

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი

კობა სივსივაძე

მეორე თაობის ზოგიერთი ანტიფსიქოზური საშუალების
ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზი

დისერტაცია

ფარმაციის დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

თბილისი

2017

ნაშრომი შესრულებულია:

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტის ფარმაცევტული და ტოქსიკოლოგიური ქიმიის დეპარტამენტში.

სსიპ ლევან სამხარაულის სახელობის სასამართლო ექსპერტიზის ეროვნული ბიუროს ქიმიურ-ნარკოლოგიური ექსპერტიზის დეპარტამენტში.

შპს „ჯი ემ ფარმაცევტიკალს“-ის ფარმაცევტული საწარმოს ლაბორატორიაში.

სამეცნიერო ხელმძღვანელები:

თამაზ მურთაზაშვილი - ფარმაციის აკადემიური დოქტორი, თსსუ, ფარმაცევტული და ტოქსიკოლოგიური ქიმიის დეპარტამენტის ხელმძღვანელი, პროფესორი.

მალხაზ ჯოხაძე - ფარმაციის აკადემიური დოქტორი, თსსუ, ფარმაკოგნოზის და ბოტანიკის მიმართულების ასოცირებული პროფესორი.

ექსპერტები

1. **დავით ჭინჭარაძე** – ფარმაციის აკადემიური დოქტორი, თსსუ, ფარმაკოგნოზის და ბოტანიკის მიმართულების ხელმძღვანელი, პროფესორი.
2. **თამაზ ჭუმბურიძე** – ბიოლოგიურ მეცნიერებათა აკადემიური დოქტორი, თსსუ, სოციალური და კლინიკური ფარმაციის დეპარტამენტის ასოცირებული პროფესორი.
3. **მალხაზ გეთია** - ფარმაციის აკადემიური დოქტორი, თსსუ, იოველ ქუთათელაძის ფარმაკოქიმიის ინსტიტუტის ფარმაცევტული ანალიზის და სტანდარტიზაციის დეპარტამენტის ხელმძღვანელი, მთავარი მეცნიერ-თანამშრომელი.

დისერტაციის გაცნობა შესაძლებელია თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტის ბიბლიოთეკაში (ვაჟა-ფშაველას გამზ. 29).

დისერტაციის დაცვა შედგება 2017 წლის 15 ივნისს 16.00 საათზე, თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტში

მისამართი: ვაჟა-ფშაველას გამზ. 33 (თსსუ-ის ადმინისტრაციული კორპუსი, პირველი სართული).

სარჩევი

შესავალი -----	7
თავი I. კვლევის აქტუალობა, მიზანი და ამოცანები, სამეცნიერო სიახლე, პრაქტიკული მნიშვნელობა -----	9
1.1 კვლევის აქტუალობა -----	9
1.2 კვლევის მიზანი და ამოცანები -----	10
1.3 კვლევის სამეცნიერო სიახლე -----	11
1.4 კვლევის პრაქტიკული მნიშვნელობა -----	12
თავი II. ლიტერატურის მიმოხილვა -----	14
2.1 შიზოფრენია -----	14
2.2 შიზოფრენიის სამკურნალო საშუალებები, კლასიფიკაცია -----	15
2.3 მეორე თაობის ანტიფსიქოზური საშუალებები -----	21
2.3.1 მეორე თაობის ანტიფსიქოზური საშუალებების ზოგადი დახასიათება ---	21
2.3.2 მეორე თაობის ანტიფსიქოზური საშუალებების მოქმედების მექანიზმი ---	21
2.3.3 მეორე თაობის ანტიფსიქოზური საშუალებების გვერდითი ეფექტები და სხვა მედიკამენტებთან ურთიერთქმედება -----	22
2.4 ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიპინის და კლოზაპინის დახასიათება	24
2.5 ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიურ ანალიზში გამოყენებული ექსტრაქციის მეთოდები-----	41
2.5.1 სითხე-სითხე ექსტრაქცია -----	41
2.5.2 მყარფაზური ექსტრაქცია -----	43
2.6 ქრომატომასსპექტრომეტრული ანალიზის მეთოდების მნიშვნელობა ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიურ ექსპერტიზაში -----	45
2.7 მეორე თაობის ანტიფსიქოზური საშუალებების იზოლირების და თვისობრივ-რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდები ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზში -----	49
თავი III. კვლევის დიზაინი, ობიექტები, მასალები და მეთოდები -----	53
3.1 კვლევის დიზაინი -----	53
3.2 კვლევის ობიექტები და მასალები -----	54
3.3 კვლევის მეთოდები -----	56

თავი IV. მიღებული შედეგები და მათი განხილვა -----	58
4.1 ბიოლოგიური ობიექტების სკრინინგი ნარკოტიკული და ფსიქოტროპული ნივთიერებების არსებობაზე ჰეტეროგენული იმუნოფერმენტული ანალიზის (ELISA) მეთოდით -----	58
4.2 ადამიანის შარდიდან ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის სითხე-სითხე ექსტრაქციის ოპტიმალური პირობების შერჩევა---	61
4.3 ადამიანის სისხლიდან და პლაზმიდან ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის მყარფაზური ექსტრაქციის ოპტიმალური პირობების შერჩევა -----	65
4.4 ბიოლოგიურ ობიექტებში ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის თვისობრივი ანალიზის მასსპექტრომეტრული პარამეტრების შერჩევა -----	70
4.5 ადამიანის შარდში და სხვადასხვა საგანმატარებლებში ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ერთდროული თვისობრივი ანალიზის გაზურ ქრომატოგრაფიული-მასსპექტრომეტრული(GC-MS) მეთოდის შემუშავება -----	71
4.6 გარდაცვლილი ადამიანის შარდში კლოზაპინის თვისობრივი ანალიზი გაზურ ქრომატოგრაფიული - მასსპექტრომეტრული (GC-MS) მეთოდით -----	77
4.7 ადამიანის სისხლში ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის თვისობრივ-რაოდენობრივი ანალიზის სითხურ ქრომატოგრაფიული - ტანდემური მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდის შემუშავება -----	80
4.8 ადამიანის პლაზმაში და შარდში ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ანალიზი სითხურ ქრომატოგრაფიული - ტანდემური მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდით -----	89
4.9 გარდაცვლილი ადამიანის სისხლში ოლანზაპინის და რისპერიდონის ერთდროული თვისობრივი ანალიზი სითხურ ქრომატოგრაფიული-ტანდემური მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდით -----	96
4.10 ფარმაცევტული წარმოების პროცესში გამოყენებულ დანადგარებზე აქტიური ნივთიერების ნარჩენი კონტამინაციის განსაზღვრა სითხურ ქრომატოგრაფიული - ტანდემური მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდით -----	99

4.11 საგანმატარებლებში ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ანალიზი სითხურ ქრომატოგრაფიული - ტანდემური მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდით -----	103
4.12 ადამიანის სისხლში ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის თვისობრივ-რაოდენობრივი ანალიზის სითხურ ქრომატოგრაფიულ - ტანდემური მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდის ვალიდაცია -----	108
თავი V. დასკვნები -----	140
თავი VI. Thesis of Disertation -----	141
გამოყენებული ლიტერატურა -----	149
დანართი №1 -----	167
ტერმინთა განმარტებები	
დანართი №2 -----	168
გამოქვეყნებული შრომები	

მადლობა

მადლობას ვუხდით სსიპ ლევან სამხარაულის სახელობის სასამართლო ექსპერტიზის ეროვნული ბიუროს ქიმიურ-ნარკოლოგიური ექსპერტიზის დეპარტამენტს და შპს „ჯი ემ ფარმაცევტიკალს“-ის ფარმაცევტული საწარმოს გაწეული მატერიალურ-ტექნიკური მხარდაჭერისათვის.

შესავალი

ფსიქოაქტიური საშუალებების ანალიზისათვის, მაღალი მგრძობელობის და სპეციფიური მეთოდების შემუშავება თანამედროვე ფარმაციის, ნარკოლოგიისა და ტოქსიკოლოგიის აქტუალური ამოცანაა. ბოლო წლებში აღნიშნული პრობლემა დღის წესრიგში განსაკუთრებული სიმწვავეთ დადგა, რადგანაც მკვეთრად გაიზარდა აღნიშნული ჯგუფის მედიკამენტების როგორც, სამედიცინო, ასევე არასამედიცინო მიზნით მოხმარება, იმატა მწვავე და სასიკვდილო მოწამვლების შემთხვევებმა.

ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზი მოიცავს მწვავე მოწამვლების დადგენას, ნარკოტიკული და ტოქსიკომანური თრობის დიაგნოსტიკას, გვამის და სხვა საგანმატარებლების სასამართლო-ქიმიურ გამოკვლევას. აღნიშნული კვლევა ხასიათდება სპეციფიური თავისებურებით, რაც გასათვალისწინებელია ანალიზის ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური მეთოდების შემუშავების დროს.

მწვავე ქიმიური მოწამვლებისას განსაკუთრებულ აქტუალობას იძენს სწრაფი, სპეციფიური, მაღალი მგრძობელობის და სელექციური ანალიზის მეთოდების შემუშავება, რომელიც სხვადასხვა ჯგუფის მრავალი ნაერთის ინდივიდუალური და ერთდროული განსაზღვრის საშუალებას იძლევა.

მეორე თაობის (ატიპური) ანტიფსიქოზური საშუალებების მიმართ ჩვენი ინტერესი განაპირობა მოცემული ჯგუფის პრეპარატების გამოყენების მკვეთრმა ზრდამ.

ატიპური ანტიფსიქოზური საშუალებები წარმოადგენს პირველი რიგის პრეპარატებს შიზოფრენიის მკურნალობისათვის, რომელიც ყველაზე გავრცელებული დაავადებაა ფსიქოპათოლოგიებს შორის.

ანტიფსიქოზური პრეპარატებით მკურნალობისას მნიშვნელოვანია დოზა-კონცენტრაციის მონიტორინგი, რადგანაც პაციენტის დამოკიდებულება სამკურნალო საშუალებებთან არის ინდივიდუალური.

ამასთან, რამოდენიმე ანტიფსიქოზური საშუალების ერთდროული გამოყენებისას შესაძლებელია ადგილი ჰქონდეს სხვადასხვა ტიპის სინერგიზმს, განსაკუთრებით საყურადღებოა პოტენცირებული სინერგიზმი, რომელიც განაპირობებს ტოქსიკურობის ზრდას და შესაძლოა იყოს ლეტალური შედეგის მიზეზი.

მცირე რაოდენობის საკვლევი ანტიფსიქოზური საშუალებების იდენტიფიკაცია და რაოდენობრივი ანალიზი ბიოლოგიური და არაბიოლოგიური წარმოშობის

ობიექტებში მნიშვნელოვანწილად განაპირობებს ზემოთ აღნიშნული პრობლემატიკის ეფექტურ გადაწყვეტას.

წარმოდგენილი სადისერტაციო ნაშრომი ეძღვნება მეორე თაობის ანტიფსიქოზური საშუალებების ინდივიდუალური და ერთდროული ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზის მეთოდების შემუშავებას.

თავი I

კვლევის აქტუალობა, მიზანი და ამოცანები, სამეცნიერო სიახლე, პრაქტიკული მნიშვნელობა

1.1 კვლევის აქტუალობა

შიზოფრენია წარმოადგენს ყველაზე გავრცელებულ ფსიქიატრიულ დაავადებას, რომელიც იწვევს ადამიანების გონებრივი და სოციალური ფუნქციების დაქვეითებას. მსოფლიო ჯანდაცვის ორგანიზაციის მონაცემებით შიზოფრენით დაავადებულია 21 მილიონზე მეტი ადამიანი [178].

1950 წლიდან შიზოფრენიის სამკურნალოდ გამოიყენებოდა "ტიპიური" (პირველი თაობის) ანტიფსიქოზური პრეპარატები, ხოლო 1990 წლიდან სამედიცინო პრაქტიკაში დაინერგა "ატიპიური" (მეორე თაობის) ანტიფსიქოზური საშუალებები [128].

სტატისტიკური მონაცემების მიხედვით რისპერიდონი, ოლანზაპინი, ქვეტიაპინი და კლოზაპინი წარმოადგენს ყველაზე ხშირად გამოყენებად მედიკამენტებს ატიპიურ ანტიფსიქოზურ საშუალებებს შორის [13, 46, 3, 70].

მეორე თაობის ანტიფსიქოზურ საშუალებებს, ინდივიდუალური და კომბინირებული გამოყენებისას, თერაპიული ეფექტურობის გარდა, ზოგიერთ შემთხვევაში (დოზის გადაჭარბება, შეცდომით მიღება, სუიციდალური მოწამვლები) ახასიათებს ადამიანის ორგანიზმზე ტოქსიკური ზემოქმედება, რომელიც ხშირად არის ლეტალური შედეგის მიზეზი [95].

ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ლაბორატორიების, ნარკოლოგიური დისპანსერების და ტოქსიკოლოგიური ცენტრების მონაცემების მიხედვით აღწერილია მოცემული ჯგუფის მედიკამენტებით გამოწვეული მწვავე მოწამვლების მრავალი შემთხვევა. ინტოქსიკაციის განსაკუთრებით მძიმე შემთხვევებში ხშირია ე.წ. „უეცარი სიკვდილის“ სინდრომის განვითარება. ასევე მნიშვნელოვან გართულებას წარმოადგენს უეცარი კარდიალური შეტევა და ავთვისებიანი ნეიროლეპტიური სინდრომი. მოცემული შემთხვევების 15 - 25% სრულდება ლეტალური გამოსავლით [108, 112, 186].

ხშირია ბავშვთა ასაკში აღნიშნული ჯგუფის მედიკამენტებით მოწამვლის შემთხვევები [167].

მედიკამენტების არასამედიცინო დანიშნულებით გამოყენება წარმოადგენს უკანასკნელი წლების მწვავე პრობლემას: საყურადღებოა ტოქსიკომანიის

მზარდი შემთხვევები მოზარდებში, რომლებიც გამოიყენებენ მოცემული ჯგუფის პრეპარატებს ნარკოტიკული თრობისათვის. აღნიშნულ შემთხვევებშიც ასევე მაღალია მწვავე მოწამვლების და გარდაცვალების რისკი.

საყურადღებოა ანტიფსიქოზური საშუალებების (განსაკუთრებით ატიპიური ანტიფსიქოზური მედიკამენტები) მიღება ე.წ. „სააფთიაქო ნარკომანიის“ მიზნით, რაც არის მნიშვნელოვანი სოციალურ პრობლემა.

ასევე გახშირდა ატიპიური ანტიფსიქოზური საშუალებებით კრიმინალური მოწამვლების შემთხვევები, რა დროსაც გამოიყენება ერთდროულად რამდენიმე ანტიფსიქოზური მედიკამენტი ან კომბინირებულად სხვა ფსიქოაქტიურ საშუალებებთან [16, 163].

ზემოთ აღნიშნულიდან გამომდინარე, შიზოფრენის მეორე თაობის ანტიფსიქოზური საშუალებებით რაციონალური და უსაფრთხო ფარმაკოთერაპიის უზრუნველყოფის მიზნით, დეტოქსიკაციის ღონისძიებების ეფექტურობის გაზრდისათვის, კლინიკურ-ლაბორატორიული ანალიზისათვის, სასამართლო-სამედიცინო ექსპერტიზის ეფექტური ჩატარებისათვის, მნიშვნელოვანია, რისპერიდონის, ოლანზაპინის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის მაღალი მგრძობელობის, სპეციფიური, ექსპრეს ანალიზის მეთოდების შემუშავება, მით უმეტეს, რომ ჩვენთვის ხელმისაწვდომ ლიტერატურაში არ არის მონაცემები რისპერიდონის, ოლანზაპინის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზის შესახებ მათი ბიოლოგიურ ობიექტებში და საგანმატარებლებში ერთდროული არსებობისას.

აღნიშნულის გათვალისწინებით ატიპიური ანტიფსიქოზური საშუალებების: რისპერიდონის, ოლანზაპინის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის, ბიოლოგიურ სითხეებში (შარდი, სისხლი, პლაზმა) და სხვა ობიექტებში კვლევისა და ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზის არსებული მეთოდების უნიფიცირება, სრულყოფა და ახალი, ეფექტური მეთოდების შემუშავება ერთ-ერთი აქტუალური პრობლემაა თანამედროვე ტოქსიკოლოგიისათვის.

1.2 კვლევის მიზანი და ამოცანები

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ბიოლოგიური და არაბიოლოგიური წარმოშობის ობიექტებში მეორე თაობის ანტიფსიქოზური საშუალებების - ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზის მეთოდების სრულყოფა, ახალი ეფექტური მეთოდების შემუშავება და ვალიდაცია.

მიზნის მისაღწევად დასახული იყო შემდეგი ამოცანები:

- ბიოლოგიური ობიექტებიდან ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის სითხე-სითხე ექსტრაქციის ოპტიმალური პირობების შემუშავება.
- ბიოლოგიური ობიექტებიდან ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის მყარფაზური ექსტრაქციის ოპტიმალური პირობების შერჩევა.
- ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის თვისობრივ-რაოდენობრივი ანალიზის ქრომატო-მასსპექტრომეტრული (GC-MS, LC-MS/MS) მეთოდების შემუშავება.
- ანალიზის შემუშავებული მეთოდების ვალიდაცია სწორხაზოვნების, სელექციურობის, სისწორის, აღმოსაჩენი და განსასაზღვრავი მინიმუმის, ექსტრაქციის ხარისხის, მატრიცის ეფექტის და სტაბილურობის დასადგენად.
- მოწოდებული მეთოდების აპრობაცია გარდაცვლილი ადამიანის ბიოლოგიურ სითხეებში, საგანმატარებლებზე და საწარმოო აპარატურაზე სამიზნე ნივთიერებების ნარჩენი კონტამინაციის დასადგენად.

1.3 კვლევის სამეცნიერო სიახლე

- თეორიულად დასაბუთებულია და ექსპერიმენტალურად დადასტურებულია ბიოლოგიური ობიექტებიდან ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ექსტრაქციის ხარისხზე მოქმედი ფაქტორები მათი ერთდროული იზოლირებისას.
- მოწოდებულია სითხე-სითხე და მყარფაზური ექსტრაქციის ოპტიმალური პირობები, რომლებიც უზრუნველყოფენ ოთხივე სამიზნე ნივთიერების მაქსიმალურ ექსტრაქციას სხვადასხვა კომპლექსური ბიოლოგიური ობიექტიდან.
- შემუშავებულია ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის გაზურ ქრომატოგრაფიული მასსპექტრომეტრული მეთოდით ანალიზის ოპტიმალური პირობები. მოწოდებული მეთოდი გამოირჩევა ექსპრესულობით და შესაძლებელია ოთხივე სამიზნე ნივთიერების ერთდროული ანალიზი ბიოლოგიური და არაბიოლოგიური წარმოშობის ობიექტებში.

- მოწოდებულია ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის თვისობრივ-რაოდენობრივი ანალიზის ორიგინალური, ვალიდირებული, ოპტიმალური პირობები, სითხური ქრომატოგრაფია-ტანდემური მასსპექტრომეტრული მეთოდისათვის. მოწოდებული მეთოდი უზრუნველყოფს ოთხივე სამიზნე ნივთიერების ერთდროულ განსაზღვრას, როგორც ბიოლოგიურ ობიექტებში, ასევე სხვადასხვა საგანმატარებლებში (ცარიელი ბლისტერი, ფლაკონი, ანაწმენდი, ტაბლეტები).

14 კვლევის პრაქტიკული მნიშვნელობა

- ექსპერიმენტის საფუძველზე მოწოდებულია ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის სხვადასხვა ბიოლოგიურ მატრიცაში ინდივიდუალური და ერთდროული იზოლირების სითხე-სითხე ექსტრაქციის ოპტიმალური პირობები, რომლის საშუალებით შესაძლებელია ექსტრაქცია მაღალი ხარისხით, 80-85% ფარგლებში.
- კვლევების შედეგების საფუძველზე დადგენილია რისპერიდონის, ოლანზაპინის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის მყარფაზური ექსტრაქციის ოპტიმალური პირობები, რომლის საშუალებით შესაძლებელია საკვლევი ნივთიერებების მაქსიმალური გასუფთავება და 91-94%-ის იზოლირება.
- მოწოდებულია ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის მეცნიერულად დასაბუთებული, ვალიდირებული, სწრაფი ანალიზის ქრომატო-მასსპექტრომეტრული (აირად და თხევად ფაზებში) მეთოდის პირობები, რომლებიც შესაძლებელია გამოყენებული იყოს:
 1. სასამართლო - ქიმიურ ექსპერტიზაში გვამური ობიექტების ანალიზისათვის;
 2. ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზისათვის, ცოცხალ პირებში მწვავე და ქრონიკული მოწამვლების დიაგნოსტიკისათვის;
 3. პაციენტებში თერაპიული დოზის მონიტორინგისათვის;
 4. სხვადასხვა სახის ნივთმტკიცებულების ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზისათვის;
 5. ფარმაცევტულ საწარმოში გამოყენებულ დანადგარებზე მცირე რაოდენობის აქტიური ნივთიერების ნარჩენი კონტამინაციის დადგენისათვის;

- კვლევის მასალები შესაძლებელია გამოყენებული იყოს სტუდენტებისათვის ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზის თანამედროვე მეთოდების სრულფასოვანი სწავლებისათვის.

