

УДК 615.214.2:573

Оптимизация методик пробоподготовки для идентификации и количественного определения клозапина в биологическом материале

Вергун О. М.^{1,2}, Лишай А. В.^{2,3}, Гриншпан Д. Д.⁴

¹ Учреждение здравоохранения

*«Городская клиническая больница скорой медицинской помощи»,
г. Минск, Республика Беларусь;*

*² Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь;*

*³ Белорусский государственный университет,
г. Минск, Республика Беларусь;*

*⁴ Учреждение БГУ «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Разработана методика обнаружения и количественного определения клозапина для химико-токсикологического исследования биологического материала человека методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием в режиме селективного ионного мониторинга (SIM), с использованием на этапе подготовки проб с жидкость-жидкостной и твердофазной экстракций, подбором оптимальных условий изолирования и очистки. Исследованы сорбционные свойства активированного угля марки ОУ-А, экспериментального мезопористого активированного угля, готовых патронов для твердофазной экстракции EVidEX-Vox C18 (США). В качестве биологического материала использовалась кровь и моча пациентов с отравлением клозапином. Предел обнаружения клозапина в исследуемом биологическом материале составил 0,07 мг/л; предел количественного определения — 0,01–3,5 мг/л. Максимальные внутрисерийные погрешности определения анализируемых веществ не превышали 12,9 %.

Ключевые слова: клозапин, острые отравления, биологические жидкости, пробоподготовка, сорбенты, газовая хроматография — масс-спектрометрия.

Введение. В настоящее время в современной медицине все чаще встречаются острые отравления химической этиологии [1]. К этому, вероятнее всего, приводит широкий ассортимент и увеличение доступности для населения лекарственных средств (ЛС), средств бытовой и сельскохозяйственной химии, различных органических растворителей и т. п. Стоит отметить, что проблема диагностики острых отравлений различными группами химических соединений, а также токсинами неизвестной природы представляет собой актуальную и зачастую труднорешаемую самостоятельную задачу. Это связано с тем, что не существует универсальных методов пробоподготовки для одномоментного выделения из биологического материала всех классов токсических веществ из-за их различных физико-химических свойств и даже использование высокотехнологического оборудования не всегда результативно [2]. Поэтому поиск эффективных, хорошо воспроизводимых методов в современной химико-токсикологической лабораторной диагностике очень важен. При этом стоит отметить, что одним из самых ключевых этапов является пробоподготовка.

Согласно данным медицинской статистики установлено, что динамика химических отравлений по г. Минску имеет волнообразный характер. Так, за последние 3–5 лет наблюдалось попеременное незначительное увеличение/снижение количества отравлений. Тем не менее, за последнее десятилетие общее количество отравлений находилось примерно на одном и том же уровне, за исключением резкого подъема в 2014–2015 гг. Такая же картина наблюдалась во всех странах Европы и России. Это вызвано популярностью в молодежной среде курительных смесей (синтетических

каннабимиметиков), совместно с которыми применялись различные психотропные средства. Отравления клозапином по отношению к отравлениям другими ЛС, влияющими на центральную нервную систему, встречаются достаточно часто (рисунок 1), что примерно составляет 2–5 % от всего количества отравлений психотропными средствами, за исключением отравлений этанолом и другими спиртами.

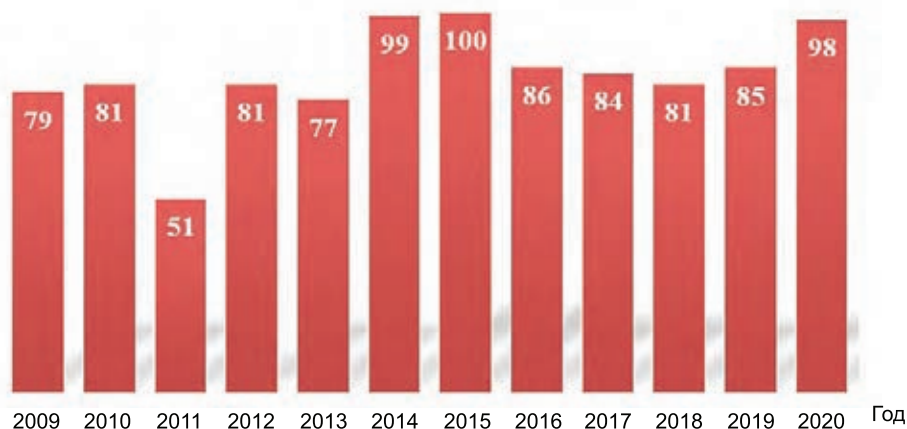


Рисунок 1 — Динамика отравлений клозапином (в абсолютных значениях) в г. Минске в 2009–2020 гг.

