

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© ЧМЕЛЕВСКАЯ Н.В., ИЛЛАРИОНОВА Е. А., АЛФЕРОВА Л.Н. — 2013
УДК 543.544.943.3.068.7:615.07

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В АНАЛИЗЕ КОМБИНИРОВАННЫХ СОЧЕТАНИЙ ЦИННАРИЗИНА И ПСИХОТРОПНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Наталья Владимировна Чмелевская¹, Елена Анатольевна Илларионова¹, Людмила Николаевна Алферова²

(¹Иркутский государственный медицинский университет, ректор — д.м.н., проф. И.В. Малов,

кафедра фармацевтической и токсикологической химии, зав. — д.х.н., проф. Е.А. Илларионова;

²Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы, начальник — к.м.н. А.П. Зайцев)

Резюме. Предложены оптимальные условия качественного анализа комбинированных сочетаний циннаризина и психотропных лекарственных средств с использованием метода микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Условия анализа: градиентное элюирование в системе перхлорат лития, хлорная кислота и вода — ацетонитрил (MeCN), градиент линейный 800 мкл от 25 до 40%; 700 мкл 40%; 1500 мкл от 40 до 70% ацетонитрила при скорости потока 150 мкл/мин и температуре 35°C.

Ключевые слова: циннаризин, амитриптилин, аминазин, азалефтин, галоперидол, трифтазин, неулептил метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, градиент, ацетонитрил, лития перхлорат.

HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY ANALYSIS OF THE COMBINED COMBINATION OF CINNARIZINE AND PSYCHOTROPIC DRUGS

N.V. Chmelevskaya¹, E.A. Illarionova¹, L.N. Alferova²

(¹Irkutsk State Medical University; ²Irkutsk Regional Bureau of forensic-medical examination)

Summary. The optimal conditions for qualitative analysis of the combined combination of cinnarizine and psychotropic drugs using the high-performance liquid chromatography have been proposed. Conditions of analysis: gradient elution system of lithium perchlorate, perchloric acid and water [4 M LiClO₄, 0.1 M HClO₄] — H₂O — acetonitrile (MeCN), the gradient line in 800 mcl of 25 to 40%, 700 mcl 40%, 1500 mcl of 40 to 70% acetonitrile at a flow rate of 150 ml / min and a temperature of 35°C.

Key words: Cinnarizine, amitriptyline, chlorpromazine, azaleptin, haloperidol triflazin, neuleptil, high-performance liquid chromatography method, gradient, acetonitrile, lithium perchlorate.

Циннаризин включен в «Перечень наименований токсичных веществ, наиболее часто встречающихся при острых отравлениях» — приказ Минздрава РФ от 29.12.2000 г. №460 «Об утверждении учетной документации токсикологического мониторинга». Благодаря ноотропной активности циннаризин широко используют в разных областях медицины, в том числе в психиатрической практике [4]. Он часто применяется в комплексной терапии с антипсихотическими нейролептиками и трициклическими антидепрессантами. Встречаются случаи отравления циннаризином в сочетании с психотропными лекарственными средствами амитриптилином, аминазином, азалефтином, галоперидолом, трифтазином, неулептилом. В литературе имеются сведения о химико-токсикологическом исследовании биологических объектов на наличие психотропных лекарственных веществ [5,6]. Однако в литературных источниках отсутствуют сведения по химико-токсикологическому исследованию циннаризина в сочетании с психотропными лекарственными веществами. Поэтому разработка методик химико-токсикологического анализа циннаризина в сочетании с психотропными лекарственными средствами амитриптилином, аминазином, азалефтином, галоперидолом, трифтазином, неулептилом является актуальной проблемой.

Объектом настоящего исследования являются трех- и четырехкомпонентные сочетания циннаризина и психотропных лекарственных средств.