კვლევის შედეგების აპრობაცია

ექსპერიმენტის საფუძველზე შემუშავებული მეთოდები აპრობირებულია სსიპ ლევან სამხარაულის სახელობის სასამართლო ექსპერტიზის ეროვნული ბიუროს ქიმიურ-ნარკოლოგიური ექსპერტიზის დეპარტამენტში და შპს „ჯმ ფარმაცევტიკალს“ ფარმაცევტული საწარმოს ლაბორატორიაში.

სადისერტაციო ნაშრომის მასალები მოხსენიებულია:

XXX International Symposium of Chromatography (ISC-2014), Salzburg 2014;

II საერთაშორისო სამეცნიერო კონფერენცია „ფარმაცევტული მეცნიერებები XXI საუკუნეში“, თბილისი, 2014;

III International Conference on Pharmaceutical Science (ICPS -2015), Tbilisi, 2015;

კვლევის შედეგების პუბლიკაცია

სადისერტაციო მასალების ძირითადი შედეგები გამოქვეყნებულია 5 სამეცნიერო ნაშრომში.

დისერტაციის მოცულობა და სტრუქტურა

დისერტაციის ტექსტი წარმოდგენილია 148 ნაბეჭდ გვერდზე, მოიცავს შესავალს, აქტუალობას, მიზანს, ამოცანებს, სამეცნიერო სიახლეს, პრაქტიკული მნიშვნელობას, ლიტერატურის მიმოხილვას, კვლევის ობიექტებს და მეთოდებს, კვლევის შედეგების განხილვას და დასკვნებს. ნაშრომი ილუსტრირებულია 35 ცხრილით და 73 სურათით, ბიბლიოგრაფია მოიცავს 224 წყაროს. კვლევის დასრულებით გამოქვეყნებული შრომები წარმოდგენილია დანართის სახით.

თავი II

ლიტერატურის მიმოხილვა

2.1 შიზოფრენია

შიზოფრენია ფსიქოპათოლოგიის მწვავე ფორმაა, რომელიც ხასიათდება ემოციური გასაღავებით, აზროვნებისა, აღქმის და ინტეგრირებული პიროვნული ფუნქციონირების დარღვევით. შიზოფრენია რთული სინდრომია, რომელსაც ინდივიდის ყოველდღიური სოციალური ცხოვრების საგრძნობი გაუარესება ახლავს თან [13, 89, 207].

მსოფლიო ჯანდაცვის ორგანიზაციის მონაცემებით შიზოფრენით დაავადებულია 21 მილიონზე მეტი ადამიანი, აქედან 12 მილიონი მამაკაცი და 9 მილიონი ქალი. შიზოფრენიით დაავადებული პაციენტები ნაკლებად მიმართავენ სამედიცინო დაწესებულებას, ამ შემთხვევაში 2-2.5 ჯერ მეტია გარდაცვალების რისკი ვიდრე ადამიანებში, რომლებიც არ არიან დაავადებული შიზოფრენიით [84,178].

ჩვეულებრივ, შიზოფრენია „პროდრომული“ პერიოდით იწყება, რომელსაც ახასიათებს პიროვნების ფუნქციონირების გაუარესება. ამ პერიოდის სიმპტომები შეიძლება მოიცავდეს მესხიერებასთან დაკავშირებულ პრობლემებს, სოციალურ იზოლაციას, უცნაურ ქცევას, მოტივაციისა და ინტერესების დაქვეითებას. პროდრომულ ფაზას ჩვეულებრივ მოჰყვება მწვავე ფაზა, რომელსაც ახასიათებს ბოდვა, ჰალუცინაცია, ქცევითი დარღვევები. მეურნალობის შედეგად პაციენტი გამოდის მწვავე მდგომარეობიდან, თუმცა ზოგჯერ რჩება მოტივაციისა და ინტერესების ნაკლებობა, სოციალური იზოლაცია. მესამე ფაზაში, რომელიც შეიძლება წლები გაგრძელდეს, ხშირად ვითარდება ეგზაცერბაციები(გამწვაება), რომელიც, დამატებით ინტერვენციას საჭიროებს [35, 68, 71, 185, 205].

ისტორიულად, შიზოფრენიული აშლილობანი პირველად აღწერილ იქნა ფრანგი ფსიქიატრის მორელის (Benedict Morel, 1809-1873) მიერ, რომელმაც მოზარდობის ასაკში განვითარებულ ფსიქიკურ დარღვევებს უწოდა Demence Precoce (ფრანგულიდან - ნადრევი ჭკუასუსტობა) [60]. კალბაუმმა (Kahlbaum) პირველად აღწერა კატატონური სიმპტომები, ჰეკერმა (Hecker) კი ჰებეფრენიის დროს პაციენტთა ქცევის თავისებურებანი [110]. მოგვიანებით აღნიშნული სიმპტომები კრეპელინმა (Emil Kraepelin, 1856-1926) ერთ ნოზოლოგიად გააერთიანა და უწოდა Dementia Praecox [73, 111].

შიზოფრენია მსოფლიოში უნარშეზღუდულობის გამომწვევ 10 წამყვან სამედიცინო აშლილობებს შორის არის დასახელებული. შიზოფრენიით დაავადებულ პირებს შორის მაღალია სიკვდილიანობა, რაც ნაწილობრივ განპირობებულია თვითმკვლელობით (დაახლოებით 10%) და ძალადობრივი სიკვდილით. ასევე დადასტურებულია კავშირი შიზოფრენიის სიმპტომების გამომჟღავნებასა და ფსიქოპათიური ნივთიერებების მოხმარებას შორის [36, 39, 99, 148, 155, 220].

2.2 შიზოფრენიის სამკურნალო საშუალებები, კლასიფიკაცია

სადღეისოდ შიზოფრენიის სამკურნალოდ ძირითადად გამოიყენება ანტიფსიქოზური საშუალებები. მედიკამენტური მკურნალობა მეტად ეფექტურია პოზიტიური სიმპტომებისათვის (ბოდვა, ჰალუცინაცია და სხვა), ნაკლებად ეფექტურია ნეგატიური და კოგნიტური სიმპტომებისთვის. ანტიფსიქოზური მედიკამენტების ეფექტურობა შესაძლოა შესამჩნევი გახდეს რამდენიმე კვირის შემდეგ, რადგანაც მოქმედება ხორციელდება თანდათანობით [51, 100, 101, 115].

სამკურნალო საშუალებების კლასიფიკაცია

შიზოფრენიის სამკურნალო საშუალებები იყოფიან 2 ძირითად ჯგუფად:

1. „ტიპიური“ - პირველი თაობის ანტიფსიქოზური მედიკამენტები
2. „ატიპიური“ - მეორე თაობის ანტიფსიქოზური მედიკამენტები

მოცემული ტერმინები ხშირად გამოიყენება კლინიკურ პრაქტიკაში. ტერმინი დაფუძნებულია მეორე თაობის ანტიფსიქოზური საშუალებების ატიპიურ თვისებებზე, როგორც არის ექსტრაპირამიდალური სიმპტომების განვითარების რისკის ნაკლებობა პირველი თაობის ანტიფსიქოზურ საშუალებებთან შედარებით. შესაბამისად, რომ არ მომხდარიყო აღრევა, მსოფლიო ფსიქიატრთა ასოციაციის მიერ მოხდა დეფინიცია და პირველი თაობის მედიკამენტებს ეწოდა ტიპიური ანტიფსიქოზური საშუალებები, ხოლო მეორე თაობის მედიკამენტებს ატიპიური ანტიფსიქოზური საშუალებები [30, 66, 123, 201].

“ტიპიური” (პირველი თაობის) ანტიფსიქოზური პრეპარატები (ცხრილი 1) გამოიყენება შიზოფრენიის სამკურნალოდ 1950 წლიდან. “ათიპიური” (მეორე თაობის) ანტიფსიქოზური საშუალებები (ცხრილი 2) სტანდარტულ სამედიცინო პრაქტიკაში შემოვიდა 1990 წლიდან [78, 120, 128, 180].

ცხრილი 1. „ტიპიური“ - პირველი თაობის ანტიფსიქოზური მედიკამენტები

პრეპარატი	ჯგუფი
ქლორპრომაზინი	ფენოთიაზინები
ფლუფენაზინი	
ლევომეპრომაზინი	
პერფენაზინი	
თიორიდაზინი	
ქლორპროტიქსანი	თიოქსანტინები
თიოთიქსანი	
ზუკლოფენთიოქსოლი	
კლოტიაპინი	სხვადასხვა
ჰალოპერიდოლი	
ლოქსაპინი	
მოლონდონი	
პიმოზიდი	

ცხრილი 2: მეორე თაობის ანტიფსიქოზური მედიკამენტები

პრეპარატი	ჯგუფი
არიპიპრაზოლი	ქინოლინის წარმოებულნი
კლოზაპინი	დიბენზოდიასეპინი
ოლანზაპინი	თიოენობენზოდიასეპინი
პალიპერიდონი	ბენზისოქსაზოლის წარმოებულნი
ქვეტიპინი	დიბენზოთიასეპინი
რისპერიდონი	ბენზისოქსაზოლის წარმოებულნი
სერტინდოლი	ფენილინდოლის წარმოებულნი

მეორე თაობის (ატიპიური) ანტიფსიქოზური პრეპარატების მთავარი უპირატესობაა, რომ ნაკლებად იწვევენ ექსტრაპირამიდულ გართულებებს და მოგვიანებით დისკინეზიას (მოძრაობის უნარის დარღვევა), მაგრამ მათ სხვა გვერდითი ეფექტები აღმოაჩნდათ, როგორცაა წონის მატება და მეტაბოლური პრობლემები, რომლებიც II ტიპის დიაბეტის და გულსისხლძარღვთა დაავადების განვითარების რისკს ზრდის. ასევე ანტიფსიქოზური მედიკამენტების მნიშვნელოვან გვერდით ეფექტს მიეკუთვნება სისხლის შრატში პროლაქტინის დონის მატება. მკურნალობის მიმართ რეზისტენტული პაციენტებისათვის ერთადერთი რეკომენდებული პრეპარატია კლოზაპინი. სხვა არც ერთი ატიპიური პრეპარატი არ ხასიათდება ასეთი ეფექტურობით [45, 65, 72, 77, 86, 176].

შიზოფრენიის მკურნალობა

მიუხედავად იმისა, რომ ანტიფსიქოზური პრეპარატები წარმოადგენენ სხვადასხვა ნაერთების ჯგუფს, მათი პირველადი ფარმაკოლოგიური მოქმედება ძირითადად მსგავსია და განპირობებულია დოფამინ D₂ რეცეპტორებზე ანტაგონისტური მოქმედებით [33, 154].

ანტიფსიქოზური პრეპარატები ასევე გამოიყენებიან სხვა პრეპარატებთან კომბინაციაში, როგორცაა ანტიკონვულსანტები, ანტიდეპრესანტები და ბენზო დიაზეპინები[47]. კლინიცისტებმა აღნიშნული პრეპარატები ანტიფსიქოზურ მედიკამენტებთან კომბინაციაში შეიძლება გამოიყენონ შემდეგ შემთხვევებში:

- ანტიფსიქოზური პრეპარატი მონოთერაპიის სახით არ არის ეფექტური;
- ქცევის კონტროლისთვის;
- ანტიფსიქოზური მედიკამენტების გვერდითი ეფექტების თავიდან ასაცილებლად;
- მეორადი ფსიქიატრიული პრობლემების (როგორცაა დეპრესია და შფოთვა) სამკურნალოდ [65, 69, 113, 117].

ანტიფსიქოზური პრეპარატების დანიშვნის ზოგადი პრინციპები

მკურნალობისათვის საწყის ეტაპზე რეკომენდებულია ერთი პრეპარატის დანიშვნა (გარდა განსაკუთრებული გარემოებებისა). ანტიფსიქოზური საშუალებების კომბინაციაში დანიშვნა საჭიროა იმ შემთხვევაში, როდესაც ერთი ანტიფსიქოზური პრეპარატით მკურნალობისას (მათ შორის კლოზაპინზე) გამოხატულია არაადეკვატური შედეგი.

ზოგიერთ შემთხვევაში ანტიფსიქოზური პოლიფარმაცია წარმოადგენს უეცარი კარდიალური შეტევის და სიკვდილის რისკს. ანტიფსიქოზური პოლიფარმაციის არაეფექტურობის შემთხვევაში უნდა გაგრძელდეს მონოთერაპია [118, 130, 194, 223].

ანტიფსიქოზური პრეპარატების დოზები

ანტიფსიქოზური მედიკამენტების „სტანდარტული დოზა“ წარმოადგენს სამკურნალო ნივთიერების რაოდენობას, რომელიც ინარჩუნებს საუკეთესო ბალანსს თერაპიულ ეფექტსა და გვერდით მოვლენებს შორის. ანტიფსიქოზური მედიკამენტების ეკვივალენტური, მინიმალური და მაქსიმალური დოზები მოცემულია № 3-6 ცხრილებში. [13, 19, 59, 76, 91, 169].

ცხრილი 3: ანტიფსიქოზური მედიკამენტების ექვივალენტური დოზები

მედიკამენტი	ექვივალენტური დოზები	ლიტერატურაში მითითებული დოზების დიაპაზონი
ქლორპრომაზინი	100 მგ/დღ	-
ფლუფენაზინი	2 მგ/დღ	2-5 მგ/დღ
ტრიფლუოპერაზინი	5 მგ/დღ	2.5-5 მგ/დღ
ფლუპენტიქსოლი	3 მგ/დღ	2-3 მგ/დღ
ზუკლოპენტიქსოლი	25 მგ/დღ	25-60 მგ/დღ
ჰალოპერიდოლი	3 მგ/დღ	1.5-5 მგ/დღ
სულპირიდი	200 მგ/დღ	200-270 მგ/დღ
პიმოზიდი	2 მგ/დღ	2 მგ/დღ
ლოქსაპინი	10 მგ/დღ	10-25 მგ/დღ
ფლუფენაზინ-დეპო	5 მგ/კვირა	1-12.5 მგ/კვირა
პიპოტიაზინ-დეპო	10 მგ/კვირა	10-12.5 მგ/კვირა
ფლუპენტიქსოლ-დეპო	10 მგ/კვირა	10-20 მგ/კვირა
ზუკლოპენტიქსოლ-დეპო	100 მგ/კვირა	40-100 მგ/კვირა
ჰალოპერიდოლ-დეპო	15 მგ/კვირა	5-25მგ/კვირა

ცხრილი 4: პირველი თაობის ანტიფსიქოზური მედიკამენტების მინიმალური ეფექტური დოზა/დღეში

მედიკამენტი	პირველი ეპიზოდი	რეციდივი
ქლორპრომაზინი	200 მგ	300 მგ
ტრიფლუოპერაზინი	10 მგ	15 მგ
ჰალოპერიდოლი	2 მგ	4 მგ და მეტი
სულპირიდი	400 მგ	800 მგ

ცხრილი 5: მეორე თაობის ანტიფსიქოზური მედიკამენტების მინიმალური ეფექტური დოზა/დღეში

მედიკამენტი	პირველი ეპიზოდი	რეციდივი
ქლორპრომაზინი	200 მგ	300 მგ
ტრიფლუოპერაზინი	10 მგ	15 მგ
სულპირიდი	400 მგ	800 მგ

ცხრილი 6: ანტიფსიქოზური მედიკამენტების მაქსიმალური ეფექტური დოზა/დღეში

მედიკამენტი	მაქსიმალური დოზა
პირველი თაობის-პერორალური	
ქლორპრომაზინი	1000 მგ/დღ
ფლუპენტიქსოლი	18 მგ/დღ
ტრიფლუოპერაზინი	30 მგ/დღ
ჰალოპერიდოლი	30 მგ/დღ
სულპირიდი	2400 მგ/დღ
ლევომეპრომაზინი	1000 მგ/დღ
პერიციპროლი	300 მგ/დღ
პერფენაზინი	24 მგ/დღ
პიმოზიდი	20 მგ/დღ
ზუკლოპენტიქსოლი	150 მგ/დღ
მეორე თაობის-პერორალური	
ამისულპირიდი	1200 მგ/დღ
არიპიპრაზოლი	30 მგ/დღ
კლოზაპინი	900 მგ/დღ
ოლანზაპინი	20 მგ/დღ
პალიპერიდონი	12 მგ/დღ
ქვეტიპინი	750/800 მგ/დღ
რისპერიდონი	16 მგ/დღ
ზიპრაზიდონი	160 მგ/დღ
ზოტეპინი	300 მგ/დღ
დეპო-პრეპარატები	
ფლუფენაზინ-დეპო	50 მგ/კვირაში
პიპოტიაზინ-დეპო	50 მგ/კვირაში
ფლუპენტიქსოლ-დეპო	400 მგ/კვირა
ჰალოპერიდოლ-დეპო	300 მგ/ყოველ 4 კვირაში
ზუკლოპენტიქსოლ-დეპო	600 მგ/კვირა
რისპერიდონი	25 მგ/კვირა

2.3 მეორე თაობის ანტიფსიქოზური საშუალებები

2.3.1 მეორე თაობის ანტიფსიქოზური საშუალებების ზოგადი დახასიათება

უკანასკნელ წლებში ფსიქოფარმაკოლოგიის განვითარების ამოცანას წარმოადგენდა ანტიფსიქოზური საშუალებების ახალი თაობის შექმნა, რომელიც იქნებოდა გაცილებით ეფექტური და მეტად უსაფრთხო არსებულ ნეიროლეპტიურ საშუალებებთან შედარებით. სამეცნიერო კვლევების საფუძველზე და ქიმიურ-ფარმაცევტული კომპანიების აქტიური ძალისხმევით შეიქმნა ახალი ანტიფსიქოზური საშუალებები, როგორც არის რისპერიდონი, ოლანზაპინი, ქვეტიპინი, კლოზაპინი, სერტინდოლი და სხვა, რომლებიც წარმოადგენს მეორე თაობის (ატიპიურ) ანტიფსიქოზურ საშუალებებს [78, 132, 140, 146, 184].

ატიპიური ანტიფსიქოზური საშუალებების კლინიკურ პრაქტიკაში გამოყენებამ საშუალება მისცა ექიმებს ჰქონოდათ ფართო სპექტრი შიზოფრენიის მართვისათვის. მოცემული საშუალებები აღმოჩნდა ანტიფსიქოზური ფარმაკოთერაპიის ერთგავრი სტანდარტი და წარმოადგენენ პირველი რიგის პრეპარატებს შიზოფრენიის სამკურნალოდ. მეორე თაობის ანტიფსიქოზური საშუალებების გამოყენება არის მნიშვნელოვანი პროგრესი ფსიქიატრიაში ეფექტურობის მხრივ [96, 98, 133, 145].

2.3.2 მეორე თაობის ანტიფსიქოზური საშუალებების მოქმედების მექანიზმი

“ატიპიური” (მეორე თაობის) ანტიფსიქოზური საშუალებების სამედიცინო პრაქტიკაში გამოყენება იწყება 1990 წლიდან. აღნიშნული საშუალებების თერაპიული ეფექტი განპირობებულია 5-HT_{2A} რეცეპტორების ანტაგონიზმით და/ან 5-HT_{1A} რეცეპტორების აგონიზმით. მოცემული ჯგუფის პრეპარატების გვერდითი მოვლენები დოზა დამოკიდებულია და ხშირად გამოწვეულია ჰისტამინერგულ, ქოლინერგულ, ალფა-ადრენერგულ და სხვა რეცეპტორებთან ურთიერთქმედებით. შიზოფრენიით დაავადებულ პაციენტებზე ჩატარებული კვლევების მიხედვით ოთხი ატიპიური ანტიფსიქოზური პრეპარატი (ამისულპრიდი, კლოზაპინი, ოლანზაპინი და რისპერიდონი) უფრო ეფექტური აღმოჩნდა ვიდრე ზოგიერთი პირველი თაობის პრეპარატი [31, 105, 125, 128, 141, 197].