Клозапин представляет собой антипсихотическое ЛС (нейролептик) из группы производных дибензодиазепина, которое широко применяется в психиатрической практике для лечения различных расстройств. Клозапин действует как антагонист рецепторов дофамина и серотонина [3]. Он связывается с рецептором дофамина D4 с более высоким сродством, чем с рецептором дофамина D2, что способствует уменьшению экстрапирамидных симптомов [3]. Клозапин является частичным агонистом 5-HT_{1A}, способствующим уменьшению негативных симптомов, а также мускариновым антагонистом M1, M2, M3, M5, антагонистом α 1-адренорецепторов и гистамина. Клозапин метаболизируется до норклозапина (активный метаболит) и других метаболитов ферментами цитохрома P450 (CYP1A2, CYP3A4, CYP2C19 с некоторым влиянием на CYP2C9 и CYP2D6) [4]. Стоит отметить, что норклозапин активно воздействует на рецепторы M1 и M4. Клозапин имеет короткий период полувыведения из плазмы от 12 до 16 ч [5]. Пороговая концентрация клозапина в крови составляет $0,12 \pm 0,06$ мг/л, пороговая критическая — $1,01 \pm 0,7$ мг/л, а концентрации выше $3,5 \pm 1,0$ мг/л являются смертельными [5]. Клозапин при повышении терапевтических концентраций в крови становится кардиотоксичным, поэтому крайне важна своевременная идентификация и количественное определение клозапина в биологическом материале.

В практике химико-токсикологического анализа пробоподготовка является одним из самых трудоемких и длительных этапов, который значительно влияет на надежность и точность определения того или иного вещества. Количественное определение низких концентраций лекарств и их метаболитов является сложной задачей для химиков-аналитиков в области биомедицинского и фармацевтического анализа из-за мешающих эндогенных соединений и соэкстрактивных веществ, находящихся в анализируемой пробе. Для количественного анализа необходимо на первом этапе извлечение аналита из биологической матрицы, его очистка от различных примесей и соэкстрактивных веществ, концентрирование вещества, а на втором этапе — его количественная оценка, которая позволит своевременно провести лечебные мероприятия. Различные методы экстракции токсических веществ из биологического материала позволяют одновременно удалять эндогенные мешающие вещества и концентрировать определяемые вещества. Недостаточная надежность процедуры извлечения — распространенная проблема, приводящая к потере токсиканта, особенно если его концентрация крайне мала. В нашей работе мы провели сравнительную оценку различных методов пробоподготовки: твердофазная экстракция (ТФЭ) и жидкость-жидкостная экстракция. При этом было необходимо подобрать оптимальные условия проведения пробоподготовки, обеспечивающие максимальный процент извлечения токсического вещества из объекта, а также осуществить

его очистку и достаточное концентрирование, позволяющие получить максимальный аналитический сигнал.

Цель работы — оптимизация методики подготовки проб для качественного и количественного определения клозапина в биологических жидкостях (кровь, моча) методами газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) в режиме селективного ионного мониторинга и изучение сорбционных свойств активированных углей с различными модификационными добавками относительно клозапина.

Материалы и методы. *Объекты исследования.* Сорбенты: активированный уголь марки ОУ-А (ГОСТ 4453–74), экспериментальный мезопористый активированный уголь, полученный из гидролизного лигнина путем карбонизации и химической активации (АС). Изучаемые активированные угли были дополнительно модифицированы различным количеством сульфата ацетата целлюлозы в виде натриевой соли (Na-САЦ): 0,2; 0,4, 0,8, 0,12, 0,16 г полимера/г угля. А также патроны для твердофазной экстракции (ТФЭ) EVidEX-Vox 3 мл, 200 мг (Agilent, США).

Материалом исследования явились: стандартные и модельные растворы на крови клозапина с концентрациями 0,1; 0,3; 0,7; 1,4; 3,5 мг/л; биологические жидкости (кровь, моча) 53 пациентов с острыми отравлениями клозапином в возрасте от 20 до 40 лет; таблетки клозапина (см. таблицу 1) 25,0 мг (ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов», Республика Беларусь).

