні проби з препаратом перемішували та зберігали при  $5^{\circ}\text{C}$ . Через 24 год біологічний матеріал заливали водою до повного покриття твердих частинок,

підкислювали насиченим розчином оксалатної кислоти до рН 2–3 (за універсальним індикатором) і настоювали протягом 1 год при струшуванні. Витяжки зливали, а біологічний матеріал ще двічі настоювали з водою, підкисленою оксалатною кислотою, до 30 хв. Настоювання виконали при струшуванні. Витяжки з кожної порції біологічного матеріалу об'єднували та центрифугували (15 хв, 10000 об/хв). Для очистки проб методом флеш-хроматографії використовували об'єм витяжки, що відповідав 5 г біологічного матеріалу.

До відібраного об'єму витяжки вносили 0,8 г кристалічного амонію сульфату для осадження білкової фракції, перемішували та через 10 хв центрифугували (15 хв, 5000 об/хв). Центрифугат зливали, а осад двічі промивали насиченим розчином оксалатної кислоти (порціями по 3 мл). Промивні розчини центрифугували й об'єднували з витяжкою.

Проби пропускали через колонки GraceResolv™ Silica 5g/25ml. Колонки попередньо кондиціонували 4 мл 0,5% розчину аміаку в 96% етанолі. Після пропускання досліджуваних кислих витяжок через колонки їх промивали 20 мл універсальної буферної суміші Бріттона-Робінсона з рН 9,7. Для елюювання рисперидону з сорбенту використовували 0,5% розчин аміаку у 96% етанолі. Швидкість пропускання всіх розчинів через колонку – 2 мл/хв.

Перші 15 мл спиртового елюату відкидали. Збирали фракції з 16 по 23 мл. Спиртові елюати випаровували досуха, а сухі залишки розчиняли в 4 мл 96% етанолу.

Кількість рисперидону у пробах, що одержали, визначали методом УФ-спектрофотометрії СФ-56 ( $l=1\text{ см}$ ) при довжинах хвиль 235 нм ( $A_{1\text{ см}}^{1\%}=327$ ) та 278 нм ( $A_{1\text{ см}}^{1\%}=300$ ). Як розчин порівняння використовували контрольну пробу.

#### Результати та їх обговорення

Встановили, що 20 мл універсальної буферної суміші Бріттона-Робінсона (рН 9,7) із сорбенту колонок вилучаються всі домішки, що містяться у кислих витяжках. Розчини етанолу контрольних проб із біологічного матеріалу при довжині хвиль 235 нм та 278 нм мають значення оптичної густини 0,02–0,03. Відповідно досягнуто задовільного ступеня очистки витяжок.

При пропусканні водних розчинів рисперидону, підкислених оксалатною кислотою до рН 2–3, через колонки GraceResolv у цих же умовах аналізу елююється 97,5–98,2% сполуки, що досліджували. Додавання сульфату амонію в кількості 0,8 г у ці проби теж практично не впливало на кількісний вихід рисперидону з колонки (96,4–97,8%). Результати кількісного визначення рисперидону методом УФ-спектрофотометрії однакові при двох довжинах хвиль.

При внесенні рисперидону безпосередньо до підкисленої витяжки, об'єм якої відповідає 5 г печінки, вихід рисперидону становив 84,5%–88,9%.

Визначення вмісту рисперидону у пробах, що отримані при ізолюванні із модельних зразків печінки, наведені в таблиці 1.

Результати кількісного визначення рисперидону в пробах, (n=5 для кожного вмісту)

Вміст рисперидону (мкг) в 25 г печінки	Ізольовано рисперидону на колонках GraceResolv™ Silica 5g/25ml		Метрологічні характеристики методу*
	мкг	%	
50	39,3	78,5	$\bar{X}=80,86$ ; $S=2,01$ ; $S_x=0,90$ ; $\bar{X} \pm \Delta X=$ $80,86 \pm 2,50$ ; $\varepsilon = \pm 3,1\%$
100	79,4	79,4	
200	161,4	80,7	
500	411,5	82,3	
1000	834,0	83,4	

Примітка: \* – згідно з вимогами ДФУ, програми R Studio for Linux (version 3.2.0) та Open Office Calc (version 3).