2.3.3 მეორე თაობის ანტიფსიქოზური საშუალებების გვერდითი ეფექტები და სხვა მედიკამენტებთან ურთიერთქმედება

გვერდითი ეფექტები

ყველა ანტიფსიქოზურ პრეპარატს გააჩნია გვერდითი ეფექტები, რომელთა გამოვლინება და კლინიკური მნიშვნელობა ცვალებადია და დამოკიდებულია მედიკამენტის მიმართ პაციენტის ინდივიდუალურ მგრძობელობაზე. გვერდითი ეფექტები მოიცავს შემდეგ კლინიკურ გამოვლინებებს: ექსტრაპირამიდული სინდრომი (პარკინსონის მსგავსი სინდრომი), მწვავე დისტონიური რეაქცია, აკათიზია (მოუსვენრობა მუდმივი მოძრაობისაკენ სწრაფვით), მოგვიანებითი დისკინეზია, ჰიპერპროლაქტინემია [144, 183, 202].

პაციენტებისათვის ყველაზე უმეტესად გვერდით ეფექტებს მიეკუთვნება ექსტრაპირამიდული მოვლენები, სედაცია, წონის მატება, ერექციული დისფუნქცია და ეაკულაციის დარღვევები. კლოზაპინის, ოლანზაპინის და ქვეტიაპინისთვის განსაკუთრებით დამახასიათებელია წონის მნიშვნელოვნად მატება, დისლიპიდემია და ჰიპერგლიკემია [142, 158].

საგანგაშოა გულ-სისხძარღვთა დაავადებებით გამოწვეული სიკვდილიანობა შიზოფრენიის მქონე პაციენტებში ატიპიური პრეპარატების გამოყენებისას. ატიპიური საშუალებების გამოყენებისას პაციენტებში არსებობს კრუნჩხვების პროვოცირების რისკი, რომელიც ყველაზე მაღალია კლოზაპინით და ყველაზე დაბალია რისპერიდონით მკურნალობისას [43, 109].

კლოზაპინმა შესაძლოა გამოიწვიოს ნეიტროპენიის და აგრანულოციტოზის პროვოცირება, შესაბამისად მკურნალობისას საჭიროა ლეიკოციტების რუტინული მონიტორინგი. ასევე დადგენილია, რომ იზრდება გარდაცვალების რისკი მეორე თაობის ანტიფსიქოზური საშუალებების გამოყენებისას დემენციის პრობლემის მქონე ხანდაზმულ პაციენტებში [131, 135, 157].

სხვა მედიკამენტებთან ურთიერთქმედება

მეორე თაობის ანტიფსიქოზური მედიკამენტები სიფრთხილით მიიღება ცენტრალურ ნერვულ სისტემაზე მოქმედ სხვა პრეპარატებთან ერთად. ღვიძლის ფერმენტების ინდუქტორების გამოყენებისას მოსალოდნელია ქვეტიაპინის კლირენსის ზრდა, ხოლო ფერმენტ ციტოქრომ P450 3A ინჰიბიტორების გამოყენების შემთხვევაში პრეპარატის კლირენსის კლება. შესაძლოა

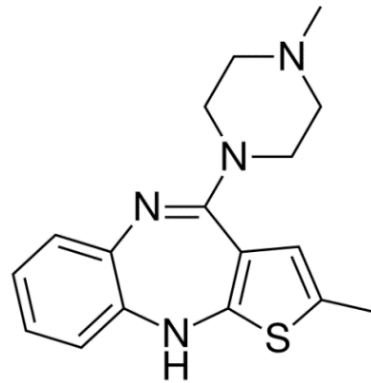
გაძლიერდეს ანტიპიპერტენზიული საშუალებების ეფექტი. კლოზაპინს შეუძლია ალკოჰოლის და მათ-ს ინჰიბიტორების ცენტრალური მოქმედების გაძლიერება [6, 160].

ატიპიურმა ანტიფსიქოზურმა საშუალებებმა შესაძლოა ზეგავლენა მოახდინონ ნარკოტიკული და ფსიქოტროპული პრეპარატების გამოვლენის მიზნით ჩატარებულ შარდის ანალიზზე, ცრუ დადებითი შედეგის გამოვლენით. მონაცემების მიხედვით იმუნოფერმენტული მეთოდით შარდში მეტადონის ან ტრიციკლური ანტიდეპრესანტების გამოვლენის მიზნით ჩატარებულ კვლევებში დაფიქსირდა ცრუ დადებითი შედეგი პაციენტებში, რომლებიც ღებულობდნენ ქვეტიპინს [74, 179].

2.4 ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის დახასიათება

ოლანზაპინი

ოლანზაპინი წარმოადგენს თიენობენზოდიასეპინის ნაწარმ ატიპიურ ანტიფსიქოზურ საშუალებას. ქიმიური დასახელება არის 2-მეთილ-4-(4-მეთილპიპერაზინ-1-ილ)-10H-თიენო [2,3-ბ] [1,5] ბენზოდიასეპინი. მოლეკულური ფორმულა არის $C_{17}H_{20}N_4S$, რომელიც შეესაბამება მოლეკულურ მასას 312.44. ოლანზაპინის სტრუქტურული ფორმულა მოცემულია სურათზე 1. ოლანზაპინი არის ყვითელი კრისტალური ნივთიერება, რომელიც იხსნება დიქლორმეთანში, ქლოროფორმში, აცეტონში, ნ-პროპანოლში, 2-ბუთანოლში და აცეტონიტრილში, მცირედ იხსნება მეთანოლში და ეთანოლში, პრაქტიკულად არ იხსნება წყალში[63].



სურათი 1: ოლანზაპინის სტრუქტურა

ფარმაცევტულმა კომპანიამ Eli Lilly and Company ოლანზაპინი შეიმუშავა 1996 წელს და მოახდინა მედიკამენტის სააფთიაქო ქსელში გაშვება სავაჭრო დასახელებით ზიპრექსა, რომელიც განკუთვნილი იყო შიზოფრენიის სამკურნალოდ. 2011 წელს პრეპარატი გახდა გენერული. 2008 წელს ზიპრექსას გაყიდვები შეადგენდა 2.2 მილიარდ დოლარს აშშ-ში და 4.7 მილიარდ დოლარს მსოფლიოს მასშტაბით [61]. ოლანზაპინის შემცველი პრეპარატები საქართველოს ფარმაცევტულ ბაზარზე წარმოდგენილია მრავალი საფირმო სახელწოდებით: რექსები (Abdi Ibrahim, თურქეთი), ოლზაპი (GM Pharmaceuticals Ltd, საქარველო), Egolanza® EGIS Pharmaceuticals, უნგრეთი), ოლანკლაინი (GlaxoSmithKline), ოზაპექსი (Pharmathen S.A., საბერძნეთი), ჯამში 32 პრეპარატის ოდენობით (სურათი 2, 3)[11].



სურათი 2: ოლანზაპინის ტაბლეტები



სურათი 3: ოლანზაპინის წამლის ფორმები

მოქმედების მექანიზმი

ოლანზაპინს ახასიათებს მთელ რიგ რეცეპტორულ სისტემაზე ფართო ფარმაკოლოგიური მოქმედება, მაღალი აფინურობით უკავშირდება შემდეგ რეცეპტორებს: სეროტონინის $5HT_{2A/2C}$, $5HT_6$ ($K_i=4, 11$ და 5 nM, შესაბამისად), $5HT_3$ ($K_i=57$ nM), მუსკარინის M_{1-5} ($K=73, 96, 132, 32,$ და 48 nM, შესაბამისად), დოფამინის D_{1-4} ($K_i=11-31$ nM), ჰისტამინის H_1 ($K_i=7$ nM) და α_1 ადრენერგული რეცეპტორებს ($K_i=19$ nM). ოლანზაპინი სუსტად უკავშირდება $GABA_A$, BZD და β -ადრენერგულ რეცეპტორებს ($K>10$ μ M). დოფამინის და $5HT_2$ -ის გარდა სხვა რეცეპტორების ანტაგონიზმი განსაზღვრავს ოლანზაპინის გარკვეულ თერაპიულ და გვერდით ეფექტებს. ოლანზაპინის მიერ H_1 ჰისტამინური რეცეპტორების ანტაგონიზმი განაპირობებს პრეპარატის მიღების პერიოდში დაფიქსირებულ სედაციას [10].

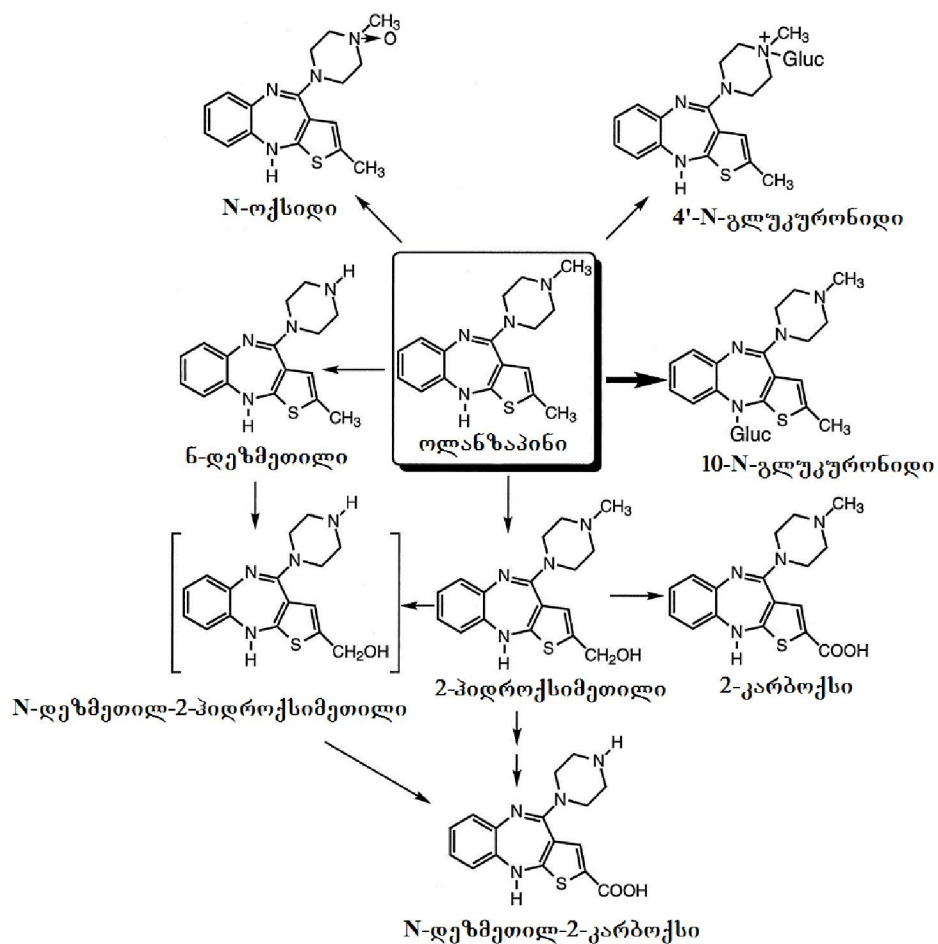
ფარმაკოკინეტიკა

მონოთერაპიის დროს პერორალურად მიღებისას ოლანზაპინი კარგად შეიწოვება და მაქსიმალური კონცენტრაცია მიიღწევა დოზის მიღებიდან დაახლოებით 6 საათში. ახასიათებს „პირველი გავლის“ ეფექტი და დოზის დაახლოებით 40% მეტაბოლიზდება სისტემურ სისხლის მიმოქცევაში მოხვედრამდე. ოლანზაპინის

მოავარ მეტაბოლურ გზას წარმოადგენს პირდაპირი გლუკურონიზაცია და ციტოქრომ P450-ით (CYP) დაჟანგვა (სურათი 4). CYP2D6-ით დაჟანგვა ნაკლებად მნიშვნელოვანი მეტაბოლური გზაა, რადგან ოლანზაპინის კლირენსი არ მცირდება ისეთ სუბიექტებში, რომელთაც აღენიშნებათ მოცემული ფერმენტის ნაკლებობა [53, 85].

საკვები არ ახდენს გავლენას ოლანზაპინის შეწოვის სიჩქარეზე ან მოცულობაზე. ოლანზაპინის დღეში ერთჯერადი მიღებისას წონასწორული კონცენტრაცია მიიღწევა 1 კვირაში, რაც დაახლოებით ორჯერ აჭარბებს ერთჯერადი დოზის მიღებისას დაფიქსირებულ კონცენტრაციას. [139, 182].

ოლანზაპინი კარგად ნაწილდება ორგანიზმში, განაწილების მოცულობა შეადგენს დაახლოებით 1000 ლ/ს. 93% უკავშირდება პლაზმის ცილებს, ძირითადად ალბუმინს და ალფა-1-გლიკოპროტეინს 7-1100 ნგ/მლ კონცენტრაციის შემთხვევაში [103].



სურათი 4: ოლანზაპინის მეტაბოლიზმის სქემა

დანიშნულება და დოზირება

ოლანზაპინი ნაჩვენებია შიზოფრენიის, პირველი ტიპის ბიპოლარულ აშლილობასთან დაკავშირებული მწვავე მანიაკალური ან შერეული ეპიზოდების ინტენსიური მკურნალობისათვის და პირველი ტიპის ბიპოლარული აშლილობის შემანარჩუნებელი თერაპიისათვის. შიზოფრენიის ან პირველი ტიპის ბიპოლარული აშლილობის მქონე პედიატრიულ პაციენტებში პრეპარატი მიიღება მხოლოდ სრული დიაგნოსტიკური შეფასების შემდეგ და მოსალოდნელი რისკების გათვალისწინებით. პირველი ტიპის ბიპოლარულ აშლილობასთან დაკავშირებული მანიაკალური ან შერეული ეპიზოდების მკურნალობისას დამატებითი საშუალების სახით მიიღება ვალპროატთან ან ლითიუმის პრეპარატებთან ერთად. ოლანზაპინი გამოიყენება შიზოფრენიასთან ან პირველი ტიპის ბიპოლარულ მანიასთან დაკავშირებული ძლიერი შფოთვის, დეპრესიული ეპიზოდების სამკურნალოდ, ასევე რეზისტენტული დეპრესიის დროს. ოლანზაპინის პერორალური დოზა არის 2.5-5 მგ დღეში ერთჯერ დაავადების სიმწვავის მიხედვით [162].

გვერდითი ეფექტები

ოლანზაპინით მკურნალობას უკავშირდება შემდეგი გვერდითი ეფექტები: თავბრუსხვევა, აკათიზია, პოსტურალური ჰიპოტენზია, ძილიანობა, აღფლავება, წონის მატება. ასევე გამოვლენილია პლაზმაში პროლაქტინის კონცენტრაციის გამოსატული მატება, რომელიც უმეტეს შემთხვევაში ოლანზაპინის მოხსნის გარეშე უბრუნდება ნორმას. შესაძლოა განვითარდეს პირის სიმშრალე, ყაბზობა. იშვიათად ვლინდება უსიმპტომოდ მიმდინარე ღვიძლის ტრანსამინაზების მატება, ერთეულ შემთხვევაში გლუკოზის დონის ზრდა ან ეოზინოფილია [8, 121, 193].

ტოქსიკოლოგია

ოლანზაპინის გამოყენებისას დაფიქსირებულია ჰიპერგლიკემიის, კეტოაციდოზის და გარდაცვალების შემთხვევები. ოლანზაპინის ერთჯერადი დოზა 10 მგ ტოქსიურია 12 წლამდე ბავშვებისთვის, ხოლო 25 მგ მოზარდებში 12 წლის ზემოთ. მაღალია გარდაცვალების რისკი ხანდაზმულ პაციენტებში დემენციასთან დაკავშირებული ფსიქოზით, რომლებიც მკურნალობენ ოლანზაპინით. პლაცებო კონტროლირებადი კვლევების მიხედვით 1.7 ჯერ მეტი

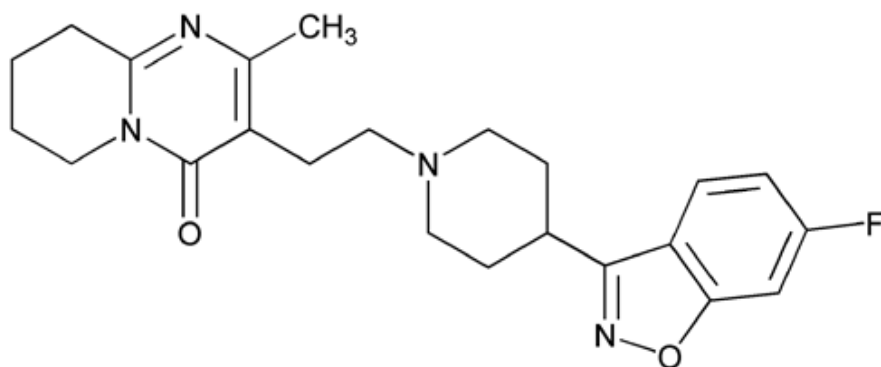
იყო გარდაცვალების ფაქტები პაციენტებში, რომლებიც მკურნალობდნენ ოლანზაპინით ვიდრე პლაცებო ჯგუფში [167, 55].

აშშ-ს მოწამელების მონაცემთა ეროვნული სისტემის მიხედვით (National Poison Data System) 2010 წელს დაფიქსირებულია ოლანზაპინით გარდაცვალების 445 ფაქტი [34]. კვლევების მიხედვით, რომელიც ჩატარებული იყო აშშ-ს უსაფრთხო სამკურნალო პრაქტიკის ინსტიტუტის მიერ (Institute for Safe Medication Practices, USA) 8 წლის განმავლობაში დაფიქსირდა 4110 სერიოზული გვერდითი ეფექტი და 1001 სიკვდილის შემთხვევა, რომელიც გამოწვეული იყო ოლანზაპინის გამოყენების შედეგად [162, 165].

რისპერიდონი

რისპერიდონი წარმოადგენს ბენზოქსაზოლის ნაწარმ ნივთიერებას. ქიმიური დასახელება არის 3-[2-[4-(6-ფტორ - 1,2-ბენზოქსაზოლ-3-ილ)პიპერიდინ-1-ილ]ეთილ]-2-მეთილ-6,7,8,9-ტეტრაჰიდრო-4H-პირიდო[1,2-a] პირიმიდინ-4-ონი. მისი მოლეკულური ფორმულაა $C_{23}H_{27}FN_4O_2$, მოლეკულური მასა 410.48. სტრუქტურული ფორმულა მოცემულია №5 სურათზე. რისპერიდონი არის თეთრი ფერის ფხვნილი, პრაქტიკულად უხსნადია წყალში, იხსნება მეთილენკლორიდში, მეთანოლში, 0.1 N ქლორწყალბადმუავაში [64].

რისპერიდონის შემცველი პრეპარატი პირველად შემუშავებული იქნა Janssen Pharmaceutica -ს მიერ. აშშ-ს საკვებისა და მედიკამენტების ადმინისტრაციამ 1994 წელს დაარეგისტრირა შიზოფრენიის, ხოლო მოგვიანებით კი ბიპოლარული მანიის სამკურნალოდ [191].



სურათი 5: რისპერიდონის სტრუქტურული ფორმულა

რისპერიდონი საქართველოში იწარმოება სედარექსის (GM Pharmaceuticals) სახელწოდებით. ასევე საქართველოში რეგისტრირებულია სხვადასხვა მედიკამენტები რისპერიდონის შეცველობით, მათ შორის არის: რისპოლუქსი (Lek, სლოვენია), APO-რისპერიდონი (Apotex, კანადა), როსტალექტ-როტა (Biofarma, თურქეთი), საერთო ჯამში 25 პოზიცია, სურათი 6, 7 [11].



სურათი 6: რისპერიდონის ტაბლეტები



სურათი 7: რისპერიდონის წამლის ფორმები

მოქმედების მექანიზმი

რისპერიდონს სხვა ძირითადი ატიპიური საშუალებებისაგან განსხვავებით გააჩნია მაღალი აფინურობა (K_i 0.12-7.3nM) 5HT₂, D₂, α_1 და α_2 ადრენერგული და H₁ ჰისტამინური რეცეპტორების მიმართ. პრეპარატს ახასიათებს “ძლიერი შეკავშირება” და შესაბამისად უფრო მეტია ექსტრაპირამიდული სიმპტომების განვითარების ალბათობა მაღალი დოზების მიღებისას ვიდრე სხვა საშუალებების შემთხვევაში, რომელთაც ახასიათებთ “სუსტი შეკავშირება”.

პრეპარატის თერაპიული მოქმედება შიზოფრენიის დროს მიიღწევა დოფამინის 2 ტიპის (D₂) და სეროტონინის 2 ტიპის (5HT₂) რეცეპტორების ანტაგონიზმით. კლინიკური ეფექტი განპირობებულია რისპერიდონისა და მისი მთავარი მეტაბოლიტის, 9-ჰიდროქსირისპერიდონის კომბინირებული კონცენტრაციებით.

რისპერიდონს გააჩნია ზომიერი აფინურობა (K_i 47-253nM) სეროტონინის 5HT_{1C}, 5HT_{1D} და 5HT_{1A} რეცეპტორების მიმართ. იგი სუსტი აფინურობით (K_i 620-800nM) უკავშირდება დოფამინის D₁ რეცეპტორებს და ჰალოპერიდოლის მიმართ მგრძობიარე შეკავშირების ადგილებს. არ ახასიათებს აფინურობა M ქოლინერგული ან β_1 და β_2 ადრენერგული რეცეპტორების მიმართ [15, 83].

