

sanogenesis. The method combines the advantages of elastic bandages and manual lymphatic drainage massage. It maintains the functional viability and compensatory remodeling of microvasculature. The technique by Tarshinov significantly minimized the risk of side effects and complications. When using intensive modes of compression limb volume decreased at an average by 96% of I stage lymphedema, while the II degree - by 75-85%, with the III degree - by 10-12%. By the mild mode swelling decreased on average by 65-70% when I stage of lymphedema, while the II stage - by 30-35%.

**Conclusions.** Volumetric pneumopressing by Tarshinov is the most acceptable modification of intermittent pneumatic compression when working with patients who suffer from limb lymphedema of different etiology.

**Key words:** lymphedema, volumetric pneumopressing.

**Відомості про авторів:**

**Таршинова Людмила Олександрівна** - Генеральний директор Інституту технологій оздоровлення «Нове у медицині». Адреса: Київ, Бехтерівський пров., 14, тел.: (044) 484-45-10.

**Єльчиць Тетяна Володимирівна** - к. мед. н., с. н. сп., науковий консультант Інституту технологій оздоровлення «Нове у медицині». Адреса: Київ, Бехтерівський пров., 14, тел.: (044) 486-55-03.

**Зайцев Дмитро Валерійович** - головний лікар медичного центру Інституту технологій оздоровлення «Нове у медицині», тел.: (044) 486-55-03.

УДК 615.214.099.074

© Г.С. ТРУШ, І.Й. ГАЛЬКЕВИЧ, 2015

*Г.С. Труш, І.Й. Галькевич*

## ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ІЗОЛЮВАННЯ ОЛАНЗАПІНУ З КРОВІ

Львівський національний медичний університет імені Д. Галицького

**Вступ.** Оланзапін використовується в психіатричній практиці для лікування шизофренії та інших психічних розладів. Передозування цього препарату часто супроводжується проявами токсичних ефектів, іноді летальних.

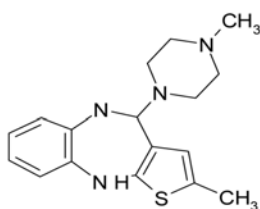
**Мета.** Оцінка ефективності методик ізолювання оланзапін у крові з використанням екстракційної очистки та методу флеш-хроматографії, які можна застосовувати в практиці судово-хімічного аналізу.

**Матеріали та методи.** Екстракцію оланзапін у крові проводили хлороформом при рН 10-11, а білкову фракцію осаджували 20% розчином сульфосаліцилової кислоти. Флеш-хроматографічну очистку проводили на колонках GraceResolv Silica 5g/25ml, як елюент використано 0,5% розчин аміаку в етанолі. Ідентифікацію та кількісне визначення оланзапін у досліджуваних пробах проводили методом ГХ-МС на капілярній колонці HP-1 Methyl Siloxane.

**Результати.** Встановлено, що при застосуванні рідинної екстракції із крові ізолюється до 66% оланзапін, а застосування флеш-хроматографії дозволяє ізолювати до 83% цієї сполуки. Обидві методики очистки дозволяють визначити мінімальну токсичну дозу оланзапін у крові, яка становить 0,1 мкг/мл.

**Ключові слова:** оланзапін, флеш-хроматографія, ГХ-МС, кров.

**Вступ.** Оланзапін препарат групи бензодіазепін, що за хімічною структурою являє собою 2-диметил-4-(4-метил-1-піперазиніл)-10Н-тієно [2, 3-б] [1, 5] бензодіазепін (рис. 1). Відноситься до класу нейролептиків з антипсихотичною дією, ефективний при лікуванні шизофренії. Теж застосовують його для фармакотерапії маніакальних станів, що



виникають на фоні біполярних розладів, гострих і хронічних психозів з позитивною та негативною симптоматикою [1].

Рис. 1. Структурна формула оланзапіну

Оланзапін є антагоністом серотонінових, дофамінових, мускаринових, гістамінових і адренергічних рецепторів. Має вищий рівень зв'язування з рецепторами серотоніну 5HT<sub>2</sub>, ніж з рецепторами дофаміну D<sub>2</sub> [6, 7]. Передозування оланзапіну супроводжується сонливістю, седативним ефектом, блюотою, тахікардією і гіпотензією [8]. Частими при передозуванні є коматозні стани, синдром подовження інтервалу QT та зловиясний нейролептичний синдром. Описані смертельні випадки отруєнь даним препаратом [2, 4, 5]. В літературних джерелах описані методики визначення оланзапіну в плазмі, сечі, спинномозковій рідині методом високоефективної рідинної хроматографії з УФ- та мас-спектроскопічним детектуванням, які пропонують використовувати для його визначення при проведенні клінічних досліджень [3, 7]. При цьому метод визначення цього препарату в біологічних рідинах значно відрізняється.