Целью настоящей работы являлось разработка методики анализа комбинированных сочетаний циннаризина и психотропных лекарственных средств с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Материалы и методы

В работе использовали микроколоночный жидкостный хроматограф «Милихром А-02» (ЗАО «ЭкоНова»,

Новосибирск) с ультрафиолетовым спектрофотометрическим детектором, снабженным стальной колонкой (75x2 мм), заполненной сорбентом ProntoSIL-120-5-C18 AQ («Bischoff Analysentechnik und Gerate GmbH», Германия) с размером частиц 5 мкм. Эффективность колонки — 3500 т.т. Температура колонки 35°C. Также использовали центрифугу «Eppendorf» (Германия), рН метр «Анион 4100» (РФ), ультразвуковую баню RK 100 «Bandelin electronic» (Германия).

В качестве стандартных (контрольных) веществ были использованы фармацевтические субстанции циннаризина, амитриптилина, аминазина, азалефтина, галоперидола, трифтазина, неулептила, содержание основного вещества в которых не ниже 98%. Для приготовления элюентов и растворов образцов использовали: ацетонитрил «особой степени чистоты» (сорт 1) фирмы «Криохром» (Санкт-Петербург); перхлорат лития, хлорная кислота квалификации не ниже «х.ч». Метанол перегоняли перед использованием. Дистиллированную воду дополнительно очищали с помощью системы «Norganic, Millipore Corporation» (США).

При статистической обработке результатов анализа использовали методы Стьюдента и Фишера [3]. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез $p=0,05$.

Результаты и обсуждение

Метод ВЭЖХ достаточно широко применяется в фармацевтическом и химико-токсикологическом анализе для идентификации и количественного определения лекарственных и наркотических веществ [2,7,8].

Для ВЭЖХ анализа смесей циннаризина в сочетании с психотропными лекарственными веществами был выбран обращенно-фазный вариант хроматографии. Оптимальными условиями хроматографирования исследуемых смесей являются: обращенная фаза ProntoSIL

Таблица 1

Длины волн максимального и минимального поглощения определяемых соединений. Растворитель: MeCN — 0,2 М LiClO₄ (pH 2,8)

Определяемое соединение	$\lambda_{\max}$, нм	$\lambda_{\min}$, нм	$\lambda_{\text{дет}}$, нм
Азалептин	202, 242, 290 (плечо)	228	210, 230, 260, 280
Аминазин	200 (плечо), 256, 308	226, 280	210, 230, 260, 280
Амитриптилин	206, 240	200, 230	210, 230, 260, 280
Галоперидол	194, 220 (плечо), 246	232	210, 230, 260, 280
Неулептил	200 (плечо), 232, 270	216, 248	210, 230, 260, 280
Трифтазин	258, 308	224, 282	210, 230, 260, 280
Циннаризин	194 (плечо), 230, 252	222, 236	210, 230, 260, 280

120-5C18AQ («Bischoff», Германия), градиентное элюирование в системе: Элюент А: 0,2 М лития перхлорат — хлорная кислота (pH 2,8); Элюент Б — ацетонитрил. При разделении стандартных смесей, содержащих циннаризин, применяли градиентное элюирование: 800 мкл от 25 до 40% Б; 700 мкл 40% Б; 1500 мкл от 40 до 70% Б. Эти элюенты обладают высокой прозрачностью в коротковолновой области ультрафиолетового (УФ) спектра и не содержат УФ-поглощающие примеси, проявляющиеся в виде «лишних» пиков на хроматограмме. Известно, что присутствие в подвижной фазе кислоты (pH 2,8) и высокое содержание ионов лития улучшает хроматографирование азотсодержащих лекарственных веществ [1]. Таким образом, предложенная хроматографическая система является оптимальной для разделения циннаризина и психотропных лекарственных средств.

Пики циннаризина, амитриптилина, аминазина, азалептина, галоперидола, трифтазина, неулептила в выбранном элюенте симметричны. Величина коэффициентов асимметрии пиков, близка к единице, что свидетельствует об отсутствии значимых ионообменных взаимодействий.