ფარმაკოკინეტიკა

შეწოვა

რისპერიდონი კარგად შეიწოვება. პერორალურად მიღების შემდეგ, აბსოლუტური ბიოშედწევადობა შეადგენს 70%-ს (CV=25%). ხსნარის ან ტაბლეტის პერორალურად მიღების შემდეგ პლაზმაში რისპერიდონის საშუალო მაქსიმალური კონცენტრაცია ფიქსირდება 1 საათში. 9-ჰიდროქსირისპერიდონი მაქსიმალურ კონცენტრაციას აღწევს დაახლოებით 3 საათში ძლიერი მეტაბოლიზმის მქონე პირებში და 17 საათში სუსტი მეტაბოლიზმის მქონე პირებში. რისპერიდონის წონასწორული კონცენტრაცია მიიღწევა 1 დღეში ძლიერი მეტაბოლიზმის მქონე პირებში და დაახლოებით 5 დღეში სუსტი მეტაბოლიზმის მქონე პირებში. 9-ჰიდროქსირისპერიდონის წონასწორული კონცენტრაცია მიიღწევა 5-6 დღეში (ძლიერი მეტაბოლიზმის მქონე პირებში). საკვები არ ახდენს გავლენას რისპერიდონის შეწოვის სიჩქარეზე [170, 171].

განაწილება

რისპერიდონი სწრაფად ნაწილდება, განაწილების მოცულობა შეადგენს 1-2ლ/კგ. პლაზმაში რისპერიდონი უკავშირდება ცილას და α_1 -მუავა გლიკოპროტეინს. რისპერიდონის შეკავშირება პლაზმის ცილებთან შეადგენს 90%-ს, ხოლო მისი მთავარი მეტაბოლიტის 9-ჰიდროქსირისპერიდონის შემთხვევაში კი 77%-ს [82, 192]

მეტაბოლიზმი

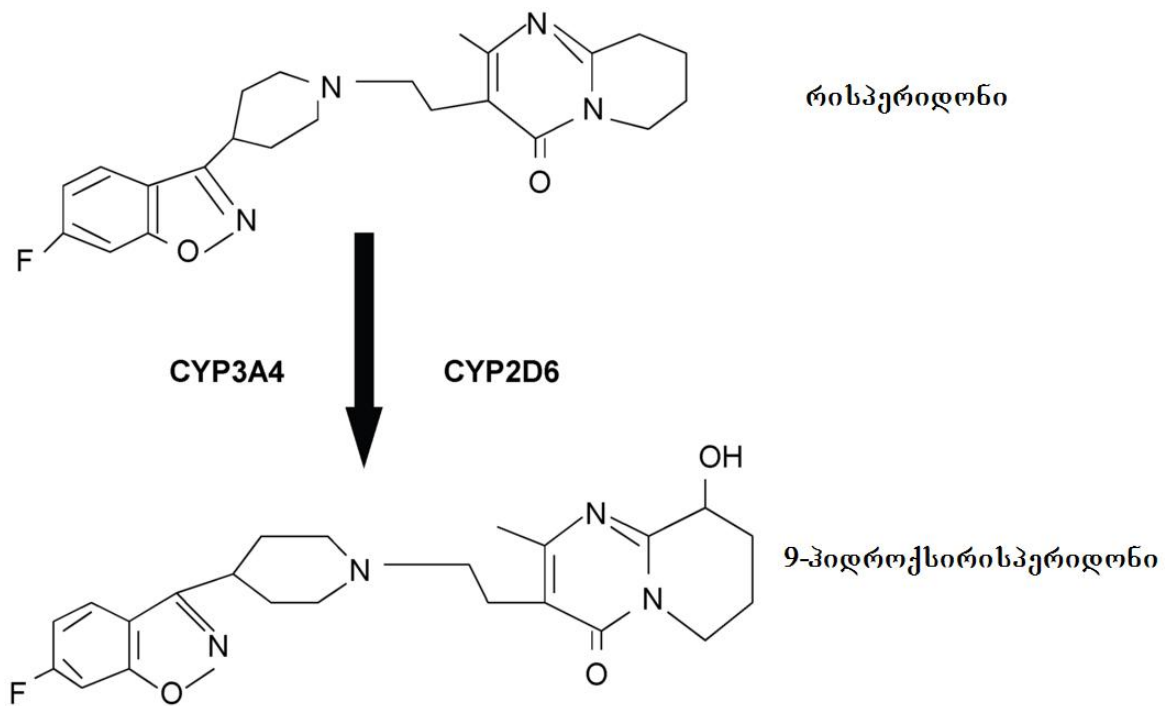
რისპერიდონი აქტიურად მეტაბოლიზდება ღვიძლში. მთავარ მეტაბოლურ გზას წარმოადგენს რისპერიდონის 9-ჰიდროქსირისპერიდონად ჰიდროქსილიზაცია ფერმენტი CYP2D6 მეშვეობით. მეორეხარისხოვანი მეტაბოლური გზა არის N-დეზალკილირება (სურათი 8). მთავარ მეტაბოლიტს 9-ჰიდროქსირისპერიდონს გააჩნია რისპერიდონის მსგავსი ფარმაკოლოგიური მოქმედება.

რისპერიდონს ახასიათებს პრეპარატებთან ურთიერთქმედების ორი ტიპი. პირველი, CYP2D6 ინჰიბიტორები ხელს უშლიან რისპერიდონის 9-

ჰიდროქსირისპერიდონად გარდაქმნას. მეორე, ფერმენტის მაინდუცირებელ საშუალებებთან (მაგ: კარბამაზეპინი, ფენიტონი, რიფამპიცინი და ფენობარბიტალი) ერთად რისპერიდონის გამოყენებისას შესაძლოა აღინიშნოს რისპერიდონის და 9-ჰიდროქსირისპერიდონის კომბინირებული პლაზმური კონცენტრაციის შემცირება. ასევე რისპერიდონმა შესაძლოა შეაფერხოს სხვა პრეპარატების მეტაბოლიზმი, რომლებიც მეტაბოლიზდებიან CYP2D6-ით [97, 153, 172].

გამოყოფა

რისპერიდონი და მისი მეტაბოლიტები გამოიყოფიან შარდით და შედარებით ნაკლები მოცულობით ფეკალიებით. რისპერიდონის ნახევარ-გამოყოფის პერიოდი არის 3სთ (CV=30%) ძლიერი მეტაბოლიზმის მქონე პირებში და 20სთ (CV=40%) სუსტი მეტაბოლიზმის მქონე პირებში. 9-ჰიდროქსირისპერიდონის ნახევარ-გამოყოფის პერიოდი შეადგენს დაახლოებით 21 საათს (CV=20%) ძლიერი მეტაბოლიზმის მქონე პირებში და 30 საათს (CV=25%) სუსტი მეტაბოლიზმის მქონე პირებში [93, 159].



სურათი 8: რისპერიდონის მეტაბოლიზმის სქემა

დოზირება

რისპერიდონი იწარმოება 0.5 მგ, 1 მგ, 2 მგ, 3 მგ და 4 მგ ტაბლეტების, ასევე პერორალური სუსპენზიის, პირის ღრუში ხსნადი ტაბლეტების და ხანგრძლივ მოქმედი საინექციო საშუალების სახით. გახანგრძლივებული მოქმედების წამლის ფორმა შედგება რისპერიდონის შემცველი პოლიმერული მიკროგრანულებისაგან, რომელიც ინექციის წინ იხსნება წყლიან გამხსნელებში. მედიკამენტის საინექციო ფორმას აქვს ფიქსირებული დოზები 25 მგ, 37.5 მგ და 50 მგ. ინექციის შეყვანის შემდეგ მიკროგრანულები რისპერიდონის გამოთავისუფლებას იწყებენ 3-4 კვირაში და კონცენტრაცია ნარჩუნდება დაახლოებით 4 კვირა.

რეკომენდებული დღიური დოზები: მოზრდილები 2 მგ - 16 მგ, მოზარდები 0.5 მგ- 6 მგ. თირკმლის ან ღვიძლის მწვავე უკმარისობისას მოზრდილებში გამოიყენება მინიმალური საწყისი დოზა 0.5 მგ დღეში ორჯერ. 1.5 მგ-ზე (დღეში ორჯერ) ზემოთ დოზის გაზრდა შესაძლებელია ერთ კვირიანი ინტერვალით [9, 75].

გვერდითი ეფექტები

კლინიკურ კვლევებში ყველაზე მეტად ($\geq 5\%$ და ორჯერ მეტი ვიდრე პლაცებოს შემთხვევაში) გამოვლინდა პარკინსონიზმის მსგავსი მოვლენები, აკათიზია (მოუსვენრობა მუდმივი მოძრაობისაკენ სწრაფით), დისტონია, კანკალი, სედაცია, თავბრუსხვევა, აღელვება, მხედველობის დაბინდვა, გულისრევა, დებინება, ეპიგასტრული ტკივილი, დისკომფორტი კუჭის არეში, დისპეფსია, ფაღარათი, ჭარბი ნერწყვიანობა, ყაბზობა, პირის სიმშრალე, მადის და წონის მომატება, დაღლილობა, გამონაყარი, ზედა სასუნთქი გზების ინფექციები, ნაზოფარინგიტი და ხახა-ხორხის ტკივილი. სხვა ატიპიურ ანტიფსიქოზური საშუალებების მსგავსად, რისპერიდონსაც ახასიათებს ჰიპერგლიკემიის, დიაბეტური კეტოაციდოზის, დემენციის ფონზე განვითარებული ფსიქოზის მქონე ხანდაზმულ პაციენტებში სიკვდილიანობის მომატებული რისკი [129, 161].

ტოქსიკოლოგია

ლიტერატურის წყაროებში აღწერილია რისპერიდონით მწვავე მოწამვლის შემთხვევები, რომელიც გამოწვეულია გვერდითი ეფექტებით, როგორცაა QT

ინტერვალის გაზრდა, ავთვისებიანი ნეიროლეპტიური სინდრომი. ასევე ფიქსირდება გარდაცვალების შემთხვევები, რომლებიც გამოწვეულია სინუსური ბრადიკარდიით და ვენტრიკულარული არითმიით. ფიქსირდება მწვავე მოწამვლის შემთხვევები რისპერიდონის გამოყენებისას სუიციდის მიზნით, რომელიც ხშირად მთავრდება ლეტალური შედეგით. სუიციდის შემთხვევები ძირითადად ფიქსირდება პაციენტებში, რომლებიც მკურნალობენ რისპერიდონით. მედიკამენტების არასისტემური გამოყენება ან მოხსნა იწვევს დაავადების გამწვავებას და თვითმკვლელობის მცდელობას [16, 174, 211].

აშშ საკვების და მედიკამენტების ადმინისტრაციის მიერ, გვერდითი ეფექტების ანგარიშის სისტემაში გამოქვეყნებულია მონაცემები 1993-2008 წლებში რისპერიდონის გამოყენებისას გვერდითი ეფექტების და გარდაცვალების ფაქტების შესახებ (ცხრილი 7) [67]

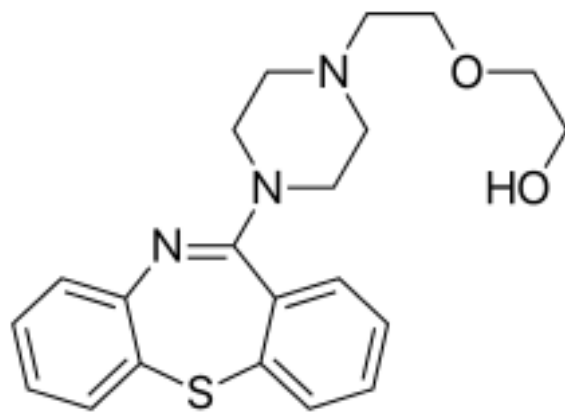
ცხრილი 7: გვერდითი ეფექტების და გარდაცვალების მონაცემები რისპერიდონის გამოყენებისას

ასაკი	სერიოზული გვერდითი ეფექტები	გარდაცვალების შემთხვევა
პედიატრიული	1207	48
მოზრდილი	11029	2035
უცნობი ასაკი	2867	530
ყველა ასაკი	15103	2613

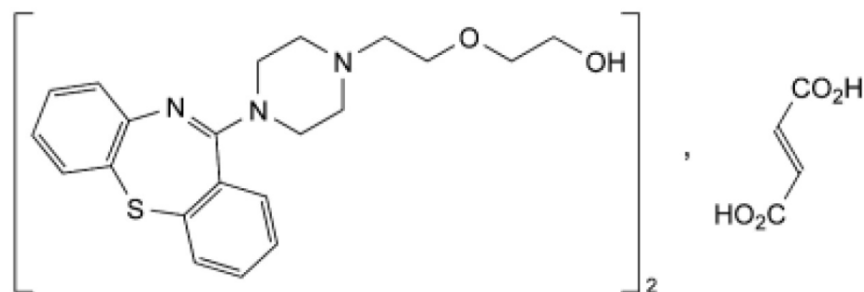
ქვეტიაპინი

ქვეტიაპინი (სურათი 9) წარმოადგენს მეორე თაობის ანტიფსიქოზურ საშუალებას, რომელიც მიეკუთვნება დიბენზოლიაზეპინის წარმოებულს. ქიმიური ფორმულა არის 2-[2-(4-დიბენზო *[b,f]*) [1,4] თიაზეპინ-11-yl-1-პიპერაზინილ) ეტოქსი-ეთანოლ. მისი მოლეკულური ფორმულაა $C_{21}H_{25}N_3O_2S$ მოლეკულური მასა არის 383.51. წამლის ფორმების შემადგენლობაში ქვეტიაპინი წარმოდგენილია ფუმარატის მარილის სახით (სურათი 10), ქიმიური ფორმულა: ბის[2-[2-(4-

დიბენზო [b,f] [1,4] თიაზეპინ-11-yl]პიპერაზინ-1-yl]ეტოქსი]-ეთანოლ] (2)-ბუთ-2-ენდიოატი, მოლეკულური ფორმულაა $C_{46}H_{54}N_6O_5S_2$, მოლეკულური მასა 883. ქვეტიაპინის ფუმარატი წარმოადგენს თეთრ-მოკრემისფრო კრისტალურ ფხვნილს, რომელიც ზომიერად იხსნება წყალში, ეთანოლში და მეთანოლში [62]. ქვეტიაპინი შეიმუშავა კომპანია AstraZeneca 1992-1996 წწ, რომელიც იწარმოება Seroquel®-ის სახელით. ქვეტიაპინის ტაბლეტები 1997 წელს აშშ-ს საკვების და მედიკამენტების სააგენტოს მიერ დარეგისტრირდა შიზოფრენიის და მოგვიანებით კი მწვავე ბიპოლარული მანიის სამკურნალოდ. საქართველოში ქვეტიაპინი რეგისტრირებულია სხვადასხვა სავაჭრო სახელწოდებით: კეტიაპი (Polpharma, პოლონეთი), კეტილეპტი (Egis, უნგრეთი), ქვეტიაპინის ფუმარატი ტაბლეტები (Apotex, კანადა), საერთო ჯამში 20 პოზიცია, სურათი 11-12 [11, 160].



სურათი 9: ქვეტიაპინის სტრუქტურული ფორმულა



სურათი 10: ქვეტიაპინის ფუმარატის სტრუქტურული ფორმულა



სურათი 11: ქვეტიაპინის ტაბლეტები



სურათი 12: ქვეტიაპინის წამლის ფორმები

მოქმედების მექანიზმი

ქვეტიაპინის ეფექტს შიზოფრენიის, ბიპოლარული დეპრესიის და მანიის შემთხვევაში განაპირობებს დოფამინის ტიპი 2 (D₂) და სეროტონინის ტიპი 2 (5HT₂) რეცეპტორებზე კომბინირებული ანტაგონიზმი.

ქვეტიაპინი წარმოადგენს თავის ტვინის სხვადასხვა ნეირორეცეპტორის ანტაგონისტს: სეროტონინის 5HT_{1A} და 5HT₂ (IC_{50s}=717 და 1485მ), დოფამინის D₁ და D₂ (IC_{50s}=1268 და 3296მ), ჰისტამინური H₁ (IC₅₀=306მ) α₁ და α₂ ადრენერგული რეცეპტორები (IC_{50s}=94 და 2716მ). ქვეტიაპინს არ ახასიათებს მნიშვნელოვანი აფინურობა M ქოლინერგული და ბენზოდიазეპინის რეცეპტორების მიმართ (IC_{50s}>50006მ) [4, 127].

ფარმაკოკინეტიკა

შეწოვა

ქვეტიაპინის ფუმარატი სწრაფად შეიწოვება პერორალურად მიღების შემდეგ, პლაზმაში მაქსიმალური კონცენტრაცია მიიღწევა 1.5სთ-ში [181].

განაწილება

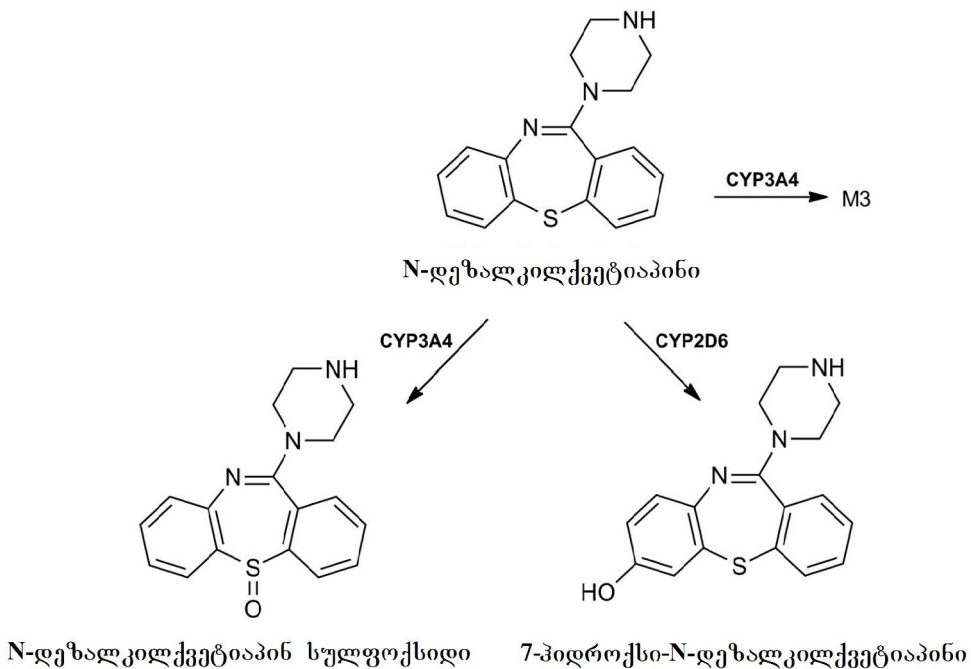
ქვეტიაპინი კარგად ნაწილდება მთელს ორგანიზმში, განაწილების მოცულობა

შეადგენს 10 ± 4 ლ/კგ-ს. თერაპიული კონცენტრაციის შემთხვევაში 83%-ით უკავშირდება პლაზმის ცილებს. [40].

მეტაბოლიზმი და გამოყოფა

დოზის დაახლოებით 73% და 20% გამოიყოფა შარდში და ფეკალიებში. მეტაბოლიზმის ძირითადი გზა არის სულფოდაქსინგვა მჟავა მეტაბოლიტად; მეტაბოლიტები ფარმაკოლოგიურად არააქტიურია (სურათი 13).

ასაკი: ქვეტიაპინის პერორალური კლირენსი მცირდება 40%-ით ხანდაზმულებში (≥ 65 წელი, $n=9$) ახალგაზრდებთან შედარებით ($n=12$). სქესის მხრივ ქვეტიაპინის ფარმაკოკინეტიკაზე გავლენა არ დაფიქსირებულა [32, 56].



სურათი 13: ქვეტიაპინის მეტაბოლიზმის სქემა

დოზირება

ქვეტიაპინის ფუმარატი ტაბლეტების სახით მიიღება 25-800 მგ/დღეში, მკურნალი ექიმის მიერ შერჩეული სქემით, დაავადების ტიპის და სიმძიმის შესაბამისად [12].