**Мета.** Оцінити ефективність результатів ізолювання оланзапіну з крові із використанням для очистки та концентрування рідинної екстракції та флеш-хроматографії, які можна використовувати у практичній роботі токсикологічних відділень бюро судово-медичної експертизи.

**Матеріали та методи.** Для побудови градувального графіку кількісного визначення оланзапіну методом газової хроматографії використовували стандартний зразок оланзапіну (Sigma, USA). Готували серію метанольних розчинів препарату із вмістом 0,1; 0,5; 1,0; 5; 10 мкг/мл. Метанол відповідав кваліфікації HPLC (Merck). Для опрацювання оптимальних умов ізолювання оланзапіну готували модельні суміші препарату з кров'ю, яку отримували у Львівській обласній станції переливання крові і зберігали при 2-4°C. Для екстракції оланзапіну із крові застосовували хлороформ кваліфікації х.ч. Очистку біологічних проб також проводили методом флеш-хроматографії на колонках «GraceResolv™ Silica 5g/25ml» (Grace, США). Реагенти, які використовували для виготовлення буферної суміші та елюювання відповідали кваліфікації х.ч. Ідентифікацію та кількісне визначення оланзапіну у досліджуваних пробах проводили методом газової хроматографії (хроматограф Agilent 6890 N, оснащений мас-селективним детектором серії 5978 B). Розділення проводили на капілярній колонці HP-1 Methyl Siloxane довжиною 30 м, внутрішнім діаметром 0,25 мм та товщиною плівки нерухомої фази 0,25 мкм. Початкова температура колонки становила 75oC (2 хв.), після чого із швидкістю 15oC/хв. підвищували температуру до 310oC та витримували кінцеву температуру протягом 13 хв. Аналіз проводили у режимі позитивної іонізації при вольтажі 70 В, а сканування проводилося в режимі від 40-400 атомних одиниць маси (m/z). Газ-носії гелій (1,5 мл/хв.), об'єм введеної проби 1 мкл.

Для приготування модельних сумішей проб крові з препаратом використовували оланзапін, який виділяли із таблеток «Zirgexa» 10 мг (Eli

Lilly). Для цього із 2 таблеток знімали оболонку, після чого розтирали в ступці і розчиняли в метанолі. Суспензію фільтрували, метанол випаровували. Сухий залишок очищали повторно перекристалізацією із гарячого метанольного розчину. Після випаровування метанолу, залишок висушували при 60оС. З очищеного оланзапіну готували етанольні розчини із вмістом 1 мг/мл препарату. Методом ГХ-МС визначали кількість оланзапіну в цьому розчині. Шляхом розведення етанолом, отримували розчин оланзапіну із вмістом 50 мкг/мл. *Підготовка модельних проб крові.* Готували по 3 паралельні серії модельних зразків крові із оланзапіном. Для цього до 5 мл крові вносили необхідний об'єм етанольного розчину оланзапіну (50 мкг/мл) та доводили фосфатним буферним розчином (рН 7,4) до 10 мл. Проби гомогенізували при струшуванні протягом 2 хв, після чого по 5 мл використовували для досліджень, з використанням двох методів очистки.

*Екстракційна очистка.* До 5 мл досліджуваного гомогенізату вносили 0,8мл 20% розчину сульфосаліцилової кислоти, суміш перемішували і через 5хв. центрифугували (10000 об/хв, 15 хв.). Центрифугат зливали, а осад обробляли 1 мл 20% розчину оксалатної кислоти протягом 5 хв. і пробу повторно центрифугували. Центрифугати об'єднували та доводили 20% розчином натрію гідроксиду до рН 10-11 (за універсальним індикатором). Тричі екстрагували оланзапін хлороформом (порціями по 7 мл). Хлороформові витяжки об'єднували, випаровували розчинник досуха при 40оС. Сухі залишки промивали 2мл дистильованої води. Водні розчини зливали, а залишок повторно висушували і кількісно розчиняли в 0,5мл метанолу. Метанольні розчини аналізували методом ГХ-МС.