Методы и оборудование. В работе использовался газовый хроматограф с масс-селективным детектированием GC-MS Agilent 7890B (Agilent, США); колонка капиллярная 30 м × 0,25 мм, ΔF = 0,25 мкм (фаза HP-5MS UI); термостат колонок: 90 °С, 1,3 мин, 11 град/мин, 315 °С, 8,3 мин; газ-носитель — гелий, 1,5 мл/мин; инжектор — Splitless, 280 °С; температура Transfer Line — 300 °С. Условия детектирования: масс-селективный детектор — Agilent 5977A (Agilent, США), тип «квадруполь»; интервал сканируемых масс — 40–570 m/z; температуры детектора: MS Source — 230 °С, MS Quad — 150 °С, Gain — 1,0. При идентификации пиков веществ допускается временной интервал поиска ±2 %. Методы выделения клозапина — жидкость-жидкостная экстракция (органические растворители марки ч.д.а) и твердофазная экстракция (готовые сорбенты EVidEX-Vox C18, США). Для ускорения процесса прохождения исследуемого раствора через сорбент при ТФЭ использовалась вакуумная установка с насосом марки Visiprep (Supelco Sigma-Aldrich, Германия). полуавтоматические пипетки-дозаторы, позволяющие отбирать объемы жидкостей 4–40, 40–200 мкл и 0,2–1, 1–5 мл, центрифуга типа Heraeus Labofuge 200 (Thermo Electron corporation, США).

Результаты и их обсуждение. С целью количественного определения были построены калибровочные кривые содержания клозапина в биологическом материале, для чего создавали модельные растворы крови и мочи с заведомо известной концентрацией в них клозапина. Расчет количественного содержания производился методом абсолютной калибровки. Количественное определение осуществляли с использованием пакета программ G1701DA MSD ChemStation. Расчет концентрации клозапина проводили по формуле

$$C_x = \frac{Q \cdot 1000}{a \cdot 1000 \cdot 1000},$$

где C_x — концентрация клозапина в объекте, мг/л; Q — количество клозапина, полученное из калибровочного графика, мг/л; a — объем биоматериала, взятого на исследование, мл.

Полученные градуировочные графики были линейными в диапазоне концентраций 0,1–3,5 мг/л, при этом значения коэффициентов линейной аппроксимации составляли не менее 0,996. Предел обнаружения (LOD) клозапина составил 0,07 мг/л; предел количественного определения (LOQ) — 3,5 мг/л. Максимальные внутрисерийные погрешности ($n = 5$) определения анализируемых веществ не превышали 12,9 %. Идентификацию клозапина проводили, сравнивая величины m/z и относительные интенсивности молекулярных ионов, соответствующих анализируемому веществу, с библиотеками масс-спектров. При обнаружении пиков молекулярных ионов с достоверностью (MF) более 70 %, считали, что клозапин присутствует в исследуемой пробе.

При подготовке проб кровь с антикоагулянтом центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин для получения плазмы, которая в дальнейшем подвергалась исследованию. Образцы мочи при необходимости фильтровали через обеззоленный фильтр марки «Синяя лента» или подвергали центрифугированию.

Для сравнительного анализа изолирование клозапина из модельных смесей и образцов биологического материала проводилось с использованием метода жидкость-жидкостной экстракции со-

гласно следующему протоколу: внесение образца биологической жидкости (10 мл) в делительную воронку с последующим подщелачиванием 25%-м раствором аммиака до рН 9,0–10,0 (по универсальному индикатору), добавление 10 мл одного из представленных ниже экстрагентов: хлористый метилен — гептан — изопропиловый спирт (7 : 2 : 1); хлороформ — изопропиловый спирт (9 : 1). Далее смесь интенсивно встряхивали в течение 10 мин. Вследствие образования эмульсии органический слой из делительной воронки переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин, фильтровали в чашу для упаривания. Упаривание органических извлечений проводили досуха в токе теплого воздуха при температуре не более 50 °С. Сухой остаток реконструировали в 0,5 мл хлороформа и алиquotы полученного извлечения исследовали хроматографическими методами (для достижения концентрирования клозапина экстракцию проводили согласно описанной методике не менее двух раз для каждого объекта).