გვერდითი ეფექტები

ქვეტიაპინს ახასიათებს შემდეგი გვერდითი ეფექტები: ავთვისებიანი ნეიროლეპტიური სინდრომი, მოგვიანებითი დისკინეზია, ორთოსტატული ჰიპოტენზია (არტერიული წნევის დაწევა), არტერიული წნევის აწევა,

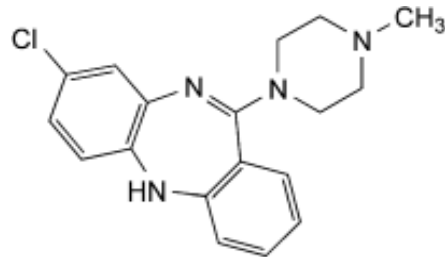
ლეიკოციტების შემცირება, კატარაქტა, კრუნჩხვები, პროლაქტინის დონის მომატება, ღვიძლის ფერმენტების მომატება, ყლაპვის გაძნელება, ძილიანობა, თავბრუსხვევა, სისუსტე, დისპეფსია, წონის მატება, პირის სიმშრალე [5, 44].

ტოქსიკოლოგია

ქვეტიაპინის გამოყენება არ არის დაშვებული დემენციასთან დაკავშირებული ფსიქოზის სამკურნალოდ ხანდაზმულ პაციენტებში, რადგან არსებობს გარდაცვალების მაღალი რისკი. 10 კვირის განმავლობაში ჩატარებულმა პლაცებო კონტროლირებადმა კვლევამ აჩვენა, რომ 1.6 ჯერ მეტია გარდაცვალების რისკი იმ ჯგუფში, რომელშიც პაციენტები მკურნალობდნენ ქვეტიაპინით, ვიდრე პლაცებო ჯგუფში. ასევე არსებობს ქვეტიაპინით ინტოქსიკაციის და სუიციდის შემთხვევები [92, 151, 163].

კლოზაპინი

კლოზაპინი მიეკუთვნება ტრიციკლური ბენზოდიაზეპინების ჯგუფს. ქიმიური დასახელება არის 8-ქლორ-11-(4-მეთილპიპერაზინ-1-yl)-5H-დიბენზო[b,e][1,4]დიაზეპინი. მისი მოლეკულური ფორმულაა $C_{18}H_{19}ClN_4$, მოლეკულური მასა 326,8. სტრუქტურული ფორმულა მოცემულია №14 სურათზე.



სურათი 14: კლოზაპინის სტრუქტურული ფორმულა

კლოზაპინი წარმოადგენს ყვითელ, კრისტალურ ფხენილს, პრაქტიკულად უხსნადია წყალში, ადვილად იხსნება მეთილენქლორიდში, იხსნება ეთანოლში, მეთანოლში და ძმარმუცავში [38]. საქართველოში კლოზაპინი რეგისტრირებულია სხვადასხვა სავაჭრო სახელწოდებით: ლეპონექსი (Novartis, შვეიცარია), ზოპინი (Psychotropics India, ინდოეთი), აზალეპტინი (Arpimed, სომხეთი), საერთო ჯამში 6 პოზიცია, სურათი 15-16 [11].



სურათი 15: კლოზაპინის ტაბლეტები



სურათი 16: კლოზაპინის წამლის ფორმები

მოქმედების მექანიზმი

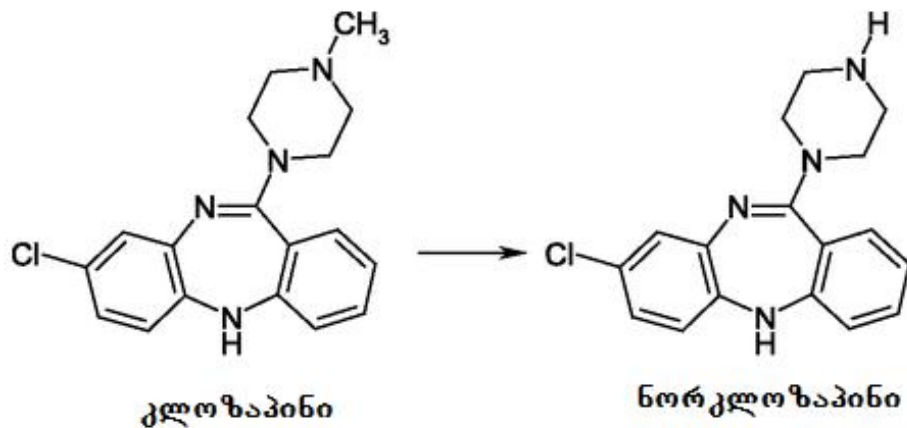
კლოზაპინი განსხვავდება "კლასიკური" ანტიფსიქოზური სამკურნალო საშუალებებისგან. ის ახდენს სუსტ მახლოკირებელ ზემოქმედებას დოფამინურ D1, D2-, D3- და D5-რეცეპტორებზე და არის ძალიან ძლიერი D4 რეცეპტორების ბლოკატორი. გარდა ამისა, ახასიათებს გამოსატული ადრენოლიზური, ანტიქოლინერგული, ანტიჰისტამინური და სეროტონინის საწინააღმდეგო მოქმედება. გააჩნია სწრაფი, გამოსატული სედაციური და ანტიფსიქოზური ეფექტი შიზოფრენიით დაავადებულ პაციენტებში, რომლებიც რეზისტენტულები არიან სხვა ანტიფსიქოზური პრეპარატების მიმართ. შედეგად კლოზაპინი ეფექტურია, როგორც შიზოფრენიის პროდუქტიული, ასევე ამოვარდნის სიმპტომების შემთხვევებში [6, 126, 137].

ფარმაკოკინეტიკა

კლოზაპინის მაქსიმალური პლაზმური კონცენტრაცია მიიღწევა პრეპარატის პერორალური მიღებიდან დაახლოებით 2 საათში. იგი მეტაბოლიზდება

ძირითადად ღვიძლის მიკროსომული ფერმენტებით CYP1A2 და შედარებით ნაკლებად 3A4 და 2D6-ით, საშუალო ნახევარ-გამოყოფის პერიოდი შეადგენს ერთჯერადი დოზის მიღებიდან 8 საათს და განმეორებითი დოზის მიღებიდან 12 საათს. აქტიური მეტაბოლიტი არის ნორკლოზაპინი (სურათი 17).

სისხლში კლოზაპინის კონცენტრაციას მნიშვნელოვნად ამცირებს თამბაქოს მოხმარება და ღვიძლის ფერმენტების სხვადასხვა ინდუქტორები (მათ შორის ფენიტონი და რიფამპიცინი), ხოლო მატებას იწვევს CYP 1A2 და 3A4 ინჰიბიტორები (მაგ: ფლუოქსამინი და ერთრომიციანი). ზოგიერთი შემთხვევაში, თამბაქოს მოხმარების შეწყვეტის შემდეგ შესაძლოა აღინიშნოს სისხლში კლოზაპინის კონცენტრაციის გაორმაგება სედაციის და სხვა გვერდითი ეფექტების გაუარესებით [3, 78, 166].



სურათი 17: კლოზაპინის მეტაბოლიზმის სქემა

დოზირება

პრეპარატის დოზებს ექიმი არჩევს ინდივიდუალურად. თითოეულ პაციენტს უნდა დაენიშნოს მინიმალური ეფექტური დოზა. ჰიპერტენზიის, კრუნჩხვების და სედაციური ეფექტის რისკების შემცირებისათვის აუცილებელია დანაწევრებული დოზირება. დოზა შეიძლება მერყეობდეს 12.5 მგ - 900 მგ დღე-ღამეში. ავადმყოფების უმრავლესობისთვის პრეპარატის ანტიფსიქოზური ეფექტის მისაღწევად შესაძლოა საჭირო გახდეს სადღეღამისო დოზის 300 - 450 მგ რამოდენიმე ეტაპად მიღება. ზოგიერთი პაციენტისათვის შესაძლოა ეფექტური აღმოჩნდეს უფრო დაბალი დოზები, ზოგიერთს კი სჭირდებათ დოზები 600 მგ-მდე დღე-ღამეში. დოზის შემცირება უნდა მოხდეს ეტაპობრივად. შემანარჩუნებელი მკურნალობა უნდა ჩატარდეს არანაკლებ 6 თვე. სადღეღამისო დოზა შეიძლება განაწილდეს რამოდენიმე არათანაბრ მიღებად. უმჯობესია

დოზის დიდი ნაწილის დანიშვნა ძილის წინ. აუცილებელია ცვლილების მოხდენა კლოზაპინთან დოზირების სქემაში თუ პაციენტები იყენებენ პრეპარატებს, როგორცაა ბენზოდიაზეპინები ან სეროტონინის უკუშეზღვევის სელექტიური ინჰიბიტორები [17, 21, 24, 37, 25].

გვერდითი ეფექტები

კლოზაპინთან დაკავშირებულ, ყველაზე სერიოზულ გვერდით ეფექტს წარმოადგენს აგრანულოციტოზი, კრუნჩხვები, გულ-სისხლძარღვთა სისტემის გართულებები, ციებ-ცხელება, ძილიანობა/სედაციური ეფექტი, თავბრუსხვევა, ტაქიკარდია, ყაბზობა და ჰიპერსალივაცია [6, 157].

ტოქსიკოლოგია

ხშირად კლოზაპინით მკურნალობისას მოსალოდნელია პოტენციურად სერიოზული გვერდითი ეფექტები (მაგ: აგრანულოციტოზი, კრუნჩხვები) და შესაბამისად პრეპარატის დანიშვნისას ყურადღებით უნდა შეფასდეს მოსალოდნელი რისკი და სარგებელი. ფინეთში 2 თვიანი პერიოდის განმავლობაში დაფიქსირდა სისხლის მაჩვენებლებთან დაკავშირებული მწვავე დარღვევების 18 შემთხვევა (9 ფატალური). აგრანულოციტოზს უკავშირდებოდა სიკვდილის 8 შემთხვევა, ხოლო მეცხრე სავარაუდოდ გამოწვეული იყო ლეიკემიით. კლოზაპინის გამოყენებისას მიოკარდიტი არის მნიშვნელოვანი გვერდითი ეფექტი. კლოზაპინით მკურნალობისას ფიქსირდება პაციენტების სუნთქვის უკმარისობით გამოწვეული გარდაცვალების შემთხვევები. კვლევაში კლოზაპინით მკურნალობისას 503 პაციენტიდან დაფიქსირდა 29 ფატალური შემთხვევა [23, 48, 57].

ზოგიერთ ქვეყანაში კლოზაპინი შეტანილია ფსიქოტროპული და ნარკოტიკული საშუალებების სპეციალურ სიაში, რადგანაც ხშირია კლოზაპინით კრიმინალური მოწამელის ფაქტები. მაგალითისთვის, რუსეთის ფედერაციაში კლოზაპინით კრიმინალური მოწამელა არის პირველ ადგილზე, ყველა სხვა საშუალებას შორის. 2003-2006 წლის მონაცემებით კრიმინალური მოწამელების 99.7%-ში გამოიყენებოდა კლოზაპინი. აღნიშნული ფაქტების სტატისტიკა მზარდია, რომელიც 20-ჯერ გაიზარდა წინა წლებთან შედარებით [108, 112, 18].

2.5 ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიურ ანალიზში გამოყენებული ექსტრაქციის მეთოდები

ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზის დროს განსაკუთრებული მნიშვნელობა ენიჭება ბიოლოგიური ობიექტებიდან (სისხლი, შარდი, პლაზმა) და სხვადასხვა საგანმატარებლებიდან (ცარიელი ბლისტერი, კოლოფი, ფლაკონი, ანაწმენდი) იზოლირების მეთოდების შემუშავებას. ვინაიდან, საკვლევი ნივთიერების ექსტრაქცია ხდება რთული შემადგენლობის სხვადასხვა ბიოლოგიური მატრიცებიდან და ობიექტებიდან, მიღებული გამონაწველი უნდა იყოს მაქსიმალურად გასუფთავებული, რომ არ მოხდეს საკვლევი ნივთიერების მინორული რაოდენობის გადაფარვა მატრიცაში არსებული სხვადასხვა მინარევებით. იზოლირების პირობების შერჩევასას გასათვალისწინებელია საკვლევი ნივთიერების და მინარევების რაოდენობრივი თანაფარდობა [1, 138].

ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზის დროს საკვლევი ნივთიერებების იზოლირებისათვის ძირითადად გამოიყენება სითხე-სითხე და მყარფაზური ექსტრაქცია.

2.5.1 სითხე-სითხე ექსტრაქცია

სითხე-სითხე ექსტრაქცია ემყარება საკვლევი ნივთიერებათა სხვადასხვაგვარ ხსნადობას ორ შეურევად ფაზაში, რომელთაგან ერთი საანალიზო მატრიცაა, მეორე კი შერჩეული ორგანული გამხსნელი. სითხე-სითხე ექსტრაქცია იზოლირების ერთ-ერთი ყველაზე ძველი მეთოდია, რომელიც ეფუძნება განსაცალკევებელი კომპონენტების განსხვავებულად განაწილებას ორ სითხურ ფაზას შორის. ექსტრაგირების დროს სითხეები არ უნდა შეერიოს ან შესაძლებელია ნაწილობრივ შეერიოს ერთმანეთს. ექსტრაქციის დროს ადგილი რომ არ ქონდეს დისპერსიას სითხეებს უნდა ჰქონდეთ ურთიერთგანსხვავებული სიმკვრივეები. სითხე-სითხის ექსტრაქცია წარმოადგენს უპირატეს მეთოდს, როდესაც დისტილაცია არაეფექტურია. იზოლირების პროცესი ვარირებს მარტივი, ერთ ეტაპიანი ექსტრაქციიდან რთულ, რამოდენიმე ეტაპიან ექსტრაქციამდე [49, 119, 164].

გამხსნელის შერჩევა

ექსტრაქცია ეფუძნება ნაერთების ფიზიკურ და ქიმიურ თვისებებს. სითხე-სითხე ექსტრაქციის პროცესში გამოყენებული გამხსნელები ისე უნდა იყოს შერჩეული, რომ ნივთიერება მაქსიმალურად გადავიდეს გამხსნელში. იგი არ უნდა იყოს

საექსტრაქციო სითხესთან შერევადი და უნდა ჰქონდეს მაღალი აფინურობა თხევადი ნივთიერების მოლეკულებისადმი.

სითხე-სითხის ექსტრაქციისათვის იდეალურ გამსხნელი უნდა აკმაყოფილებდეს შემდეგი მოთხოვნებს:

- წარმოადგენდეს კარგ გამსხნელს საანალიზო ნივთიერებისათვის.
- მნიშვნელოვანად განსხვავებული სიმკვრივე ხსნართან შედარებით.
- რეზისტენტულობა თერმული დეგრადაციის მიმართ;
- ინდიფერენტულობა ექსტრაქციის პროცესში მონაწილე ნივთიერებებთან.
- დუდილის მაღალი ტემპერატურა.
- დაბალი სიბლანტე.
- ნაკლებად ტოქსიკური.
- რეგენერაციის უნარი.
- არაააღებადი.
- არ უნდა ახასიათებდეს კოროზიული მოქმედება პროცესის დროს გამოყენებულ აღჭურვილობაზე.
- დაბალი ფასი.
- ნაკლებად იწვევდნენ გარემოზე ეკოლოგიური თვალსაზრისით ურყოფით ზეგავლენას.
- ფაზებს შორის განსახვავებული ზედაპირული დაჭიმულობა.

გასათვალსწინებელია, რომ ხშირ შემთხვევაში ექსტრაგენტს არ გააჩნია გამსხნელისათვის დამახასიათებელი იდეალური კრიტერიუმები, შესაბამისად საჭიროა კონკრეტული შემთხვევისათვის შერჩეული იქნეს ოპტიმალური გამსხნელი [2, 50, 114, 124, 143, 199].

სითხე-სითხე ექსტრაქციისათვის მოწოდებულია შემდეგი ორგანული გამსხნელები ტეტრაბუთილ მეთილის ეთერი, დიქლორმეთანი, ქლოროფორმი, ეტილაცეტატი, ჰექსანი, მეთანოლი, N-ჰექსანი, იზოამილის სპირტი და სხვა [58, 116].

2.5.2 მყარფაზური ექსტრაქცია

მყარფაზური ექსტრაქცია წარმოადგენს იზოლირების პროცესს, რომელის დროსაც ხდება საანალიზო ნიმუშის გასუფთავება და წინასწარი კონცენტრირება. მეთოდი დაფუძნებულია სორბციის ან იონცვლითი პროცესების გაველენით სამიზნე ნივთიერების განაწილებაზე მყარ სორბენტსა და თხევად მოძრავ ფაზას შორის [215].

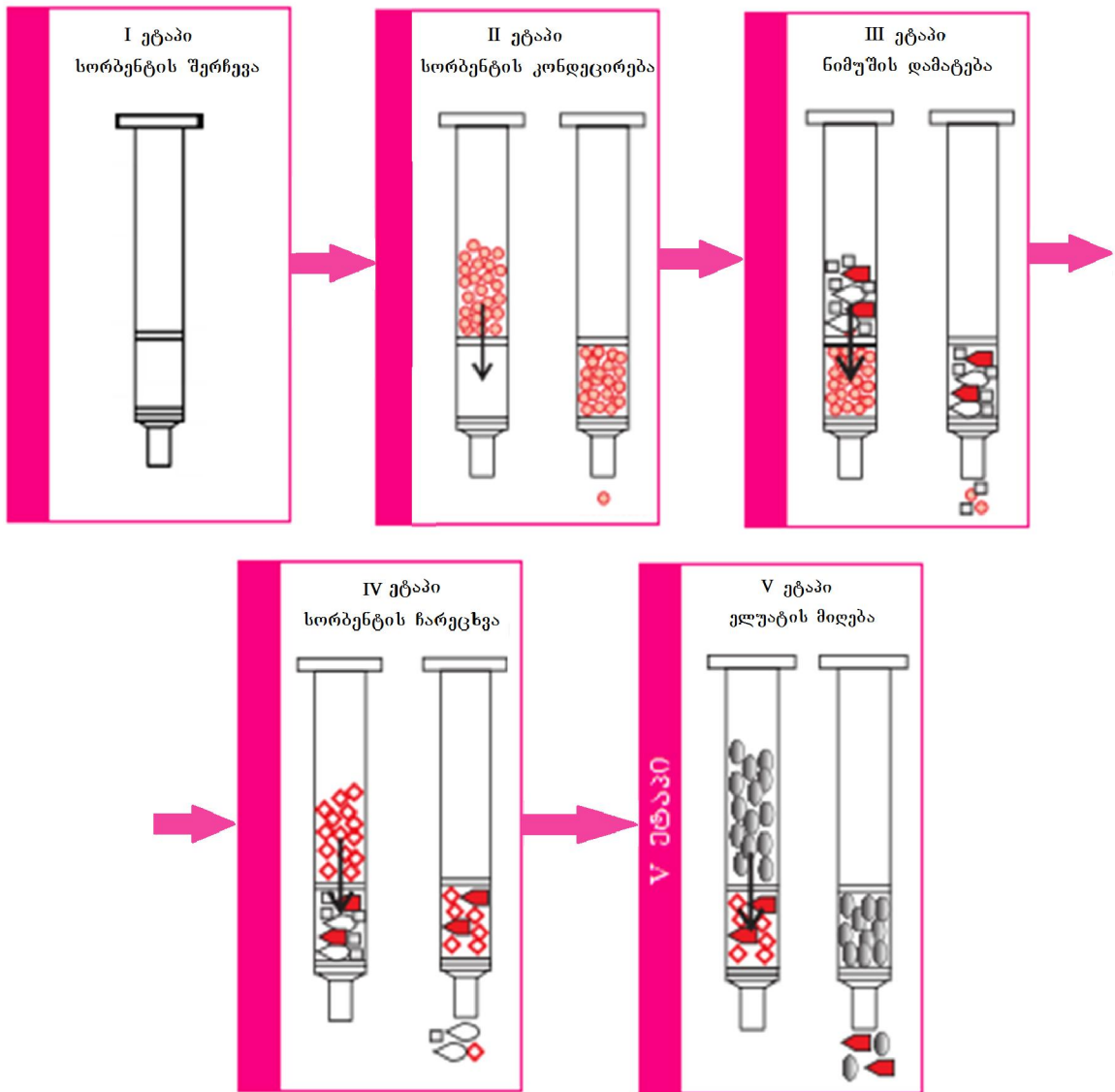
უკანასკნელი 20 წლის განმავლობაში, საანალიზო ნიმუშის მომზადებისას მყარფაზური ექსტრაქცია გახდა ყველაზე ეფექტური მეთოდი საკვლევი ნივთიერების სწრაფი და მიზანმიმართული იზოლირებისათვის. მყარფაზური ექსტრაქცია უზრუნველყოფს თვისობრივ-რაოდენობრივი ანალიზის ეფექტურად ჩატარებას და ქრომატოგრაფირების აპარატურის ხანგრძლივ ექსპლუატაციას. ასევე სითხე-სითხე ექსტრაქციასთან შედარებით მყარფაზური ექსტრაქცია გამოირჩევა რიგი უპირატესობით, როგორცაა ფაზათა სრული დაყოფა, ექსტრაგენტის მცირე მოცულობა, სელექციურობა, ექსპრესულობა, საანალიზო ნიმუშის მცირე მოცულობა.

