

УДК 615.07:535.243

Лазницкая А.М.<sup>1</sup>, Чмелевская Н.В.<sup>1</sup>, Илларионова Е.А.<sup>2</sup>

## РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИЗОЛИРОВАНИЯ ТОФИЗОПАМА В МОДЕЛЬНОЙ СМЕСИ МОЧИ

<sup>1</sup> ГБУЗ «Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы», Иркутск, Россия  
<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России,  
Иркутск, Россия

*Изучено влияние природы органического растворителя, pH среды, наличия электролита, времени и кратности экстракции на процесс изолирования тофизопама из модельной смеси мочи. Установлено, что оптимальным органическим растворителем является дихлорэтан с pH 5.0. Высаливающим действием для тофизопама обладает насыщенный раствор натрия сульфата. Максимальное изолирование наблюдается при двукратной экстракции в течение 7 минут. Установлено, что из модельной смеси мочи изолируется от 66,51 до 67,91 % тофизопама.*

**Ключевые слова:** химико-токсикологический анализ, изолирование, тофизопам

## DEVELOPMENT OF METHODS OF TOFISOPAM ISOLATION IN MODEL URINE MIXTURE

Lazitskaya A.M.<sup>1</sup>, Chmelevskaya N.V.<sup>1</sup>, Illarionova E.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Irkutsk Regional Agency of Forensic Medical Examination, Irkutsk, Russia  
<sup>2</sup> Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia

*Forensic chemical examination is carried out in order to isolate, identify and quantify toxic, narcotic, psychotropic and potent substances in the organs and fluids of the human body.*

*The present study we researched the process of extraction of 2,3-benzodiazepine – tofisolpam.*

*There have been cases of tofisolpam poisoning. And there are no descriptions of tofisolpam isolation from biological fluids in the literature.*

*Liquid extraction, an effective and commonly used method of isolation in the chemical-toxicological analysis, is used when extracting substances from blood, lymph, saliva, urine and stomach washings. The process of isolation may be influenced by the nature of the organic solvent, pH, the presence of an electrolyte, time and frequency of extraction. We have studied the effect of each factor on tofisolpam isolation from aqueous solutions.*

*It has been found that the optimal organic solvent for the extraction of the solutions is dichloroethane, which extracts maximum amount of the analyte at pH = 5.0. Saturated sodium sulphate has a salting-in effect for tofisolpam. The optimum conditions for tofisolpam isolating are 7 minutes with double extraction.*

*Based on the research method of tofisolpam isolating the model mixture of urine was developed. We found that this model urine mixture isolates 66.51–67.91 % of tofisolpam.*

*We performed validation assessment of the developed method for evaluation of precision and accuracy. The assessment showed the suitability of techniques for the analysis.*

**Key words:** chemical and toxicological analysis, isolation, tofisolpam

## ВВЕДЕНИЕ

Судебно-химическую экспертизу проводят с целью выделения, идентификации и количественного определения (или исключения) ядовитых, наркотических, психотропных и сильнодействующих веществ, продуктов их превращения, главным образом, в органах и биологических жидкостях организма человека [4, 5].

Объектом настоящего исследования является производное 2,3-бензодиазепина – тофизопам, применяемый в медицинской практике в качестве анксиолитического средства при неврозах и неврозоподобных состояниях [3]. Известны случаи отравления тофизопамом при использовании его самостоятельно и в комплексной терапии с другими психотропными средствами. Химико-токсикологический анализ (ХТА) предполагает решение двух больших задач:

выделение ядовитых веществ из объекта исследования (изолирование) и определение содержания этих веществ в изолированной фазе. В литературе отсутствуют методики изолирования тофизопама из биологических жидкостей.

**Цель работы:** разработать методику изолирования тофизопама в модельной смеси мочи.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали таблетки «Грандаксин» производства EGIS Pharmaceuticals PLC (Венгрия), субстанцию тофизопама. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре СФ-2000 в кюветах с толщиной рабочего слоя 10 мм.

В качестве растворителей использовали 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты, 25%-й раствор аммиака, 95%-й этиловый спирт, хлороформ,

дихлорметан, дихлорэтан, петролейный эфир, этилацетат.