Отже, результати свідчать: із витяжок, що одержані шляхом настоювання біологічного матеріалу водою, підкисленою оксалатною кислотою, осадження білкової фракції кристалічним амонію сульфатом та їхнє очищення на колонках для флеш-хроматографії типу GraceResolv™ Silica 5g/25ml, через 24 години із модельних зразків біологічного матеріалу ізолюється 78,5–83,4% рисперидону. Відносна похибка не перевищує 3,1%. Межа кількісного визначення рисперидону в печінці методом УФ-спектрофотометрії становить 2

мкг/г. Опрацьовані результати можна впроваджувати в роботу токсикологічних відділень бюро судово-медичної експертизи.

#### Висновки

Опрацьовали умови ізолювання рисперидону з тканини печінки.

Розробили умови очистки витяжки із застосуванням колонок для флеш-хроматографії GraceResolv™.

Встановили, що із модельних зразків біологічної проби ізолюється 78,5–83,4% рисперидону.

#### Список літератури

1. Дроговоз С.М. Возможні механізми токсичної дії антипсихотичних засобів / С.М. Дроговоз, А.В. Кононенко та ін. // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – №6. – С. 31.
2. Компендиум 2010 – лекарственные препараты / под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. – К. : Морион, 2010. – 1280 с.
3. Nazirizadeh Y. Serum concentrations of paliperidone versus risperidone and clinical effects / Y. Nazirizadeh, F. Vogel W. Bader // Eur J. Clin Pharmacol. – 2010. – Vol. 66. – P. 797–803.
4. Page C.B. Risperidone overdose causes extrapyramidal effects but not cardiac toxicity / C.B. Page, L.A. Calver, G.K. Isbister // J. Clin Psychopharmacol. – 2010. – Vol. 30. – №4. – P. 387–390.
5. Linnet K. Postmortem Femoral Blood Concentrations of Risperidone / K. Linnet, S.S. Johansen // J Anal Toxicol. – 2014. – Vol. 38. – №1. – P. 57–60.
6. 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. – Т. 17. – №5(3). – С. 751–753.
7. Ремезова И.П. Разработка методик анализа клоzapина, рисперидона, оланzapина, сертиндола, арипипразола в модельной смеси мочи / И.П. Ремезова // В мире научных открытий. – 2014. – №4.1(52). – С. 568–583.
8. Мансурова Р.Г. Изолирование рисперидона из биологического материала и его идентификация / Р.Г. Мансурова, Л.Д. Смирнова // Современные проблемы медико-криминалистических, судебно-химических и химико-токсикологических экспертных исследований : сб. материалов Всероссийской науч.-практ. конф. посвященной памяти профессора Ю.М. Кубицкого. – М., 2007. – С. 256–258.
9. Ayare P. Flash Chromatography: Area & Application / P. Ayare, V. Khanvilkar, N. Chalak // PharmaTutor. – 2014. – Vol. 2. – №5. – P. 89–103.
10. Правила проведення судово-медичних експертиз (досліджень) у відділеннях судово-медичної токсикології бюро судово-медичної експертизи від 17.01.1995 р. №6 / Міністерство охорони здоров'я України [Електронний ресурс]. – Режим доступу: [http://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z\\_0248-95](http://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z_0248-95).