Для записи УФ-спектров готовили стандартные растворы определяемых соединений с концентрацией 0,2 мг/мл. В качестве растворителя для приготовления стандартных растворов использовали метанол. Спектры регистрировали во время хроматографического анализа после остановки потока вблизи максимума пика (интервал для волн 190-360 нм, шаг 2 нм). Для удобства использовали нормирование УФ-спектров, так как нормированный УФ-спектр не зависит от концентрации соединения.

Длины волн максимального и минимального поглощения всех исследуемых соединений приведены в табл. 1.

Дополнительные длины волн используются для расчета спектральных отношений, применение которых для идентификации пиков существенно повышает надежность определения. Спектральные отношения для определяемых соединений, рассчитанные как отношение площадей пиков, зарегистрированных при длинах волн λ_x и λ_{210} , приведены в табл. 2.

Таблица 2

Спектральные отношения для определяемых соединений. Растворитель: MeCN- 0,2 М LiClO₄, pH 2,8

Определяемое соединение	Спектральное отношение, $R=S_x/S_{210}$		
	230	260	280
Азалептин	0,751	0,674	0,368
Аминазин	0,533	1,128	0,067
Амитриптилин	0,331	0,099	0,016
Галоперидол	0,456	0,332	0,045
Неулептил	1,113	1,124	0,719
Трифтазин	0,591	1,542	0,088
Циннаризин	0,416	0,457	0,051

Проведена валидационная оценка разработанной методики. Результаты хроматографирования считаются правильными, если соблюдаются условия пригодности хроматографической системы. Для проверки пригод-

ности хроматографической системы была проведена апробация выбранных условий хроматографического анализа модельных смесей циннаризина и психотропных лекарственных веществ.

На рисунке 1 приведена хроматограмма на примере раствора модельной смеси циннаризина, азалептина, аминазина, амитриптилина.

Найденные условия использованы для разработки методики анализа комбинированных сочетаний циннаризина и психотропных лекарственных средств в извлечениях из мочи.

Методика качественного определения комбинированных сочетаний циннаризина и психотропных лекарственных веществ методом ВЭЖХ: в колбу вместимостью 100 мл вносят 50 мл мочи, содержащей смесь исследуемых веществ, настаивают в течение 2 часов при комнатной температуре, периодическом перемешивании и обработке на ультразвуковой бане RK 100 «Bandelin electronic» (Германия). Полученный раствор переносят в делительную воронку, добавляют 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты до pH=4,0, 20 мл хлороформа и затем проводят экстракцию двукратно в течение 20 минут. Хлороформные извлечения переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и хлороформом доводят объем раствора до метки. Исследуемый раствор вводят в колонку в объеме 2 мкл. Хроматографируют анализируемый раствор в следующих условиях: градиентное элюирование в системе: Элюент А: 0,2 М лития перхлорат — хлорная кислота (pH 2,8); Элюент Б — ацетонитрил. При разделении стандартных смесей, содержащих циннаризин, применяли градиентное элюирование: 800 мкл от 25 до 40% Б; 700 мкл 40% Б; 1500 мкл от 40 до 70% Б. Температура колонки в процессе разделения 35°C. Скорость потока элюента при всех режимах была 150 мкл/мин.

В табл. 3 указаны времена удерживания исследуемых соединений после извлечения их из мочи в предложенных условиях разделения.