*Очистка методом флеш-хроматографії.* До 5мл гомогенізату крові вносили 0,2 мл 20% розчину оксалатної кислоти та 70мг кристалічного амонію сульфату. Проби перемішували і через 5 хв. центрифугували (10000 об/хв, 15хв.). Центрифугат зливали, а осад двічі настоювали з 20% розчином оксалатної кислоти порціями по 1мл (по 5хв.). Проби повторно центрифугували. Об'єднані центрифугати пропускали через колонки GraceResolv, які попередньо кондиціонували 4 мл 0,5% розчину аміаку в 96% етанолі. Після внесення проби колонку промивали 20мл універсальної буферної суміші Бріттона-Робінсона з рН 9,7. Елюювали оланзапін 0,5% розчином аміаку в 96% етанолі. Оланзапін елюється із колонки, починаючи із 18мл по 25мл етанольної фракції. Швидкість пропускання розчинів через колонку 2мл/хв. Етанольні розчини випаровували досуха і сухі залишки розчиняли в 0,5мл метанолу. Метанольні розчини аналізували методом ГХ-МС. Результати виділення оланзапіну із крові двома методами наведено в таблиці.

**Результати та їх обговорення.** Встановлено, що ступінь одноразової екстракції оланзапіну хлороформом із водних розчинів при рН 10-11 становить 97-98%. Із колонки «GraceResolv™ Silica 5g/25ml» при дослідженні водних розчинів ізолюється 99,3-99,8% оланзапіну. Ідентифікацію оланзапіну в пробах методом ГХ проводили за часом утримування (7,579 0,02хв.) та за мас-спектром. Для мас-спектру чистого оланзапіну, характерним є 10 найбільших сигналів при 242, 229, 213, 312, 198, 254, 99, 169, 180 та 71 m/z (рис. 2а). Такі самі сигнали були і на мас-спектрах оланзапіну, ізольованого із крові. Проте у пробах, отриманих при екстракції оланзапіну хлороформом спостерігаються ще інтенсивні сигнали при 207 та 355 m/z, зумовлені

наявністю домішок (рис. 2b). Мас-спектри оланзапіну, очищеного методом флеш-хроматографії ідентичні стандарту (рис. 2с.).

Таблиця

Результати виділення оланзапіну з крові

Внесено оланзапіну (мкг) до 5 мл крові	Виділено оланзапіну методом рідинної екстракції		Виділено оланзапіну методом флеш-хроматографії	
	мкг	%	мкг	%
1	0,59	59,9	0,75	74,9
2	1,21	60,8	1,53	76,6
3	1,92	64,2	2,4	79,9,4
5	3,25	64,9	4,08	81,6
10	6,6	65,9	8,28	82,8
Метрологічні характеристики	$\bar{X}=63,14; S=2,63; S_x=1,18; \Delta X = \pm 3,28; \varepsilon = \pm 5,19 \%$		$\bar{X}=79,16; S=3,33; S_x=1,49; \Delta X = \pm 4,14; \varepsilon = \pm 5,24 \%$	

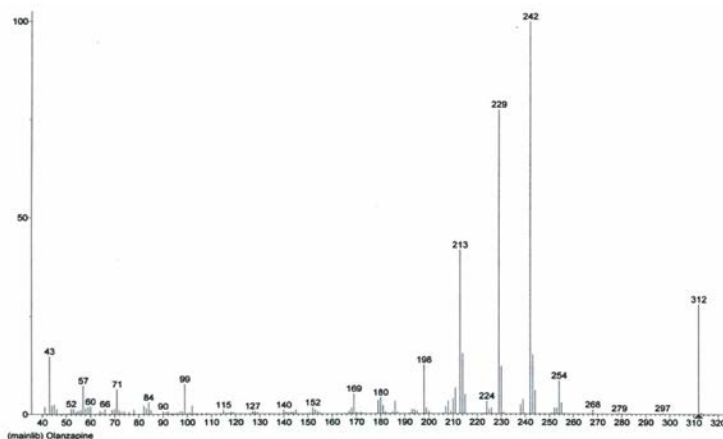


Рис. 2а.