მყარფაზური ექსტრაქცია ძირითადად ეფექტურია არააქროლადი და ნაკლებად აქროლადი თხევადი საანალიზო ნივთიერებების და გახსნილ მდგომარეობაში მყოფი მყარი საანალიზო ნივთიერების იზოლირებისათვის [196, 210, 216].

არჩევენ შემდეგი სახის მყარფაზურ ექსტრაქციებს:

- *რევერსული* - დაფუძნებულია პოლარული მატრიცის (საანალიზო ნიმუშის) და არაპოლარული მყარი ფაზის ურთიერთქმედებაზე.
- *ნორმალური* - დაფუძნებულია პოლარული მატრიცის და არაპოლარული მოდიფიცირებული მყარი ფაზის ურთიერთქმედებაზე.
- *იონცვლითი* - დაფუძნებულია ნივთიერების (საკვლევი ობიექტი) და აბსორბენტის დამუხტული ჯგუფების ელექტროსტატიკურ მიზიდულობაზე.
- *აბსორბირებადი* - საკვლევი ნივთიერებებისა და არამოდიფიცირებული მყარ ფაზის ურთიერთქმედებაზე [42, 150].

მყარფაზური ექსტრაქცია ძირითადად შედგება ხუთი ეტაპისაგან, იხილეთ სურათი 18.



სურათი 18: მყარფაზური ექსტრაქციის ეტაპები

მყარფაზური ექსტრაქციისათვის გამოიყენება სხვადასხვა ტიპის სორბენტი (კარტიჯები), როგორც არის C-18, LC-8, ENVI-8, LC-4, LC-Ph, Hisep™, LC-CN, LC-Diol, LC-NH₂, LC-SAX, LC-SCX და სხვა. სორბენტი წინასწარი შერჩევა ხდება იმის მიხედვით, თუ რა ტიპის საანალიზო ნივთიერება არის ექსტრაგირების ობიექტი [190].

2.6 ქრომატომასსპექტრომეტრული ანალიზის მეთოდების მნიშვნელობა ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიურ ექსპერტიზაში

ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ექსპერტიზის ძირითადი მიზანია მედიკამენტების ან მომწამვლელი ნივთიერებების არსებობის გამოვლენა და ამ ნივთიერების რაოდენობრივი განსაზღვრა სხვადასხვა ბიოლოგიურ ობიექტებში და საგანმატარებელზე. ანალიზის შესასრულებლად გამოიყენება სხვადასხვა სკრინინგ მეთოდები, მაგარამ შედეგების დასადასტურებლად და რაოდენობრივი განსაზღვრის მაღალი სანდოობისთვის ფართოდ არის გამოყენებული მასსპექტრომეტრია [7, 54].

მასსპექტრომეტრია სპექტრალური მეთოდია, რომლითაც შესაძლებელია გამოსაკვლევი ნივთიერების მოლეკულის და მისი ფრაგმენტების მასური რიცხვის და მოლეკულის ქიმიური სტრუქტურის განსაზღვრა. მას-სპექტრზე მიღებული პიკი ასახავს მთლიანი მოლეკულის და მისი ფრაგმენტების ანიონების მასას. მასსპექტრომეტრია შესაძლებელია გამოყენებული იყოს როგორც განცალკევებით, ასევე სითხურ ან გაზურ ქრომატოგრაფიასთან ტანდემში. მასსპექტრომეტრის დანერგვა სასამართლო ქიმიურ ექსპერტიზაში იყო რევოლუციური ნაბიჯი, რომელმაც გადაჭრა ბევრი, ამ დარგში დასახული პრობლემები და ამოცანები [14, 41].

ვინაიდან სასამართლო ქიმიური ექსპერტიზის შემთხვევაში საკვლევი ობიექტების წარმოადგენს რთულ კომპლექსურ მატრიცას, მნიშვნელოვანია საკვლევი ნივთიერებების ეფექტური დაყოფა, რისთვისაც გამოიყენება სითხური ან გაზური ქრომატოგრაფია. ქრომატოგრაფირების დროს დაყოფა ეფუძნება ნივთიერების შედარებით ხსნადობას მოძრავ და მყარ ფაზაში. ქრომატოგრაფირების დროს შესაძლოა გამოყენებული იყოს სხვადასხვა ტიპის დეტექტორი, მაგრამ მასსპექტრომეტრით დეტექტირებას გააჩნია მაღალი სპეციფიურობა და სელექციურობა. გაზურ ქრომატოგრაფია მასსპექტრომეტრით (GC/MS) წარმოადგენს დამადასტურებელი ანალიზის უპირატეს მეთოდს, ხოლო სითხური ქრომატოგრაფია მასსპექტრომეტრით (LC/MS) განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია საკვლევი ნივთიერების რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის. სასამართლო ექსპერტიზის და კლინიკურ ლაბორატორიებში გაზური ქრომატოგრაფია მასსპექტრომეტრია სიმარტივის, სიზუსტის, მგრძობელობის და უნივერსალობის გამო წარმოადგენს დამადასტურებელი კვლევების “ოქროს სტანდარტს” [52, 152].

სხვადასხვა ტიპის ლაბორატორიებში გაზური ქრომატოგრაფია მასსპექტრომეტრული (GC/MS) მეთოდის გამოყენების რამოდენიმე მიზეზი არსებობს, როგორც არის ელექტრონული იონიზაცია (EI), რომელიც იძლევა სტრუქტურულ ინფორმაციას საკვლევ ნივთიერებაზე. ასევე არსებობს ძიების ფუნქციის მქონე სპექტრალური ბიბლიოთეკა, რომლის საშუალებითაც შესაძლებელია საკვლევ ნივთიერებების იდენტიფიკაცია. თუმცა GC/MS-ის გამოყენება პოლარული და თერმოლაბილური საკვლევ მასალის ანალიზისათვის გარკვეულწილად შეზღუდულია, ასევე საჭიროა დერივატიზაცია ნიმუშის აქროლების ხარისხის გაზრდის მიზნით [27].

სითხური ქრომატოგრაფია მასსპექტრომეტრია (LC/MS) შესაძლებელია გამოვიყენოთ როგორც დამადასტურებელი ანალიზისათვის, ასევე საკვლევ ნივთიერების რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის. არ არის საჭირო დერივატიზაცია, რაც ამარტივებს ნიმუშის მომზადებას. საკვლევ მასალა შეიძლება მოიცავდეს სხვადასხვა ნივთიერებების პოლარულ აქტიურ მეტაბოლიტებს. ასევე შესაძლებელია საანალიზო ობიექტის გაყინვა შენახვის მიზნით და მის შემდგომი გამოყენება ანალიზისათვის, რაც ნაკლებად მისაღებია გაზური ქრომატოგრაფია მასსპექტრომეტრისათვის. სითხური ქრომატოგრაფის საშუალებით შესაძლებელია მრავალი ისეთი ნაერთის ანალიზი, რომელთა შესწავლა ვერ ხდება გაზური ქრომატოგრაფის მეშვეობით [195, 217].

სასამართლო ტოქსიკოლოგიური ანალიზის დროს დამადასტურებელი მეთოდის სახით რეკომენდებულია მას სპექტრომეტრის (MS) გამოყენება, რადგან MS განსაზღვრავს როგორც მოლეკულურ მასას, ასევე იძლევა საკვლევ ნივთიერების სტრუქტურულ ინფორმაციას. მასსპექტრომეტრის მთავარი პრინციპი არის სხვადასხვა იონიზაციის წყაროს საშუალებით იონების წარმოქმნა, აღნიშნული იონების დიფერენცირება მასის და მუხტის თანაფარდობის შესაბამისად და მათი საბოლოო დეტექტირება. ზოგადად მასსპექტრომეტრიაში არსებობს იონიზაციის ორი ტიპი, “ძლიერი” და “რბილი” იონიზაცია. “ძლიერი” იონიზაციის შემთხვევაში წარმოიქმნება იონიზირებული მოლეკულები, რომლებიც მიდრეკილნი არიან ფრაგმენტაციისადმი, ხოლო “რბილი” იონიზაციის დროს კი მცირდება ეს მიდრეკილება. ელექტრონული იონიზაცია (“ძლიერი” იონიზაცია), ძირითადად გამოიყენება GC/MS-ის შემთხვევაში. ელექტრონული იონიზაციის (EI) დროს წარმოქმნილი დამუხტული ფრაგმენტები იძლევიან სტრუქტურულ ინფორმაციას, რადგან მათ ჯამური მასა დამახასიათებელია საწყისი საანალიზო მოლეკულისთვის. ქიმიური იონიზაცია

(CI), “რბილი” იონიზაციის მეთოდი უფრო ეფექტურად განსაზღვრავს მოლეკულის მასას [28, 46, 87, 175].

LC/MS-ში ყველაზე ხშირად გამოიყენება ელექტრონების გაფრქვევით იონიზაცია (ESI), რომელსაც ეწოდებათ “რბილი” იონიზაციის მეთოდი. ელექტრონების გაფრქვევით იონიზაციის შემთხვევაში სითხის გაფრქვევა ხდება კაპილარული მილიდან, რომელსაც დამუხტული წვეთების ნაკადის წარმოსაქმნელად მიეწოდება მაღალი ძაბვა. ქიმიური იონიზაციის შემთხვევაში სითხე გაივლის გაცხელებულ მილში, ორთქლდება და წარმოქმნის მოლეკულებს გაზურ მდგომარეობაში, რომელთა იონიზაცია ხდება ელექტრონებით. როდესაც განიხილება თუ რა ფორმის იონიზაციის გამოყენებაა საჭირო გათვალისწინებული უნდა იყოს როგორც სამიზნე ნივთიერების მოლეკულური მასა, ასევე მისი პოლარობა. ელექტრონების გაფრქვევით იონიზაციის გამოყენება მიზანშეწონილია შედარებით დიდი პოლარული მოლეკულების ფრაგმენტაციისთვის, ხოლო ქიმიური იონიზაცია ძირითადად გამოიყენება მცირე მასის პოლარული მოლეკულების იონიზაციისათვის. იონიზაციის დროს შესაძლებელია წარმოიქმნას დადებითად ან უაყოფითად დამუხტული იონები [88, 94, 122, 214].

ვინაიდან სითხური ქრომატოგრაფია მასსპექტრომეტრიის დროს გამოიყენება “რბილი” იონიზაცია მასსპექტრი სტანდარტულად შედგება მხოლოდ პროტონირებული მოლეკულური იონისაგან $[M+H]^+$. ზედმეტმა ფრაგმენტაციამ შესაძლოა გამოიწვიოს მგრძობელობის დაქვეითება მოლეკულური იონის $[M+H]^+$ -ის შემცირებით. ასევე აღმოჩნდა, რომ ერთი და იგივე ძაბვის პირობებში ფრაგმენტაციის ხარისხი შესაძლოა ცვალებადი იყოს მოძრავი ფაზის სხვადასხვა სერიებისათვის. შესაბამისად უნდა განხორციელდეს ფრაგმენტაციის ძაბვის კონტროლი მოძრავი ფაზის სერიების ცვლილების შემთხვევაში [107, 222]. ასევე ფრაგმენტაციის ინდუცირება შესაძლებელია ტანდემურ მასსპექტრომეტრიის (MS/MS) ექსპერიმენტების შემთხვევებში, რომლის იდეალურ შესაძლებლობას წარმოადგენს ინსტრუმენტი სამმაგი კვადრუპოლით [156, 221].

გამოყენებული ზუსტი პოტენციალის მიხედვით კვადრუპოლებს გაივლიან მხოლოდ ის იონები, რომელთაც აქვთ მასის და მუხტის სპეციფიკური თანაფარდობა (m/z). სამმაგი კვადრუპოლით მასსპექტრომეტრის MS/MS ექსპერიმენტების ჩატარებისას პირველი კვადრუპოლის გამოყენება სკანირების რეჟიმში, რაც იძლევა მასა/მუხტის სპეციფიკური თანაფარდობის მქონე იონების გატარების საშუალებას. მეორე კვადრუპოლი გამოიყენება როგორც კოლიზიური

უჯრა, სადა იონები ეჯახებიან არგონის ან აზოტის მოლეკულებს და იშლებიან შვილეულ იონებად. მესამე კვადრუპოლი კი გამოიყენება მასის და მუხტის სპეციფიკური თანაფარდობის მქონე შვილეული იონების დადგენისა და დეტექტირებისათვის [209, 213].

მასსპექტრომეტრს სამმაგ კვადრუპოლით გააჩნია მონაცემების დამუშავების სხვადასხვა რეჟიმი, როგორც არის (1) პროდუქტ (შვილეული) იონების სკანირება, (2) პრეკურსორ (საწყისი) იონების სკანირება, (3) ნეიტრალური ნაწილების დაკარგვის და (4) მრავალჯერადი რეაქციის მონიტორინგი (MRM). პროდუქტ იონების სკანირებისას პირველი კვადრუპოლი ფიქსირებულია და ატარებს მხოლოდ მასის და მუხტის სპეციფიკური თანაფარდობის მქონე იონებს (პრეკურსორ [წინამორბედი] იონები), შემდეგ იონები მეორე კვადრუპოლში არგონის ან აზოტის მოლეკულების გავლენით განიცდიან დისოციაციას და ბოლოს მესამე კვადრუპოლში ხდება სრული სკანირება პროდუქტ იონების ფრაგმენტების დეტექტირების მიზნით. პროდუქტ იონების სკანირების საშუალებით ეფექტურად განისაზღვრება ნაერთის სტრუქტურის ფრაგმენტაცია. პრეკურსორი (წინამორბედი) იონების სკანირება პირველ კვადრუპოლში მიმდინარეობს სრული სკანირების რეჟიმით, ხოლო მესამე კვადრუპოლში არის ფიქსირებული. პრეკურსორი (წინამორბედი) იონების სკანირებით შესაძლებელია მსგავსი სტრუქტურების მქონე ნაერთების გამოვლენა, რომლებიც წარმოქმნიან იდენტურად დამუხტულ ფრაგმენტებს. ნეიტრალური ნაწილების დაკარგვის რეჟიმში, როგორც პირველი, ასევე მესამე კვადრუპოლში ხდება სრული სკანირება. ნეიტრალური ნაწილების დაკარგვის მეთოდი გამოიყენება მსგავსი სტრუქტურების მქონე ნაერთების გამოსავლენად, რომლებიც წარმოქმნიან იდენტურ ნეიტრალურ ფრაგმენტებს [198, 208].

მრავალჯერადი რეაქციის მონიტორინგის (MRM) რეჟიმის გამოყენებისას პირველი და მესამე კვადრუპოლი ფიქსირებულია და ატარებს მხოლოდ მასისა და მუხტის (m/z) სპეციფიკური თანაფარდობის მქონე იონებს. კომპლექსური მატრიცების შემთხვევაში MRM რეჟიმში ოპერირებისას შესაძლებელია მატრიციდან ინტერფერენციის გამორიცხვა, რაც იძლევა მაღალი მგრძობელობის მეთოდის შემუშავების შესაძლებლობას. MRM ასევე ეფექტურია ისეთი ნაერთების შემთხვევაში, რომელთა დადგენა რთულია ქრომატოგრაფირებით, მაგრამ პრეკურსორი და პროდუქტ იონების ტრანზაქცია არის უნიკალური, რომელიც არის კონკრეტული ნივთიერებისთვის დამახასიათებელი [177, 188].

2.7 მეორე თაობის ანტიფსიქოზური საშუალებების იზოლირების და თვისობრივ - რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდები ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიურ ანალიზში

ზოგიერთი მეორე თაობის ანტიფსიქოზური საშუალების ოლანზაპინის რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის თვისობრივ-რაოდენობრივი ანალიზის მეთოდებზე, როგორც პრეპარატებში ასევე ბიოლოგიურ მასალაში მრავალი ქვეყნის მეცნიერი მუშაობს. კვლევის საგანს წარმოადგენს ზემოთ მოცემული პრეპარატების თვისობრივ-რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის ანალიზის შესაბამისი პირობების შერჩევა.

მრავალფეროვანია ბიბლიოგრაფიული მონაცემები ანტიფსიქოზური საშუალებების ანალიზის ფიზიკურ-ქიმიური მეთოდების შესახებ. შესაბამისად განვიხილავთ სხვადასხვა კვლევებს, რომელთა ანალიზის საფუძველზე შესაძლებელია ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის, და კლოზაპინის ახალი, ორიგინალური თვისობრივ-რაოდენობრივი ანალიზის და იზოლირების ოპტიმალური პირობების შემუშავება.

რისპერიდონის სისხლის პლაზმაში განსაზღვრისათვის იყენებენ მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფიას შემდეგ პირობებში: სვეტი Nucleosil-C8(150X4 მმ), ულტრაიისფერი (UV)დედექტირებით 280 ნმ სიგრძის ტალღაზე, მოძრავი ფაზა: ნატრიუმის დიჰიდროფოსფატის ბუფერი – აცეტონიტრილი (55:45), pH 6.0, მოძრავი ფაზის დინების სიჩქარე 1.5 მლ/წთ. აღმოსაჩენი მინიმუმია 5 ნგ/მლ [70].

სისხლის პლაზმაში რისპერიდონის განსაზღვრისათვის *ჰუანგი* და *თანაავტორები* იყენებდნენ სითხურ ქრომატოგრაფიას/ტანდემური მას-სპექტრომეტრით, შემდეგ პირობებში: სვეტი Alltima-C18 (2.1×100 მმ), მოძრავი ფაზა ჭიანჭველმუავა-აცეტონიტრილი (40:60) [90].

აშშ ფარმაკოპეაში ოლანზაპინის განსაზღვრის მიზნით მოცემულია სფექტროფოტომეტრია ულტრაიისფერ უბანში, მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია [204].

სისხლში ოლანზაპინის ინდივიდუალური განსაზღვრისათვის *ნილსენის* და *თანაავტორების* მიერ გამოტენებული იყო LC-MS/MS მეთოდი, სვეტი Zorbax Extend C18, მოძრავი ფაზა აცეტონიტრილი-მეთანოლი-ამონიუმის ჰიდროქსიდი. ანალიზის დრო 15 წუთი. [147].

ქვეტიაპინის ფარმაკოკინეტიკური მახვენებლების განსაზღვრისას *რავანდერის* და *თანაავტორების* მიერ გამოყენებული იყო LC-MS/MS მეთოდი სორბენტი C18,

მოძრავი ფაზა ამონიუმ ფორმატის ბუფერის, აცეტონიტრილის და მეთანოლის ნარევი, იზოკრატული მოწოდებით [168].

ნარეში და თანავატორები ოლანზაპინის, რისპერიდონის და ქვეტიაპინის ერთდროული განსაზღვრისათვის გვთავაზობენ მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფიას შემდეგი პირობებით: სვეტი - Luna C18, მოძრავი ფაზა - ამონიუმის აცეტატი 20 მმოლ (pH 6.7 ± 0.5) და აცეტონიტრილი (50 : 50), მოძრავი ფაზის დინების სიჩქარე - 1.0 მლ/წთ, უი დეტექტორი 280ნმ სიგრძის ტალღაზე. ანალიზის შედეგები იყო სწორხაზოვანი 35-65 მკგ/მლ კონცენტრაციის ფარგლებში (ოლანზაპინისთვის $R^2 \geq 0.992$, რისპერიდონის $R^2 \geq 0.991$) [104].

ოლანზაპინის, რისპერიდონის, კლოზაპინის და მათი ძირითადი მეტაბოლიტების ადამიანის შრატში განსაზღვრისთვის *ურინოესკას და თანავატორების* მიერ შემუშავებული იყო LC-MS/MS მეთოდი, შრატის ცილების დალექვა ხებოდა რეაგენტით: $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05% ხსნარი აცეტონიტრილი/მეთანოლში (40:60). ქრომატოგრაფიული დაყოფა ხდებოდა სვეტზე - BEH C18, მოძრავი ფაზის გრადიენტული მიწოდებით. მოძრავი ფაზა A (2 მმოლ/ლ ამონიუმის აცეტატი, 0.1% ჭიანჭველმჟავა 5%-იან აცეტონიტრილში), მოძრავი ფაზა B (2 მმოლ/ლ ამონიუმის აცეტატი, 0.1% ჭიანჭველმჟავა 95 %-იან აცეტონიტრილში). დეტექტირება ხდებოდა სამმაგი კვადროპოლით ტანდემური მას-სპექტრომეტრით. ანალიზის ხანგრძლივობა - 5 წუთი [203].