Таблица 3

Времена удерживания разделяемых соединений после извлечения их из мочи

Лекарственное вещество	Время удерживания, мин	Метрологические характеристики
Азалептин	6,39; 6,41; 6,40; 6,38; 6,39; 6,41	$\bar{O} = 6,40$; $S_{\bar{O}} = 0,005$; $DX = 0,013$; $E = 0,20\%$
Аминазин	15,67; 15,66; 15,65; 15,66; 15,67; 15,68	$\bar{O} = 15,67$; $S_{\bar{O}} = 0,0045$; $DX = 0,012$; $E = 0,07\%$
Амитриптилин	14,35; 14,36; 14,34; 14,35; 14,36; 14,35	$\bar{O} = 14,35$; $S_{\bar{O}} = 0,003$; $DX = 0,008$; $E = 0,05\%$
Галоперидол	11,22; 11,23; 11,22; 11,23; 11,22; 11,23	$\bar{O} = 11,23$; $S_{\bar{O}} = 0,0032$; $DX = 0,008$; $E = 0,07\%$
Неулептил	10,42; 10,43; 10,44; 10,42; 10,43; 10,42	$\bar{O} = 10,43$; $S_{\bar{O}} = 0,020$; $DX = 0,051$; $E = 0,48\%$
Трифтазин	15,41; 15,42; 15,41; 15,41; 15,42; 15,43	$\bar{O} = 15,42$; $S_{\bar{O}} = 0,0036$; $DX = 0,094$; $E = 0,06\%$
Циннаризин	18,35; 18,35; 18,36; 18,35; 18,34; 18,35	$\bar{O} = 18,35$; $S_{\bar{O}} = 0,0026$; $DX = 0,007$; $E = 0,04\%$

На рисунке 2 приведена хроматограмма кислых извлечений из мочи азалептина, неулептила, галоперидола, амитриптилина, трифтазина, аминазина и циннаризина.

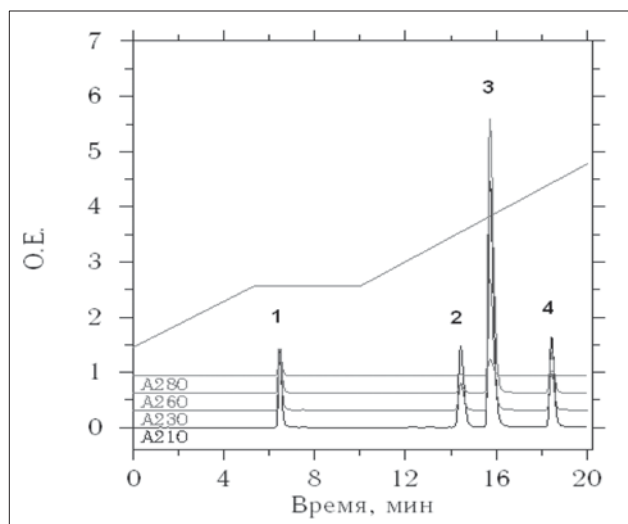


Рис. 1. Хроматограмма стандартного раствора смеси — азадептин (0,25 мг/мл), 2 — аминазин (1,25 мг/мл), 3 — амитриптилин (0,25 мг/мл), 4 — циннаризин (0,63 мг/мл) в метаноле.

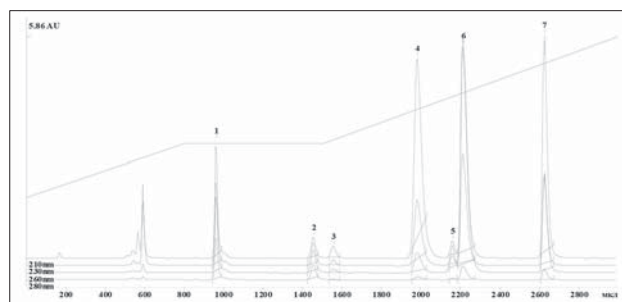


Рис. 2. Хроматограмма кислых извлечений из мочи: 1-азадептин, 2-неулептил, 3-галопреридол, 4-амитриптилин, 5-трифтазин, 6-аминазин, 7- циннаризин.

На основании вышеописанных исследований, можно сделать вывод, что разработанная методика позволяет обнаруживать циннаризин в моче как индивидуально, так и при совместном применении с психотропными лекарственными веществами. Соэкстрактивные компоненты мочи не мешают определению.