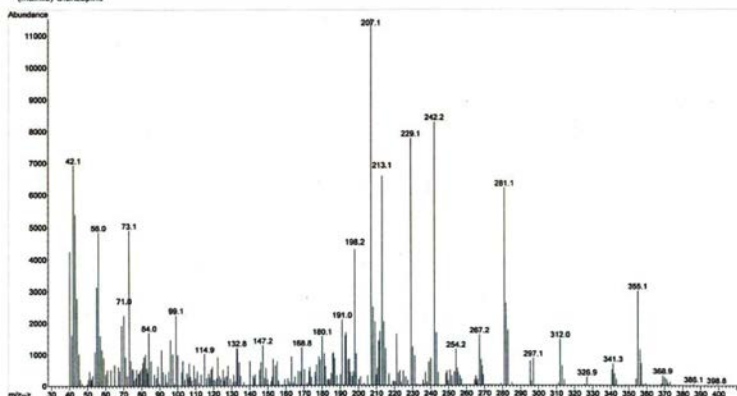


Рис. 2б.

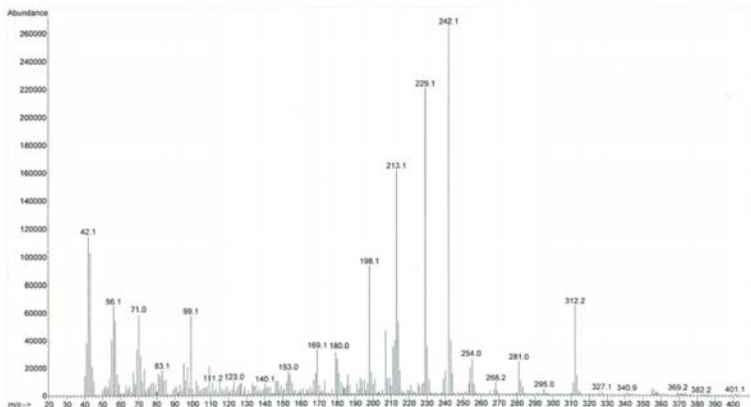


Рис. 2 с.

**Рис. 2. Мас-спектри оланзапіну: а) стандартного зразку; б) ізольованого із крові екстракцією хлороформом; с) ізольованого з крові методом флеш-хроматографії**

Межа виявлення оланзапіну в метанольних розчинах (співвідношення сигнал-шум (3:1)) становить 0,02мкг/мл, а межа кількісного визначення – 0,05мкг/мл (співвідношення сигнал-шум (5:1)). Градувальний графік в межах концентрації оланзапіну 0,1 – 10 мкг/мл характеризується залежністю:

$$Y=6,2 \cdot 10^3 \cdot X+2,09 \cdot 10^2 \quad (r \ 0,99987)$$

де Y– площа піку; X – вміст оланзапіну в мкг/мл. Межа кількісного визначення оланзапіну в 1мл крові становить 0,044мкг (при застосуванні екстракції) та 0,03мкг (при застосуванні флеш-хроматографії). Обидві методи очищення дозволяють визначити мінімальну токсичну дозу оланзапіну в крові, яка становить 0,1мкг/мл. Встановлено, що при екстракційній очистці проб крові хлороформом ізолюється 59,9 – 65,9% оланзапіну, при застосуванні флеш-хроматографії ізолюється 74,9 – 82,8% оланзапіну.

**Висновки.** Порівняно ефективність ізолювання оланзапіну з модельних зразків крові із використанням для очищення та концентрування рідинної екстракції і флеш-хроматографії. Розроблені умови кількісного визначення оланзапіну методом ГХ-МС на колонці HP-1 Methyl Siloxane. Градувальний графік побудований в межах концентрацій оланзапіну від 0,1 до 10мкг/мл.

#### Література

1. Данилов Д.С. Лечение шизофрении / Д.С. Данилов, Ю.Г. Тюльпин. - М.: Медицинское информационное агентств, 2010. – 276 с.
2. Можливі механізми токсичної дії антипсихотичних засобів / С.М. Дрогозов [та ін.] // Фармакологія та лікарська токсикологія.-2012. - №6. - С.31.
3. Bonde S. L. Simultaneous determination of Olanzapine and Fluoxetine in human plasma by LC-MS/MS: its pharmacokinetic application / S.L. Bonde, R.P. Bhadane, A. Gaikwad, S.R. Gavali, D.U. Katala, A.S. Narendiran // J Pharm Biomed Anal. – 2014. – Vol. 22.
4. Ciszowski K. Laboratory investigations in acute olanzapine poisonings / K. Ciszowski, J. Sein Anand, J. Wilimowska [et all.] // Przegl Lek. – 2011. – Vol. 68 (8). – P. 417-21.