Твердофазную экстракцию клозапина проводили по следующему протоколу: перед началом работы проводили кондиционирование сорбента. Для этого через патрон последовательно пропускали по 2 мл 96%-го этанола и 2 мл дистиллированной воды. Процедуру проводили при пониженном давлении, позволяющем обеспечить скорость потока жидкости около 2,0 мл/мин. Затем осуществляли введение образца. Пробу биологической жидкости и стандартных водных растворов клозапина пропускали через патрон со скоростью потока 1,5–2,0 мл/мин. Далее через патрон последовательно пропускали 6 мл дистиллированной воды со скоростью потока около 2,0 мл/мин. После промывки патрон высушивали при пониженном давлении на протяжении 20 мин. На заключительном этапе проводили элюирование: через патрон пропускали 3 мл смеси дихлорметан — изопропанол — гидроксид аммония (25,0 мг/л) в соотношении 2 : 1 : 0,1, со скоростью 1,0 мл/мин. Органические растворители удаляли в токе холодного воздуха. Сухой остаток растворяли в 0,5 мл хлороформа и исследовали методом ГХ-МС.

Для получения более чистых извлечений и удаления мешающих веществ из биообъектов до этапа проведения экстракции в биологические образцы (кровь, моча) вносили по 1 г изучаемых сорбентов (углей) (таблица 1).

Таблица 1 — Интенсивность ионного тока клозапина при исследовании крови и мочи ГХ/МС

Сорбент		Жидкость-жидкостная экстракция, концентрация	Твердофазная экстракция, концентрация, мг/л	<i>p</i>
Без очистки, <i>n</i> = 53	Кровь	0,93 (0,19–1,50)	0,95 (0,17–1,53)	0,1659
	Моча	1,34 (0,92–1,86)	1,46 (0,87–1,88)	0,1981
Уголь марки АС, <i>n</i> = 53	Кровь	0,95 (0,12–1,36)	1,05 (0,13–1,50)	0,0474
	Моча	1,66 (0,60–1,77)	1,68 (0,83–1,78)	0,0989
Уголь марки ОУ-А, <i>n</i> = 53	Кровь	0,51 (0,63–1,37)	0,65 (0,12–1,40)	0,1386
	Моча	0,36 (0,18–1,64)	0,42 (0,13–1,78)	0,1472
Уголь марки АС-САЦ 16 г/г угля, <i>n</i> = 53	Кровь	0,45 (0,32–1,70)	0,45 (0,12–1,50)	0,2231
	Моча	1,20 (0,83–1,78),	1,26 (0,83–1,78)	0,1005

Примечание. Данные представлены как медиана и 50%-й интерквартильный размах между 25 и 75 процентилями, мг/л.

При оценке данных таблицы 1, статистически значимых различий между двумя видами экстракций ($p < 0,05$) не выявлено. Немногим эффективнее для изолирования клозапина из биологического материала для количественной оценки в ходе лекарственного мониторинга оказались готовые патроны для ТФЭ-EVIDEX-Vox, при отсутствии в лабораторной практике возможности проведения ТФЭ можно выполнить и жидкость-жидкостную экстракцию, эффективность которой доказана в ходе нашей работы. Что касается активированного угля, то лучшие результаты по очистке проб и как следствие сорбированию клозапина из биологических жидкостей показал активированный уголь марки АС (таблица 2). Объяснить данный факт можно тем, что АС является активированным углем, содержащим большое количество мезопор, которые в свою очередь способны очень хорошо сорбировать молекулы таких размеров, как клозапин. Также на степень связывания может оказывать влияние факт того, что ОУ-А является активированным углем с рН в диапазоне 9,0–10,0, а экспериментальный



активированный уголь содержит значительное количество кислотных групп и соответственно рН находится в диапазоне 3,0–4,0.

В результате проведенных исследований установлено, что при модификации активированных углей Na-САЦ наблюдается увеличение адсорбции клозапина с увеличением процента полимерной добавки. При этом стоит отметить, что оптимальное соотношение сорбции-десорбции характерно для 8%-й концентрации полимера. Статистическая обработка результатов эксперимента показала, что статистические различия процента сорбирования ОУ-А и АС при введении Na-САЦ снижаются с увеличением процента полимерного модификатора и статистически значимы для немодифицированных углей, а также в присутствии 0,02–0,12 г полимера/г. При добавлении к углям 0,16 г полимера/г различия в проценте сорбирования были статистически не значимы.