Таким образом, разработанная унифицированная методика позволяет использовать метод ВЭЖХ для идентификации циннаризина и психотропных лекарственных веществ в комбинированных сочетаниях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барам Г.И., Грачев С.А. Использование перхлората лития при выделении и анализе олиго- и полинуклеотидов. // Биоорганическая химия. — 1985. — Т. 11. №10. — С. 1420-1422.
2. Булатов Р.М., Малкова Т.Л. Разработка методики обнаружения рисперидона, галопреридола 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. — Пермь, 2009. — С. 65-67.
3. Государственная Фармакопея СССР: Вып. 1. Общие методы анализа. — 11-е изд., доп. — М.: Медицина, 1987. — 336 с.
4. Машиковский М.Д. Лекарственные средства. — 15 изд., перераб., испр. и доп. — М.: Новая Волна, 2005. — 1200 с.
5. Саломатин Е.М., Николаева Э.Г. Судебно-химический анализ трупного материала на наличие лекарственных и наркотических соединений // Судебно-медицинская экспертиза. — 1999. — № 3. — С. 21-22.
6. Томилин В.В., Саломатин Е.М. Современное состояние и перспективы развития химико-токсикологических (судебно-химических) исследований в Российской Федерации // Судебно-медицинская экспертиза. — 2001. — №3. — С. 28-33.
7. Cutroneo P., Santoro M.I. R.M., Kassab N.M., at al. Optimization of the separation of some psychotropic drugs and their respective metabolites by liquid chromatography // J. pharmaceutical and biomedical analysis. — 2006. — Vol. 41, No. 2. — P. 333-340.
8. Esrafil A., Yamini Y., Shariati S. Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids // Anal. Chim. Acta. — 2007. — Vol. 604, No. 2. — P. 127-133.

Информация об авторах: Чмелевская Наталья Владимировна — аспирант кафедры; Илларионова Елена Анатольевна — заведующий кафедрой, профессор, д.х.н., 664003, Иркутск, ул. Красного Восстания, 1, ИГМУ, кафедра фармацевтической и токсикологической химии, тел. (3952) 243447, e-mail: illelena@rambler.ru; Алферова Людмила Николаевна — судебно-химический эксперт.

© ЯКОВЛЕВ В.М., ХАЙТ Г.Я., ФЕТИСОВА Е.С. — 2013
УДК 616.12-008.313.127-073.97

ВИЗУАЛЬНО-ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ЖЕЛУДОЧКОВОЙ ЭКСТРАСИСТОЛИИ НА ВОЗНИКНОВЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ БЛОКАД В СИСТЕМЕ ГИССА-ПУРКИНЬЕ ПРИ ПОСТИНФАРКТНОМ КАРДИОСКЛЕРОЗЕ

Виктор Максимович Яковлев¹, Геннадий Яковлевич Хайт², Елена Сергеевна Фетисова²

⁽¹⁾Ставропольский государственный медицинский университет, ректор — д.м.н., проф. В.Н. Муравьева;

⁽²⁾Ставропольский краевой клинический консультативно-диагностический центр, гл. врач — д.м.н., проф. Г.Я. Хайт)

Резюме. Аритмии при постинфарктном кардиосклерозе являются одной из ведущих причин развития внезапной сердечной смерти, и формирования механизмов развития фибрилляции желудочков и аритмической смерти. Однако, дополнительные изменения, вызванные желудочковой экстрасистолью, формирующие электромеханическое ремоделирование электродинамического процесса биоэлектрического поля сердца остаются не изученными. Используя электрокардиографическую систему (ЭКГ-12 отведений, ортогональных ЭКГ и ВКГ по МакФи — Парунгао и векторного сканирования сердца), разработана модель методологии дифференцированной визуально-биофизической топической диагностики желудочковой экстрасистольи, электромеханической диссинхронии и дисфункции миокарда при постинфарктном кардиосклерозе.

Ключевые слова: желудочковая экстрасистольи, компьютерная ЭКГ система, топическая диагностика.