5. Deepakumari H.N. Sensitive Spectrophotometric Method for the Determination of Olanzapine and Orphenadrine in Pure and Dosage Forms by Ternary Complex Formation with Eosin and Lead (II) / H.N. Deepakumari, H.D. Revanasiddappa // Chemical Sciences Journal. – 2012. – Vol. 70. – P.1-8.

6. Gao M. [11C] olanzapine, radiosynthesis and lipophilicity of a new potential PET 5-HT<sub>2</sub> and D<sub>2</sub> receptor radioligand / M. Gao, Z. Shi, M. Wang, Q.H. Zheng // Bioorg Med. Chem. Lett. – 2013. – Vol. 23(7). – P. 1953-1956.

7. Johnson. M. Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the dopamine D<sub>2</sub> receptor occupancy of olanzapine in rats / M. Johnson, M. Kozielska, V. Pilla Reddy [et al.] // J. Pharm Res. – 2011. – Vol. 28 (10). – P. 2490-2504.

8. Navari R.M. Olanzapine versus aprepitant for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting: A randomized phase III trial / R.M. Navari, S.E. Gray, A.C. Kerr // J. Support Oncol. – 2011. – Vol. 9. – P. 188–195.

*Г.С. Труш, И.Й. Галькевич*

## **Сравнительная оценка эффективности изолирования оланзапина из крови**

**Львовский национальный медицинский университет  
имени Данила Галицкого**

**Введение.** Оланзапин используется в психиатрической практике для лечения шизофрении и других психических расстройств. Передозировка этого препарата часто сопровождается проявлениями токсических эффектов, иногда летальных.

**Цель.** Оценка эффективности методик изолирования оланзапина из крови с использованием экстракционной очистки и метода флэш-хроматографии, которые можно применять в практике судебно-химического анализа.

**Материалы и методы.** Экстракцию оланзапина из крови проводили хлороформом при pH 10-11, а белковую фракцию осаждали 20% раствором сульфосалициловой кислоты. Флэш-хроматографическую очистку проводили на колонках GraceResolv Silica 5g/25ml, как элюент использовано 0,5% раствор аммиака в этаноле. Идентификацию и количественное определение оланзапина в исследуемых пробах проводили методом ГХ-МС на капиллярной колонке HP-1 Methyl Siloxane.

**Вывод.** Установлено, что при применении жидкостной экстракции из крови изолируется до 66% оланзапина, а применение флэш-хроматографии позволяет изолировать до 83% этого соединения. Обе методики очистки позволяют определить минимальную токсическую дозу оланзапина в крови, которая составляет 0,1мкг/мл.

**Ключевые слова:** оланзапин, флэш-хроматографии, ГХ-МС, кровь.

*H. Trush, I.Halkevych*

## **Comparative evaluation of efficacy of olanzapine isolation from blood**

**Danylo Halytsky Lviv National Medical University**

**Introduction.** Olanzapine is used in medical practice for treatment of schizophrenia and other mental disorders. This drug overdose often results in toxic effects even lethality.

**Aim.** Liquid extraction and flash-chromatography techniques applied in forensic-chemical investigation are compared.

**Materials and methods.** Olanzapine was extracted from blood with chloroform at pH 10-11; protein fraction was precipitated with 20 % sulfosalicylic acid. The flash-chromatographic purification was provided on Grace Resolv Silica 5g/25ml cartridges; 0.5 % ammonia solution in ethanol was an eluent. Olanzapine was quantified by GC-MS on HP-1 (methyl siloxane) column.

**Conclusions.** Liquid-liquid extraction isolated to 66 % of olanzapine, and flash-chromatography – to 83 % of this compound. Both purification techniques allow determining minimal toxic dosage of olanzapine (0.1 µg/ml) in blood.

**Key words:** olanzapine, flash chromatography, GC-MS, blood.

***Відомості про авторів:***

***Труш Галина Степанівна*** – аспірант кафедри токсикологічної та аналітичної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Адреса: Львів, вул. Пекарська, 69, тел.: (032) 275-76-32.

***Галькевич Ірина Йосипівна*** – к. фарм. н., зав. кафедри, доцент кафедри токсикологічної та аналітичної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Адреса: Львів, вул. Пекарська, 69, тел.: (032) 275-76-32.