Таблица 2 — Сорбция и десорбция клозапина на ОУ-А и АС

Концентрация Na-САЦ, %	ОУ-А		АС	
	процент сорбирования	процент десорбции	процент сорбирования	процент десорбции
0	26,54 ± 0,47 ¹	18,25 ± 0,34	27,15 ± 0,53	29,90 ± 0,59
2	29,32 ± 0,64	18,52 ± 0,35	33,93 ± 0,67	30,55 ± 0,60
4	34,18 ± 0,66	24,65 ± 0,46	40,70 ± 0,80	31,20 ± 0,61
8	86,94 ± 1,67	24,04 ± 0,45	93,14 ± 1,83	32,50 ± 0,64
12	93,56 ± 1,93	22,68 ± 0,43	97,64 ± 1,92	31,13 ± 0,61
16	97,38 ± 1,84	24,62 ± 0,46	99,83 ± 1,96	33,07 ± 0,65

Примечание. $n = 5$; достоверность различий $p < 0,05$; статистическая обработка проводилась с применением U -критерия Манна – Уитни.

Заключение. Разработана методика обнаружения и количественного определения клозапина методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием в режиме селективный ионный мониторинг в материалах биологического происхождения. Предел обнаружения клозапина в биологическом материале составляет 0,07 мг/л; предел количественного определения — 3,5 мг/л. Максимальные внутрисерийные погрешности определения анализируемых веществ не превышают 12,9 %. Для получения более чистых извлечений из биологического материала подходит уголь марки АС, содержащий большое количество мезопор, способных сорбировать молекулы. Установлено, что использование активированного угля марки ОУ-А и экспериментального образца АС в качестве сорбента для очистки проб, полученных из биологических образцов возможно в случаях их модификации с помощью Na-САЦ. При экстракции клозапина из крови и мочи оптимальные сорбционно-десорбционные свойства активированного угля проявляются при введении 8 % Na-САЦ.

Литература

1. Вергун, О. М. Острые отравления лекарственными средствами: проблемы, причины, профилактика / О. М. Вергун, Н. Д. Яранцева, Л. Н. Боровикова // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: сб. реценз. науч. работ / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, Бел. гос. мед. ун-т; редкол.: А. В. Сикорский, О. К. Доронина. — 2017. — Вып. 7. — С. 213–219.
2. Лужников, Е. А. Острые отравления у взрослых и детей / Е. А. Лужников, Г. Н. Суходолова. — М.: Эксмо, 2009.
3. Stepnicki, P. Current Concepts and Treatments of Schizophrenia Molecules / P. Stepnicki, M. Kondej, A. A. Kaczor. — 2018. — № 8. — P. 2087–2116. Doi: 10.3390/molecules23082087.
4. Особенности острых отравлений клозапином / К. К. Ильяшенко [и др.] // Токсикологический вестник. — 2009. — № 2. — С. 2–5.
5. Шигеев, С. В. Отравления клозапином: теоретические аспекты и судебно-медицинская оценка / С. В. Шигеев, Н. А. Иванова, С. В. Иванов // Судебно-медицинская экспертиза. — 2013. — № 6.



Optimization of sample preparation methods for identification and quantitative determination of clozapine in biological material

Vearhun O. M.^{1,2}, Lishai N. V.^{2,3}, Hrynshpan D. D.⁴

¹Health Care Institution «City Clinical Hospital of Emergency care», Minsk, Republic of Belarus;

²Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;

³Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus;

⁴Research Institute for Physical Chemical Problems of Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

A technique for the detection and quantification of clozapine in biological material was developed using liquid-liquid and solid-phase extraction with gas chromatography and mass-selective detection. The properties of activated carbon sorbent, cartridges for solid-phase extraction EXtrelut® NT 3 and EvidEX-Box have been studied. Blood serum and urine of patients with a diagnosis of acute clozapine poisoning were used as biological material. The detection limit of clozapine was 0,07 mg/L; the limit of quantification is 0,1–3,5 mg/L. The maximum intra-series errors in determining the analytes do not exceed 12,9 %.

Keywords: clozapine, poisoning, biological fluids, sample preparation, gas chromatography–mass spectrometry.

Поступила 26.07.2021