ჭანის და თანავატორების მიერ ადამიანის პლაზმაში ოლანზაპინის რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის შემუშავებული იყო სითხური ქრომატოგრაფია-მასსპექტრომეტრული მეთოდი (LC-ID/MS). პლაზმის ნიმუშების ექსტრაგირებისათვის გამოიყენებოდა ტერტ-ბუთილ მეთილის ეთერი. ქრომატოგრაფიული დაყოფა ხდებოდა სვეტზე XBridge Shield RP 18 (100მმ x 2.1მმ, 3.5მკმ, Waters). მოძრავი ფაზა-აცეტონიტრილი და ამონიუმის ბუფერი (pH 8.0), მიწოდება იზოკრატული, ნაკადის სიჩქარეზე 0.4 მლ/წთ. იონიზაცია მიიღწეოდა დადებითი ელექტროგაფრქვევით (ESI⁺). სკანირება მიმდინარეობდა მრავალჯერადი რეაქციის მონიტორინგით (MRM) [224].

ადამიანის სისხლში ოლანზაპინის განსაზღვრისათვის *სპინას და თანავატორების* მიერ შემუშავებული იყო სითხური ქრომატოგრაფიული მეთოდი UV დეტექტირებით. შიდა სტანდარტის სახით გამოიყენებული იყო კლოზაპინი. საკვლევი ნივთიერების იზოლირება ბიოლოგიური ობიექტიდან ხდებოდა სითხე-სითხე ექსტრაქციით, გამოიყენებოდა ორგანულ გამხსნელთა სისტემა ნ-ჰექსანი-იზოამილის სპირტი (90:10). ორგანული ფაზის ექსტრაქცია ხდებოდა ფოსფატური

ბუფერით 0.1 მოლი/ლ, pH 2.2. ქრომატოგრაფირებისათვის გამოყენებული იყო შემდეგი პირობები: სტაციონარული ფაზა Water Spherisorb S5 C6 (250mm X 4.6 mm ID), მოძრავი ფაზა წყალი-აცეტონიტრილი 55:45 (0009მოლ/ლ ეპტანსულფონ მუავის ნატრიუმის მარილის და 0.006მოლ/ლ ორფუძიანი კალციუმის ფოსფატის შემცველობით pH 2.7), ფაზის დინების სიჩქარე 1.0მლ/წთ. დეტექტირება ხდებოდა 254 ნმ სიგრძის ტალღაზე. საკალიბრო კონცენტრაციებისთვის გამოიყენებოდა საანალიზო ხსნარები 50 – 500 ნგ/მლ კონცენტრაციის ფარგლებში, ქრომატოგრაფირების დრო იყო 6 წთ. მეთოდი გამოიყენებოდა ფარმაკოკინეტიკური მახვენებლების კვლევისათვის [173].

ადამიანის შრატში და ცერებროსპინალურ სითხეში ოლანზაპინის და N-დიმეთილ ოლანზაპინის განსაზღვრისათვის *იოსეფსონის და თანავეტორების* მერ ჩატარდა კვლევა სითხურ ქრომატოგრაფიული/ტანდემური მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდის შემუშავებისათვის. შრატის ან ცერებროსპინალურ სითხის ნიმუშებიდან ოლანზაპინის და დესმეთილოლანზაპინის იზოლირება მოხდა ტერტ-ბუთილმეთილს ეთერით, ხოლო შიდა სტანდარტის სახით გამოიყენებოდა ოლანზაპინი-D3. საკვლევი ნივთიერების რაოდენობრივი განსაზღვრისთვის გამოიყენებოდა LC-MS/MS მეთოდი. იონიზაცია მიიღწეოდა დადებითი ელექტროგაფრქვევით (ESI⁺). სკანირება მიმდინარეობდა მრავალჯერადი რეაქციების მონიტორინგით (MRM). საკალიბრო სტანდარტული ხსნარების კონცენტრაცია 25-100 ნგ/მლ. [102].

დე მუულდერის და თანავეტორების მიერ შემუშავებული იყო ორი სითხურ ქრომატოგრაფიული ტანდემური მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდი, ერთი რისპერიდონის და მისი აქტიური მეტაბოლიტის 9-ჰიდროქსირისპერიდონის (პალიპერიდონი) ენანტიომერების რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის ადამიანის პლაზმაში და მეორე - ადამიანის შარდში. პლაზმის და შარდის ნიმუშიდან იზოლირებისათვის გამოიყენებოდა მყარფაზური ექსტრაქცია შერეული ტიპის სორბენტზე. სორბენტის ჩარეცხვა ხდებოდა წყლის, ძმარმუავა მეთანოლის სისტემით, ხოლო ელურებისათვის გამოიყენებოდა მეთანოლის და ამონიუმის ჰიდროქსიდი ნარევი, აორთქლება აზოტით 65°C ტემპერატურაზე. ელუატის გამხსნელად გამოიყენებოდა 200 მკლ ჰეპტანის, ეთანოლის და 0.1 M ამონიუმის აცეტატის ნარევი. დაყოფა ხდებოდა სითხური ქრომატოგრაფის ქირალურ სვეტზე (50მმ X 4.6მმ, 10 მკმ ნაწილაკების ზომა), მოძრავი ფაზა - ჰექსანი, იზოპროპანოლის და ეთანოლის ნარევი გრადიენტული მიწოდებით, დეტექტირებისათვის გამოიყენებოდა ტანდემური მას-სპექტრომეტრია დადებითი

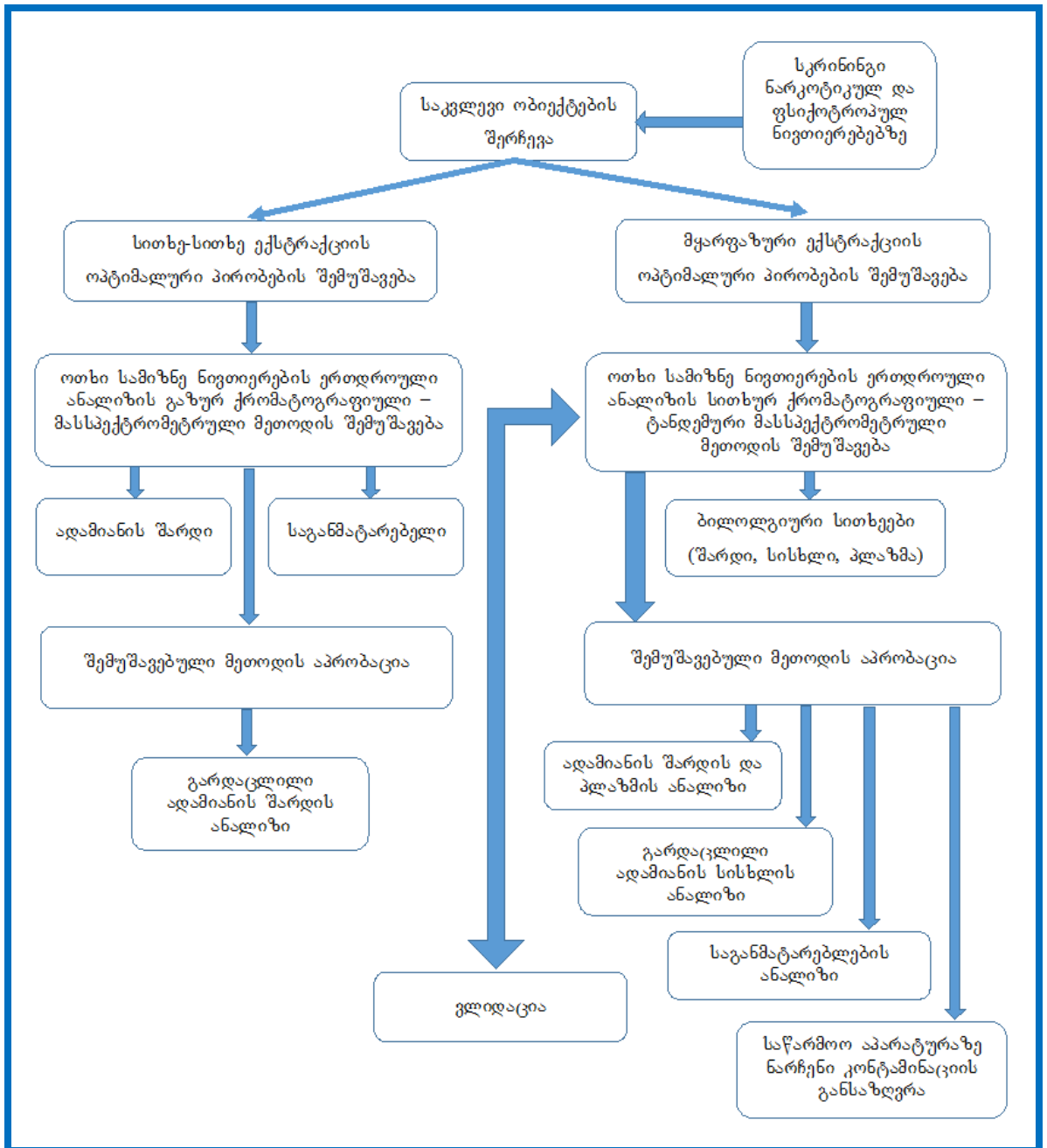
ელექტროგაფრქვევით. საკალიბრო ხსნარების კონცენტრაცია იყო პლაზმის შეთხვევაში 20-100ნგ/მლ ფარგლებში, ხოლო შარდისთვის 10-2000ნგ/მლ ფარგლებში [136].

ადამიანის შარდიდან და სისხლის შრატის სითხე-სითხე ექსტრაქციით იზოლირებული კლოზაპინის და მისი მთავარი მეტაბოლიტების ნორკლოზაპინის და კლოზაპინ-*N*-ოქსიდის ანალიზის მიზნით ავტორების (*ვოჭვარტი და თანავტორები*) მიერ შემოთავაზებული იყო სითხური ქრომატოგრაფიული მას-სპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდი. სითხე-სითხე ექსტრაქცია ტარდებოდა ტუტე პირობებში, გამხსნელის სახით გამოიყენებოდა ეთილაცეტატი. დაყოფისთვის გამოიყენებოდა SynergiPolar RP სვეტი, მოძრავი ფაზა 1 მმოლი ამონიუმის ფორმატის და მეთანოლის ნარევი, მიწოდება – გრადიენტული, შიდა სტანდარტი d4-კლოზაპინი. დეტექტირებისათვის გამოიყენებოდა QTrap 2000 ტანდემური მას-სპექტრომეტრი, იონიზაცია დადებითი ელექტროგაფრქვევით, სკანირება მრავალჯერადი რეაქციების მონიტორინგით (MRM) [219].

ვარდაკოუს და თანავტორების მიერ მოწოდებულია ადამიანის პლაზმაში კლოზაპინის და ნორკლოზაპინის ერთდროული განსაზღვრისათვის გაზურ ქრომატოგრაფიული მას-სპექტრომეტრული (GC/MS) მეთოდი. ნიმუშის მომზადება მოიცავდა საკვლევი მასალის მყარფაზურ ექსტრაქციას Bond-Elut Certify კარტრიჯის გამოყენებით და შემდგომ დერივატიზაციას TFAA-ს საშუალებით. კლოზაპინის და ნორკლოზაპინის განსაზღვრისათვის შიდა სტანდარტის სახით გამოიყენებოდა კლოზაპინი-d8. საკალიბრო ნიმუშები მზადდებოდა საკვლევი კლოზაპინის კონცენტრაციით 3-600ნგ/მლ-ის და ნორკლოზაპინის 5-600ნგ/მლ-ის ფარგლებში. ანალიზისათვის გამოიყენებოდა გაზური ქრომატოგრაფი Hewlett Packard 5890 დეტექტორი HP 5970 MSD, სვეტი HP-5MS (30 მ × 0.25 მმ), აირმატარებელი ჰელიუმი, აირის დინების სიჩქარე 1.0 მლ/წთ. კლოზაპინის და ნორკლოზაპინის თვისობრივი და რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის მას-სპექტრომეტრში იონიზაცია მიიღწეოდა ელექტრონული დარტყმით (EI), სკანირება მიმდინარეობდა იონების სელექციური მონიტორინგით (SIM) [206].

თავი III
კვლევის დიზაინი, ობიექტები, მასალები და მეთოდები

3.1 კვლევის დიზაინი



სურათი 19: კვლევის დიზაინი

3.2 კვლევის ობიექტები და მასალები

კვლევის ობიექტები

in vitro მოდელები ნიმუშების მოსამზადებლად გამოიყენებოდა:

- გარდაცვლილი და ცოცხალი ადამიანის სისხლი
- ადამიანის პლაზმა
- გარდაცვლილი და ცოცხალი ადამიანის შარდი

საგანმეტარებლებზე სამიხნე ნივთიერებების ანალიზისათვის გამოიყენებოდა: ტაბლეტებისგან განთავისუფლებული ბლისტერი და ფლაკონი; დასუფთავების სინჯი საწარმოო აპარატურიდან;

კვლევაში გამოყენებული იყო შემდეგი მასალები:

სამიხნე ნივთიერებების საანალიზო *in vitro* მოდელები ნიმუშების მოსამზადებლად გამოიყენებოდა SIGMA-ALDRICH -ის კატალოგიით შეძენილი შემდეგი რეფერენს სტანდარტები:

- ოლანზაპინი (EP) ევროპის ფარმაკოპეის რეფერენს სტანდარტი(ქიმიური ნივთიერების ნომერი 132539-06-1, კატალოგის ნომერი Y0001370);
- რისპერიდონი (EP) ევროპის ფარმაკოპეის რეფერენს სტანდარტი (ქიმიური ნივთიერების ნომერი 106266-06-2, კატალოგის ნომერი R1000600)
- ქვეტიაპინის ფუმარატი (EP) ევროპის ფარმაკოპეის რეფერენს სტანდარტი (ქიმიური ნივთიერების ნომერი 111974-72-2. კატალოგის ნომერი Y0001657);
- კლოზაპინი (EP) ევროპის ფარმაკოპეის რეფერენს სტანდარტი (ქიმიური ნივთიერების ნომერი 5786-21-0, კატალოგის ნომერი C2460000.

პრეპარატები:

სედარექსი (რისპერიდონი) 1მგ №10 ტაბლეტი ბლისტერში (მწარმოებელი: „GM Pharmaceuticals”, საქართველო.)

ოლზაპი (ოლანზაპინი) 10მგ №10 ტაბლეტი ბლისტერში (მწარმოებელი: „GM Pharmaceuticals”, საქართველო.)

აზალეპტინი (კლოზაპინი) 100მგ №10 ტაბლეტი ბლისტერში (მწარმოებელი: „ARPIMED”, სომხეთი.)

ქვეტიაპინი ფუმარატის ტაბლეტები 100მგ №100 ტაბლეტი ფლაკონში (მწარმოებელი: „Apotex”, კანადა.)

გამოიყენებოდა შემდეგი ექსპერიმენტებისთვის:

1. სამიზნე ნივთიერებების გაზური ქრომატოგრაფიული მასსპექტრომეტრული მეთოდის შემუშავებისას *in vitro* მოდელური ნიმუშების მოსამზადებლად.
2. საგანმატარებლებზე სამიზნე ნივთიერებების ანალიზისათვის.
3. საწარმოო პროცესში გამოყენებულ დანადგარებზე აქტიური ნივთიერების ნარჩენი კონტამინაციის განსაზღვრისას საკონტროლო ხსნარის მოსამზადებლად.

ორგანული გამსხნელები და რეაქტივები

- მეთანოლი – Scharlab, ესპანეთი
- ეთანოლი – Scharlab, ესპანეთი
- N-ჰექსანი – Rotth, გერმანია
- აცეტონიტილი - Merck, გერმანია
- ჭიანჭველმჭავა – Rotth, გერმანია
- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System for ELISA - SIGMA-ALDRICH, აშშ
- ამონიუმის ჰიდროქსიდი – Scharlab, ესპანეთი

გამსხნელთა სისტემები:

ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ქრომატოგრაფირებისათვის მოძრავ ფაზად გამოიყენებოდა შემდეგი გამსხნელთა სისტემები:

- 0.1% ჭიანჭველმჭავას წყლხსნარი (B ხსნარი) : 0.1% ჭიანჭველმჭავას აცეტონიტილის ხსნარი (A ხსნარი) - 60:40

სითხე – სითხე ექსტრაქციისათვის გამოიყენებოდა შემდეგი გამსხნელთა სისტემები:

იზოლირებისათვის ოპტიმალური პირობების შერჩევის მიზნით გამოვიყენეთ გამსხნელთა სხვადასხვა სისტემები:

- ჰექსანი - დიქლორმეთანი (90:10)
- ეთილაცეტატი – ჰექსანი – დიქლორმეთანი – იზოპროპანოლი (60:20:15:5)
- ქლოროფორმი – ჰექსანი – N ბუთანოლი (40:40:20)
- ჰექსანი – ეთილაცეტატი (80:20)
- ქლოროფორმი – ბუთილაცეტატი – მეთანოლი (60:30:10)

მყარფაზური ექსტრაქციისათვის გამოიყენებოდა:

სორბენტის კონდეცირება

- მეთანოლი
- დეიონიზირებული წყლი
- 100 მმოლი ფოსფატური ბუფერი (pH 6.0)

ნიმუშის წინასწარი დამუშავებისათვის

- 4 მლ დეიონიზირებული წყალი
- 100 მმოლი ფოსფატის ბუფერი (pH 6.0).

სორბენტის ჩარეცხვისათვის

- დეიონიზირებული წყლი
- 100 მმოლიმმარმუავა
- მეთანოლი

ელუატის მიღებისათვის

- მეთილენქლორიდი (CH_2Cl_2) /იზოპროპილის სპირტი (IPA) / ამონიუმის ჰიდროქსიდი (NH_4OH), 78:20:2 თანაფარდობით.

3.3 კვლევის მეთოდები

- სისხლის, პლაზმის, შარდის შემოწმება ნარკოტიკული და ფსიქოტროპული ნივთიერებების არსებობაზე წარმოებდა იმუნოფერმენტული მეთოდით, ანალიზატორის საშუალებით, Human Reader Plus, Human Combiwash, გერმანია.

იმუნოფერმენტული ანალიზისათვის გამოიყენებოდა შემდეგი მასალები:

ანტისხეულით მოფენილი პლანშეტი.

ფერმენტი (ნივთიერებასთან კონიუგირებული ფერმენტის შემცველობით) ფოსფატური ბუფერი, ხარის შრავტი და კონსერვანტი.

Tween-20 განზავებული დეიონიზირებული წყლით 1 : 10 თანაფარდობით.

სუბსტრატი (3,3',5,5'-ტეტრამეთილბენზიდინს (TMB)),

სტოპ-ხსნარი - 1 N გოგირდმუავა.

- სითხე-სითხე ექსტრაქციისათვის, საანალიზო ობიექტების სტანდარტული და საკვლევი ხსნარების მოსამზადებლად ერთგვაროვანი სითხეების მისაღებად, გამოიყენებოდა როტორული შემრევი Stuart®Rotator SB3 - Bibby Scientific Ltd., (გაერთიანებული სამეფო).

- სითხე-სითხე ექსტრაქციის დროს ფაზათა დაყოფისათვის გამოიყენებოდა ცენტრიფუგა Hettich® MICRO 200 - Andreas Hettich GmbH & Co.KG (გერმანია).
- ნიმუშების ულტრაბგერითი დამუშავება მიმდინარეობდა ულტრაბგერით აბაზანაზე MRC Ultrasonic - MRC Ltd. (ისრაელი) .
- სისხლის, შარდის, პლაზმის ინ ვიტრო ნიმუშებიდან საკვლევი ნივთიერებების იზოლირება ხდებოდა მყარფაზური ექსტრაქციის მეთოდით, გამოიყენებოდა სისტემა Gilson GX-271 ASPEC, აშშ. მყარფაზური ექსტრაქციის კარტიჯები - Supelclean LC-18 SPE 500მგ(SIGMA-ALDRICH);
- საანალიზო ნიმუშების, გამხსნელთა სისტემების, მყარფაზური ექსტრაქციისას მომზადებისას გამოიყენებოდა დემინერალიზირებული წყალი, რომელიც მიიღებოდა მილიპორის აპარატის საშუალებით.
- საანალიზო ნიმუშის კონცენტრირებისათვის ვიყენებდით აზოტის ნაკადის მოწყობილობას.
- ბუფერული ხსნარების მოსამზადებლად, ექსტრაგირების პროცედურის დროს გამოიყენებოდა pH მეტრი.
- ბიოლოგიური ობიექტების, სტანდარტული და საანალიზო ნიმუშების შესანახად, სტაბილურობის შესასწავლად ვიყენებდით კომპანია Thermo-ს მიერ წარმოებულ მაცივარს.
- საანალიზო ნიმუშების გასაფილტრად ვიყენებდით ფილტრს ზომით 0.45მკმ
- საანალიზო ობიექტში საკვლევი ნივთიერების რაოდენობრივი განსაზღვრა წარმოებდა სითხური ქრომატოგრაფი - ტანდემური მასსპექტრომეტრით (LC-MS/MS) - AGILENT TECHNOLOGIES 1290 Infinity AGILENT TECHNOLOGIES 6460Triple quad LC/MS/MS. სვეტი - Zorbax Eclipse C18(100×2.1mm, 1.8 μm), წინასვეტი - UHPLC GUARD Zorbax Eclipse C18(5×2.1mm,1.8μm).იონიზაცია მიიღწეოდა დადებითი ელექტროგაფრქვევით (ESI⁺). სკანირება მიმდინარეობდა მრავალჯერადი რეაქციის მონიტორინგის რეჟიმში (MRM).
- საანალიზო ობიექტში საკვლევი ნივთიერებების თვისობრივის ანალიზისათვის გამოიყენებოდა გაზური ქრომატოგრაფია მასსპექტრომეტრული დეტექტირებით (GC-MS), აპარატი - Agilent 7000A Quadrupole GC-MS. იონიზაცია მიმდინარეობდა დადებითი ელექტრონული იმპულსის რეჟიმით (EI⁺). სკანირება მიმდინარეობდა ჯამური იონური ნაკადით (TIC).