При статистической обработке результатов анализа использовали методы Стьюдента и Фишера [2]. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез  $p = 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективным и распространенным методом изолирования в ХТА является жидкость – жидкостная экстракция, применяемая при извлечении веществ из крови, лимфы, слюны, перитонеальной жидкости, мочи и промывных вод желудка. Она также используется на втором этапе при изолировании ядовитых соединений из трупного материала [4, 5].

На процесс изолирования могут оказывать влияние природа органического растворителя, pH среды, наличие электролита, время и кратность экстракции. Нами изучено влияние каждого фактора на изолирование тофизопама из водных растворов.

Тофизопам обладает основными свойствами. При изменении pH среды изменяется количество ионов и недиссоциированных молекул тофизопама. Органическими растворителями будет экстрагироваться тофизопам, находящийся в молекулярном состоянии. Ионы же тофизопама будут взаимодействовать с молекулами воды и не экстрагироваться в органический растворитель. При выборе оптимального растворителя для экстракции необходимо определить растворимость тофизопама в органических растворителях и воде. Данное исследование проводилось, так как не все растворители, используемые в ХТА, указываются в НД на субстанции. Для определения растворимости использовали ГФ XIII (ОФС.1.2.1.0005.15). Полученные данные свидетельствуют о том, что тофизопам практически не растворяется в воде. Этот растворитель нельзя использовать при экстракции тофизопама. Более кислая среда (0,1 М раствор хлористоводородной кислоты) приводит к улучшению растворимости изучаемого вещества за счет протонирования гетероатомов. Можно добавлять этот растворитель для перевода тофизопама в ионное

состояние. В этиловом спирте тофизопам трудно растворим, растворимость улучшается при нагревании. В связи с этим в качестве растворителя для приготовления исходных растворов использовали 95%-й этиловый спирт. Хлороформ, дихлорметан, дихлорэтан, петролейный эфир, этилацетат растворяют тофизопам, не смешиваются с 95%-м этиловым спиртом, поэтому были предложены нами для изучения процесса изолирования.

Другим немаловажным фактором, влияющим на процесс экстракции, является pH среды. Спектрофотометрическим методом определили степень экстракции тофизопама при варьировании pH от 2 до 13, добавляя 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты или 25%-го раствора аммиака. Результаты экспериментальных исследований в виде диаграммы представлены на рисунке 1.

Полученные данные свидетельствуют о том, что оптимальным органическим растворителем для экстракции тофизопама из растворов является дихлорэтан, который экстрагирует исследуемое вещество при pH = 5.0 в максимальном количестве. Петролейный эфир тофизопам практически не экстрагирует. Полученные данные будут использоваться нами для разработки методик изолирования тофизопама из объектов биологического происхождения.

Добавление электролитов оказывает высаливающее действие за счет понижения растворимости ядовитых веществ в воде. Можно предположить, что степень экстракции тофизопама органическим растворителем будет увеличиваться.

Нами изучено влияние 20%-го раствора натрия хлорида, насыщенного раствора натрия хлорида, 5%-го раствора натрия сульфата, насыщенного раствора натрия сульфата, 20%-го раствора аммония сульфата, насыщенного раствора аммония сульфата, 10%-го раствора натрия карбоната, насыщенного раствора натрия карбоната на экстракцию тофизопама из растворов. Результаты экспериментальных исследований представлены в таблице 1.

Полученные данные (табл. 1) свидетельствуют о том, что насыщенный раствор натрия сульфата обладает высаливающим действием для тофизопама.