#### References

1. Drogovoz, S. M., Lukyanchuk, V. D., Sheiman, B. S., & Kononenko, A. V. (2012). Mozhlyvi mekhanizmy toksichnoi dii antipsychotychnykh zasobiv [The possible mechanism of antipsychotics toxic effects]. *Pharmacologia ta likarska toksykologiya*, 6, 31 [in Ukrainian].
2. Kovalenko, V. N., & Viktorova, A. P. (Eds). (2010). *Compendium 2010 – lekarstvennyie preparaty [Medical substansis]*. Kyiv: Morion [in Ukrainian].
3. Nazirizadeh, Y., Vogel, F., & Bader, W. (2010). *Serum concentrations of paliperidone versus risperidone and clinical effects*. *Eur J. Clin Pharmacol*, 66, 797–803. doi: 10.1007/s00228-010-0812-7.
4. Page, C. B., Calver, L. A., & Isbister, G. K. (2010). *Risperidone overdose causes extrapyramidal effects but not cardiac toxicity*. *J. Clin Psychopharmacol*, 30(4), 387–390. doi: 10.1097/JCP.0b013e3181e5f7a5.
5. Linnet, K., & Johansen, S. S. (2014). *Postmortem Femoral Blood Concentrations of Risperidone*. *J Anal Toxicol*, 38(1), 57–60. doi: 10.1093/jat/bkt096.
6. Remezova, I. P., Lazaryan, D. S., & Maksimenko, T. I. (2012). *Xhimiko-toksikologicheskij analiz Risperidona i galoperidola v slyune [Risperidon's and haloperidol's chemical and toxicological analysis in the saliva]*. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo Centra Rossijskoj akademii nauk*, 5(3), 751–753 [in Russian].
7. Remezova, I. P. (2014). *Razrabotka metodik analiza klozapina, risperidona, olanzapina, sertindola, aripiprazola v modelnoj smesi mochi [Development of methods of analyses of the clozapine, risperidone, olanzapine, sertindole, aripiprazole and haloperidol in the model mixture of urine]*. *V mire nauchnykh otkrytij*, 4.1(52), 568–583 [in Russian].

8. Mansurova, R. G., & Smirnova, L. D. (2007). Izolirovanie risperidona iz biologicheskogo materiala i ego identifikaciya [Isolation and identification of risperidone in biological tissue]. *Sovremennyye problemy medico-kriminalisticheskikh, sudebno-khimicheskikh i khimiko-toksikologicheskikh ekspertnykh issledovaniy: Proceedings of the dedicated to the memory of prof. Kubitskogo Yu.M.* ( pp. 256–258). Moscow [in Russian].
9. Ayare, P., Khanvilkar, V., & Chalak, N. (2014). *Flash Chromatography: Area & Application. PharmaTutor*, 2(5), 89–103.
10. Pravyla provedennia sudovo-medychnykh ekspertyz (doslidzhen) u viddilenniakh sudovo-medychnoi toksykologii biuro sudovo-medychnoi ekspertyzy vid 17 sichnia 1995 roku №6 [Rules of forensic-medical investigation proceeding at forensic-medical toxicology departments of forensic-medical expertise bureaus from January 17 1995, №6]. Retrived from <http://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z 0248-95> [in Ukrainian].
- 

**Відомості про авторів:**

Труш Г. С., аспірант каф. токсикологічної та аналітичної хімії, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького. Галькевич І. Й., к. фарм. н., доцент, зав. каф. токсикологічної та аналітичної хімії, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, E-mail: [galkirin@meduniv.lviv.ua](mailto:galkirin@meduniv.lviv.ua).

**Сведения об авторах:**

Труш Г. С., аспирант каф. токсикологической и аналитической химии, Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого.

Галькевич И. И., к. фарм. н., доцент, зав. каф. токсикологической и аналитической химии, Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, E-mail: [galkirin@meduniv.lviv.ua](mailto:galkirin@meduniv.lviv.ua).

**Information about authors:**

Trush G. S., Postgraduate student of Toxicological & Analytical Chemistry Department, Danylo Halytsky Lviv National Medical University, E-mail: [galkirin@meduniv.lviv.ua](mailto:galkirin@meduniv.lviv.ua).

Halkevych I. Y., Ph.D., Associated professor, Head of Toxicological & Analytical Chemistry Department, Danylo Halytsky Lviv National Medical University.

---

Надійшла в редакцію 18.05.2015 р.