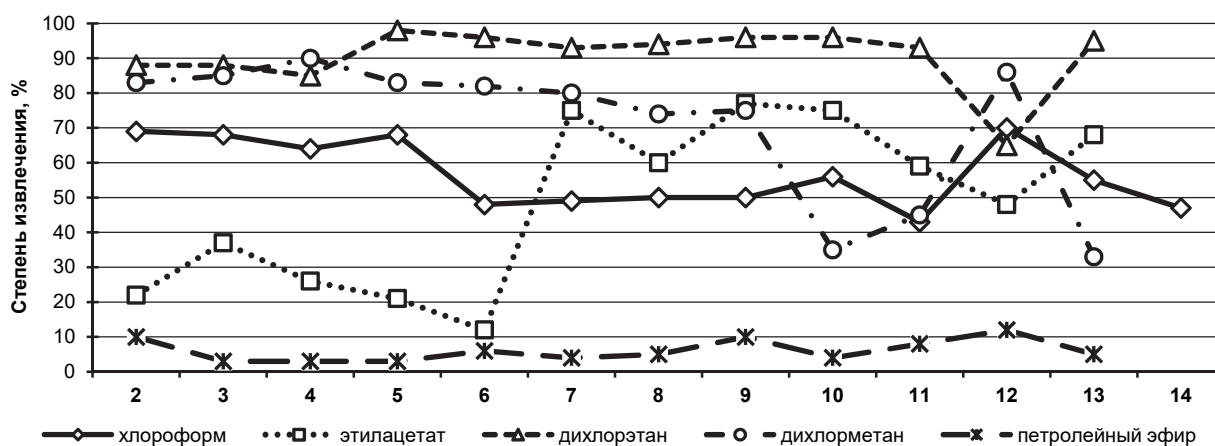


Рис. 1. Зависимость степени извлечения тофизопама от pH среды и природы органического растворителя.

Всаливающим действием для тофизопама обладает 20%-й раствор натрия хлорида.

Следующим этапом экспериментальных исследований являлось изучение влияния времени экстрагирования и кратности на степень экстракции тофизопама. Полученные данные шести параллельных определений представлены в таблице 2.

**Таблица 1**  
**Определение степени извлечения тофизопама в зависимости от добавленного электролита**

Используемый электролит	Степень экстракции, %
20%-й раствор натрия хлорида	81
Насыщенный раствор натрия хлорида	96
5%-й раствор натрия сульфата	97
Насыщенный раствор натрия сульфата	98
20%-й раствор аммония сульфата	84
Насыщенный раствор аммония сульфата	89
10%-й раствор натрия карбоната	94
Насыщенный раствор натрия карбоната	83

**Таблица 2**  
**Определение степени извлечения тофизопама в зависимости от времени и кратности экстракции**

Время, мин	Степень извлечения, %	Кратность	Степень извлечения, %
3	78	однократная	78
5	78	двукратная	99
7	81	трехкратная	99

Полученные данные свидетельствуют о том, что оптимальными условиями для изолирования тофизопама являются 7 минут при двукратной экстракции.

На основании проведенных исследований была разработана методика изолирования тофизопама из модельной смеси мочи.

**Методика изолирования тофизопама из модельной смеси мочи:** в колбу вместимостью 100 мл вносят 25 мл мочи, содержащей раствор таблеток «Грандаксин» в 95%-м этиловом спирте, настаивают в течение 24 часов при комнатной температуре и периодическом перемешивании на платформе «Шейкер S-3.08L» (ELMI, Латвия). 1 мл модельной смеси мочи помещают в коническую колбу объемом 25 мл, добавляют 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты до pH = 5.0. 1 мл насыщенного раствора натрия сульфата и 3 мл дихлорэтана. Содержимое

колбы взбалтывают в течение 7 минут и помещают в делительную воронку. После разделения фаз отделяют слой органического растворителя. Повторно экстрагируют 10 мл дихлорэтана, извлечения объединяют. Растворители удаляют при комнатной температуре. Сухой остаток, полученный после испарения экстрагента, растворяют в 20 мл 95%-го этилового спирта. 1 мл приготовленного раствора доводят до объема 10 мл 95%-м этиловым спиртом. Измеряют оптическую плотность приготовленного раствора на спектрофотометре при длине волны 270 нм. В качестве раствора сравнения используют 95%-й этиловый спирт. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора рабочего стандартного образца тофизопама.

**Методика приготовления рабочего стандартного образца тофизопама:** 0,0500 г (точная навеска) субстанции тофизопама растворяют в 20 мл 95%-го этилового спирта в мерной колбе вместимостью 50 мл и доводят объем раствора этим растворителем до метки. 1 мл приготовленного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора до метки 95%-м этиловым спиртом.

Результаты определения степени извлечения тофизопама из модельной смеси мочи представлены в таблице 3.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в извлечении из модельной смеси мочи обнаруживается от 66,51 до 67,91 % тофизопама.

Проведена валидационная оценка разработанной методики по показателям прецизионности и правильности, которая показала пригодность методики для анализа [1].

## ВЫВОДЫ

На основании вышеописанных исследований можно сделать вывод о том, что разработанная методика позволяет проводить изолирование тофизопама из модельной смеси мочи и может быть рекомендована для химико-токсикологического анализа исследуемого препарата.

## ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Арзамазцев А.П., Садчикова Н.П., Харитонов Ю.Я. Валидация аналитических методов // Фармация. – 2006. – № 4. – С. 8–12.

Arzamastsev AP, Sadchikova NP, Kharitonov YY. (2006). Validation of analytical methods [Validatsiya analiticheskikh metodov]. *Farmatsiya*, (4), 8–12.

**Таблица 3**  
**Определение степени извлечения тофизопама из модельной смеси мочи**

Внесено, мкг	Степень извлечения, %	Метрологические характеристики
100	66,51; 66,68; 67,02; 67,23; 66,63; 67,53	$\bar{x} = 66,93 \%$ ; $S_{\bar{x}} = 0,1619$ $\Delta X = 0,4161$ ; $\epsilon = 0,62 \%$
300	66,89; 66,64; 66,47; 67,03; 67,45; 67,25	$\bar{x} = 66,96 \%$ ; $S_{\bar{x}} = 0,1501$ $\Delta X = 0,3858$ ; $\epsilon = 0,58 \%$
500	67,91; 67,46; 67,84; 66,99; 66,96; 67,90	$\bar{x} = 67,51 \%$ ; $S_{\bar{x}} = 0,2527$ $\Delta X = 0,6494$ ; $\epsilon = 0,96 \%$

2. Государственная фармакопея; 13-е изд-е. – М., 2015. – Т. 1. – 1470 с.

State pharmacopeia [*Gosudarstvennaya farmakopeya*] (2015). Moskva, 1, 1470 p.

3. Регистр лекарственных средств России; 19-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: РЛС-МЕДИА, 2010. – 1368 с.

Register of medicines of Russia [*Registr lekarstvennykh sredstv Rossii*] (2010). Moskva, 1368 p.

4. Саломатин Е.М., Николаева Э.Г. Судебно-химический анализ трупного материала на наличие лекарственных и наркотических соединений // Судеб.-мед. экспертиза. – 1999. – № 3. – С. 21–22.

Salomatin EM, Nikolaeva EG. (1999). Forensic chemical analysis of cadaveric material for drug and narcotic compounds [*Sudebno-khimicheskiy analiz trupnogo*

materiala na nalichie lekarstvennykh i narkoticheskikh soedineniy]. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*, (3), 21-22.

5. Чернова Л.В. Применение скрининговых методов и их сочетаний в химико-токсикологическом анализе лекарственных веществ кислотного и основного характера // Актуальные вопросы и экспертной практики: Сб. науч. тр. – Новосибирск, 1998. – Вып. 3. – С. 211–214.

Chernova LV. (1998). Using screening methods and their combination in chemical and toxicological analysis of medicinal substances of acid and basic nature [*Primenenie skringovykh metodov i ikh sochetaniy v khimiko-toksikologicheskom analize lekarstvennykh veshchestv kislotnogo i osnovnogo kharaktera*]. *Aktual'nye voprosy i ekspertnoy praktiki: Sbornik nauchnykh trudov*. Novosibirsk, (3), 211-214.

#### Сведения об авторах

#### Information about the authors

**Лазницкая Анна Марковна** – судебно-медицинский эксперт ГБУЗ «Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы» (664022, г. Иркутск, б-р Гагарина 4; тел.: (3952) 22-93-90; e-mail: anlaz2005@yandex.ru)

**Lazitskaya Anna Markovna** – Forensic Pathologist at Irkutsk Regional Agency of Forensic Medical Examination (664022, Irkutsk, bulv. Gagarina, 4; tel.: (3952) 22-93-90; e-mail: anlaz2005@yandex.ru)

**Чмелевская Наталья Владимировна** – кандидат фармацевтических наук, заведующая судебно-химическим отделением ГБУЗ «Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы»

**Chmelevskaya Natalia Vladimirovna** – Candidate of Pharmaceutical Sciences, Head of the Department of Forensic Chemical Examination of Irkutsk Regional Agency of Forensic Medical Examination

**Илларионова Елена Анатольевна** – доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1; e-mail: lllelena24@rambler.ru)

**Illarionova Elena Anatolyevna** – Doctor of Chemical Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry of Irkutsk State Medical University (664003, Irkutsk, Krasnogo Vosstaniya str., 1; e-mail: lllelena24@rambler.ru)