თავი IV

მიღებული შედეგები და მათი განხილვა

4.1 ბიოლოგიური ობიექტების სკრინინგი ნარკოტიკული და ფსიქოტროპული ნივთიერებების არსებობაზე ჰეტეროგენული იმუნოფერმენტული ანალიზის (ELISA) მეთოდით

ექსპერიმენტებში *in vitro* მოდელის მოსამზადებლად გამოიყენებოდა სხვადასხვა ბიოლოგიური ობიექტები, ადამიანის სისხლი, შარდი, პლაზმა. მოცემული საანალიზო მატრიცები ნიმუშების მომზადებამდე უნდა შემოწმდეს ნარკოტიკულ და ფსიქოტროპულ ნივთიერებებზე და გამოირიცხოს მათი არსებობა, რათა გავლენა არ იქონიოს ექსპერიმენტის შედეგებზე. საანალიზო ობიექტების შემოწმებას ვახდენდით იმუნოფერმენტული ანალიზის მეთოდით (ELISA) შედეგ ნარკოტიკულ და ფსიქოტროპულ ნივთიერებებზე: ტეტრაპიდროკანაბინოლი, კოკაინი, მეტადონი, ამფეტამინები, მეტამფეტამინები, ოპიატები, ბუპრენორფინი, ბენზოდიაზეპინები, ბარბიტურატები და ტრიციკლური ანტიდეპრესანტები.

ELISA მყარ-ფაზური იმუნოანალიზის მეთოდია, რომელიც შემუშავებულია ნარკოტიკულ საშუალებათა აღმოსაჩენად. ანალიზი სრულდება პლანშეტზე, რომლის ფსკერზეც იმობილიზირებულია ანტისხეულები, რომელთაც ახასიათებთ მაღალი აფინურობა საკვლევ ნარკოტიკულ და ფსიქოტროპულ საშუალებებთან. უჯრედის ფსკერზე პირველ რიგში უნდა მოხდეს სტანდარტის და ნიმუშის შეტანა, ხოლო შემდეგ ემატება ენზიმი (ფერმენტული კონიუგატი). საინკუბაციო პერიოდში ანტისხეულთან ბმის დასამყარებლად მიმდინარეობს კონკურენცია ნარკოტიკსა და ფერმენტულ კონიუგატს შორის. რეცხვის ეტაპზე ხდება შეუკავშირებელი ნაწილი მოშორება და შემდეგ ეტაპზე ემატება სუბსტრატი ფერის წარმოსაქმნელად. ენზიმ-სუბსტრატის რეაქციის შესაჩერებლად პროცესში უნდა მოხდეს სტოპ-ხსნარის დამატება. ფერის ინტენსივობა ნიმუშში ნარკოტიკული და ფსიქოტროპული საშუალებების შემცველობის უკუპროპორციულია, შესაბამისად ის ნიმუშები, რომლებიც შეიცავენ ნარკოტიკულ ნივთიერებას, ახასიათებთ უფრო ნაკლები ფერის ინტენსივობა.

ანალიზის პროცედურა

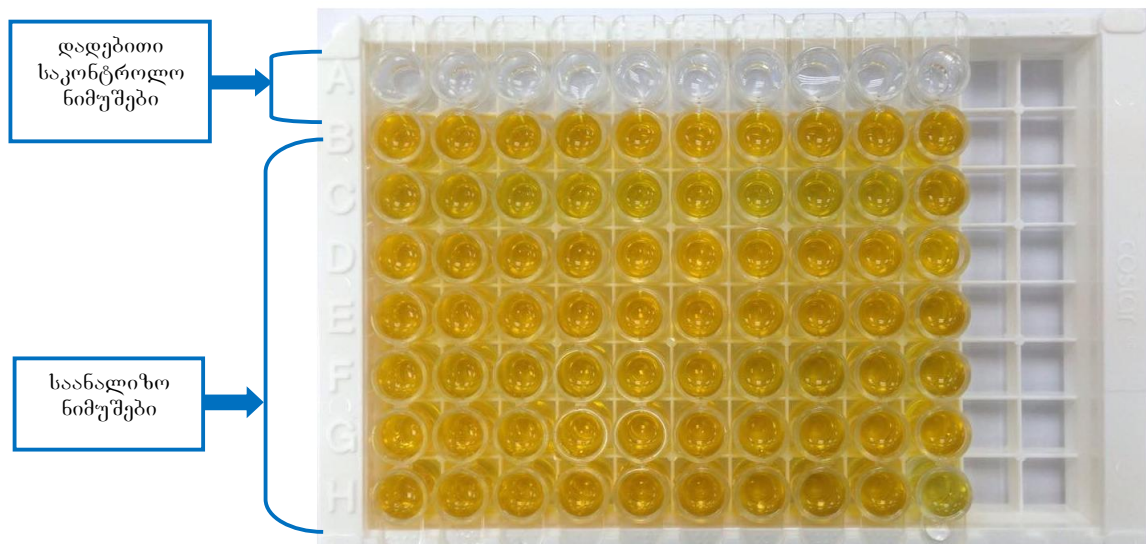
იმუნოფერმენტული ანალიზის დაწყებამდე რეაქტივები და ნიმუშები დავაყოვნეთ ოთახის ტემპერატურაზე 60 წთ-ის განმავლობაში. პლანშეტის სამ-სამი უჯრედის

ფსკერზე მოვათავსეთ 20 მკლ უარყოფითი კონტროლი (0 ნგ/მლ), დადებითი კონტროლი კონცენტრაციით 10, 25, 50 ნგ/მლ და 20 მკლ საანალიზო ნიმუში.

სტანდარტებისა და ნიმუშების დატანის შემდეგ, თითოეულ უჯრედს დაუყოვნებლივ დავამატეთ 100 მკლ ენზიმი. ენზიმის დამატების შემდეგ, პლანშეტი შევანჟღირეთ სანჯღრეველაზე და დავაყოვნეთ 30 წთ-ის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე.

ინკუბაციის პროცესის დასრულების შემდეგ პლანშეტი გავრეცხეთ სპეციალური ხსნარით ავტომატური გამრეცხის საშუალებით. თითოეული უჯრედის გარეცხვისთვის გამოვიყენეთ გამრეცხი ხსნარი 300 მკლ ოდენობით.

ანალიზის შემდეგ ეტაპზე ყოველ უჯრედს დავამატეთ 100-100 მკლ სუბსტრატი და შევანჟღირეთ. სუბსტრატთან რეაქციას დავაყოვნეთ 45 წთ-ის განმავლობაში. რეაქციის შეწყვეტისათვის დავამატეთ 100-100 მკლ სტოპ ხსნარი (სურათი 20).



სურათი 20: იმუნოფერმენტული ანალიზის შედეგები

ოპტიკური სიმკვრივის მნიშვნელობების განსაზღვრა მოვახდინეთ 450 ნმ-ზე, რის შედეგადაც დავადგინეთ, რომ ყველა საანალიზო ნიმუშის ოპტიკური სიმკვრივის მნიშვნელობა იყო მეტი ვიდრე დადებითი კონტროლის ოპტიკური სიმკვრივე, რაც მიუთითებს საანალიზო ბიოლოგიურ ობიექტებში სამიზნე ნარკოტიკული და ფსიქოტროპული ნივთიერებების არარსებობაზე.

სადისარტაციო ნაშრომში მოცემული ყოველი ექსპერიმენტის დაწყებამდე ზემოთ

მიითებული პროცედურა გამოვიყენეთ ყველა ბიოლოგიური ობიექტის ტესტირებისათვის.

შესაბამისად დავადგინეთ, რომ ექსპერიმენტებში გამოყენებული *in vitro* მოდელის მოსამზადებელი შარდი, პლაზმა და სისხლი გვაძლევდა უარყოფით რეაქციას შემდეგ ნარკოტიკულ და ფსიქოტროპულ ნივთიერებებზე: ტეტრაჰიდროკანაბინოლი, კოკაინი, მეტადონი, ამფეტამინები, მეტამფეტამინები, ოპიატები, ბუპრენორფინი, ბენზოდიაზეპინები, ბარბიტურატები და ტრიციკლური ანტიდეპრესანტები.

4.2 ადამიანის შარდიდან ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის სითხე - სითხე ექსტრაქციის ოპტიმალური პირობების შერჩევა

ექსპერიმენტის მიზანი

ბიოლოგიური ობიექტებიდან ტოქსიური ნივთიერებების იზოლირებაზე გაეღწეოს ახდენს სხვადასხვა ფაქტორები, როგორცაა ორგანულ გამხსნელთა თვისებები, არის pH-ის მნიშვნელობა, ექსტრაქციის დრო და ჯერადობა.

მოცემულის ექსპერიმენტის მიზანს წარმოადგენდა ბიოლოგიური ობიექტიდან (შარდი) ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის სითხე – სითხე ექსტრაქციაზე მოქმედი ფაქტორების შესწავლა და იზოლირების ოპტიმალური პირობების დადგენა.

მასალა და მეთოდები

ექსპერიმენტისთვის გამოყენებული იყო სამიზნე ნივთიერებების რეფერენს სტანდარტები, ორგანული გამხსნელების სხვადასხვა ვარიაცია და თანაფარდობა. *in vitro* ნიმუშების მომზადებამდე შარდი შემოწმებული იყო ნარკოტიკულ და ფსიქოტროპულ ნივთიერებებზე (იხილეთ ქვეთავი 4.2).

საკვლევი ნივთიერების იზოლირების ოპტიმალური პირობების დასადგენად გამოვიყენეთ ჩვენს მიერ ექსპერიმენტების საფუძველზე შემუშავებული იზოლირების პირობები.

ექსპერიმენტი

კვლევის მიზნით მოვამზადეთ საკვლევი ნივთიერებების 1.00 მგ/მლ კონცენტრაციის სტანდარტული ხსნარი მეთანოლში. მიღებული ხსნარების შარდში განზავებით მოვამზადეთ საანალიზო ნიმუშები კონცენტრაციით 50 ნგ/მლ. საანალიზო ხსნარის ოპტიმალური გადანაწილებისათვის ვიყენებდით ულტრაბგერით აბაზანას 5 წუთის განმავლობაში.

ნიმუშის მომზადების შემდეგ იზოლირებისთვის გამოყენებული იყო სითხე-სითხე ექსტრაქცია. იზოლირებას ვახდენდით ჩვენს მიერ შემუშავებული მეთოდის მიხედვით ოთახის ტემპერატურაზე, სხვადასხვა ორგანული გამხსნელებით, pH-ის, ექსტრაქციის ჯერადობის და ხანგრძლივობის დროის განსხვავებულ პირობებში.

ცენტრიფუგირების შემდეგ ორგანული გამხსნელის ფენას ვაქროლებდით 50°C

ტემპერატურაზე, აზოტის ნაკადის გამოყენებით. მიღებულ მშრალი ნაშთს ვხსნიდით 200 მკლ მოძრავ ფაზაში და ვახდენდით ქრომატოგრაფში ინჟექტირება 5 მკლ მოცულობით.

აპარატურული გაფორმება

კვლევის დროს ვიყენებდით სითხურ ქრომატოგრაფს – ტანდემური მასსპექტრომეტრით (LC-MS/MS), ქრომატოგრაფირების და დეტექტირების პირობები იხილეთ თავი 4.7.

იზოლირების ხარისხის შეფასებას ვახდენდით საანალიზო ნიმუშების პიკის ფართობების შეფარდებით სამიზნე ნივთიერებების სტანდარტული ხსნარის პიკის ფართობებთან, ექსტრაქციის ხარისხის მაჩვენებელი გამოვთვალეთ ფორმულით:

$$\text{ექსტრაქციის ხარისხი (\%)} = (R_{SM}) / (R_{ST}) \times 100\%$$

სადაც:

R_{SM} - საანალიზო ნიმუშის ქრომატოგრამაზე სამიზნე ნივთიერების პიკის ფართობი;

R_{ST} - სტანდარტული ხსნარების ქრომატოგრამაზე სამიზნე ნივთიერების პიკის ფართობები;

შედეგები

ბიოლოგიური ობიექტის და საანალიზო ნივთიერების ფიზიკურ-ქიმიური თვისებების მიხედვით იზოლირებისათვის შევარჩიეთ გამხსნელთა სხვადასხვა სისტემები, იხილეთ ქვეთავი 3.4.

შერჩეული გამხსნელთა სისტემებით მოვახდინეთ სამიზნე ნივთიერებების იზოლირება არის სხვადასხვა pH – ის პირობებში.

№8 ცხრილში მოცემულია საკვლევი ნივთიერებების იზოლირების ხარისხი (%) არის სხვადასხვა pH – ის და გამხსნელთა სისტემების პირობებში.

ცხრილი 8: ოლნზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის
იზოლირების ხარისხის მონაცემები

დასახელება	იზოლირების სისტემა				
	ჰეპტანი დიქლორმეთანი 9:10	ეთილაცეტატი ჰეპტანი დიქლორმეთანი იზოპროპანოლი 60:20:15:5	ქლოროფორმი ჰექსანი ბუთანოლი 40:40:20	ჰექსანი ეთილაცეტატი 80:20	ქლოროფორმი ბუთანოლი მეთანოლი 60:30:10
	იზოლირების ხარისხი, % pH 2.0				
ოლანზაპინი	3	9	3	8	5
რისპერიდონი	5	11	2	4	2
ქვეტიაპინი	7	2	4	3	4
კლოზაპინი	2	3	7	4	3
	იზოლირების ხარისხი, % pH 6.0				
ოლანზაპინი	14	27	17	6	14
რისპერიდონი	12	29	9	12	19
ქვეტიაპინი	17	31	12	19	22
კლოზაპინი	11	28	14	21	11
	იზოლირების ხარისხი, % pH 9.0				
ოლანზაპინი	67	85	53	51	77
რისპერიდონი	63	81	79	58	56
ქვეტიაპინი	56	84	59	60	48
კლოზაპინი	61	80	68	55	52

ასევე ექსპერიმენტის შედეგად დავადგინეთ ექსტრაქციის ოპტიმალური დრო და ჯერადობა (ცხრილი №9-10). იზოლირებისათვის გამოიყენებოდა გამსხნელობის სისტემა ეთილაცეტატი – ჰეპტანი – დიქლორმეთანი - იზოპროპანოლი (60:20:15:5), ხოლო არის pH იყო 9.0.

ცხრილი 9: ოლნზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის იზოლირების ხარისხის მონაცემები დროის სხვადასხვა ინტერვალში

დასახელება	იზოლირების ხარისხი, %		
	ექსტრაციის დრო 3 წთ	ექსტრაციის დრო 5 წთ	ექსტრაციის დრო 10 წთ
ოლანზაპინი	56	85	85
რისპერიდონი	80	81	81
ქვეტიაპინი	78	84	85
კლოზაპინი	74	80	80

ცხრილი 10: ოლნზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის იზოლირების ხარისხის მონაცემები სხვადასხვა ჯერადობის შემთხვევაში

დასახელება	იზოლირების ხარისხი, %		
	ერთჯერადი	ორჯერადი	სამჯერადი
ოლანზაპინი	72	85	84
რისპერიდონი	63	81	82
ქვეტიაპინი	80	84	84
კლოზაპინი	59	80	81

წარმოდგენილ ცხრილებში მოცემული შედეგების მიხედვით დავადგინეთ, რომ ადამიანის შარდიდან ოლნზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის იზოლირებისათვის ოპტიმალურ პირობებს წარმოადგენს:

გამხსნელთა სისტემა: ეთილაცეტატი – ჰეპტანი – დიქლორმეთანი – იზოპროპანოლი (60:20:15:5)

ტემპერატურული რეჟიმი: ოთახის ტემპერატურა

pH-ის მნიშვნელობა: 9.00

ექსტრაციის ჯერადობა: 2

ხანგრძლივობა: 5-5 წთ

4.3 ადამიანის სისხლიდან და პლაზმიდან ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის მყარფაზური ექსტრაქციის ოპტიმალური პირობების შერჩევა

ექსპერიმენტის მიზანი

ბიოლოგიური ობიექტიდან (სისხლი, პლაზმა) ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის მყარფაზური ექსტრაქციის ოპტიმალური პირობების დადგენა.

ნედლეული და მასალები

ექსპერიმენტისთვის გამოყენებული იყო სამიზნე ნივთიერებების რეფერენს სტანდარტები, ორგანული გამსხნელების სხვადასხვა ვარიაცია და თანაფარდობა. მყარფაზური ექსტრაქციისათვის გამოიყენებოდა სორბენტი - C 18. სისხლის *in vitro* ნიმუშების მომზადებამდე შემოწმებული იყო ნარკოტიკულ და ფსიქოტროპულ ნივთიერებებზე (იხილეთ ქვეთავი 4.2).

ექსპერიმენტი

საანალიზო ხსნარების მომზადება:

საკვლევი ნივთიერებების ძირითადი ხსნარს ვამზადებდით მეთანოლში კონცენტრაციით 1.0 მგ/მლ. მოცემული ხსნარის სისხლში და პლაზმაში განზავებით ხდებოდა ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის საანალიზო ნიმუშების მომზადება კონცენტრაციით 50 ნგ/მლ.

მყარფაზური ექსტრაქციის პროცედურის შერჩევა

პლაზმის და სისხლის ნიმუშებიდან ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის იზოლირებისათვის გამოყენებულ იყო გილსონის ავტომატური სისტემა GX-271 ASPEC.

ბიოლოგიური ობიექტის და საანალიზო ნივთიერებების ფიზიკურ-ქიმიური თვისებების მიხედვით იზოლირებისათვის შევარჩიეთ მყარფაზური ექსტრაქციის ორი განსხვავებული პირობა:

პირობა №1

- სორბენტის სამუშაო მდგომარეობაში მოყვანა (კონდეცირება)
 - ჩარეცხვა 1 x 3 მლ მეთანოლით და გაშრობა
 - ჩარეცხვა 1 x 3 მლ დეიონიზირებული წყლით და გაშრობა

- ჩარეცხვა 1 x 1 მლ 100 მმოლი ფოსფატური ბუფერით (pH 6.0) და გაშრობა
- ნიმუშის წინასწარი დამუშავება და სორბენტზე შეყვანა
 - 1 მლ ნიმუში
 - 4 მლ დეიონიზირებული წყალი
 - 2 მლ 100 მმ ფოსფატური ბუფერი (pH 6.0)
- სორბენტის ჩარეცხვა
 - ჩარეცხვა 3 მლ დეიონიზირებული წყლით, გაშრობა
 - ჩარეცხვა 1 მლ 100 მმოლი ძმარმჟავით, გაშრობა
 - ჩარეცხვა 3 მლ მეთანოლით, გაშრობა
- ელუატის მიღება
 - მეთილენქლორიდი (CH₂Cl₂)/იზოპროპილის სპირტი (IPA)/ ამონიუმის ჰიდროქსიდი (NH₄OH), 78:20:2 თანაფარდობით.

პირობა №2

- სორბენტის სამუშაო მდგომარეობაში მოყვანა (კონდენცირება)
 - ჩარეცხვა 1 x 3 მლ მეთილენქლორიდი (CH₂Cl₂) /იზოპროპილის სპირტი (IPA) / ამონიუმის ჰიდროქსიდი (NH₄OH), 78:20:2 თანაფარდობით და გაშრობა
 - ჩარეცხვა 1 x 3 მლ მეთანოლით და გაშრობა
 - ჩარეცხვა 1 x 1 მლ 100 მმოლი ფოსფატური ბუფერით (pH 6.0)
- ნიმუშის წინასწარი დამუშავება და სორბენტზე შეყვანა
 - 4 მლ ნიმუში
 - 1 მლ დეიონიზირებული წყალი
 - 2 მლ 100 მმოლი ფოსფატური ბუფერი (pH 6.0).
- სორბენტის ჩარეცხვა
 - ჩარეცხვა 1 მლ 100 მმოლი ძმარმჟავით, გაშრობა
 - ჩარეცხვა 3 მლ მეთანოლით, გაშრობა
- ელუატის მიღება
 - მიღებული ელუატის შეგროვება და შერევა

ექსტრაქციის პროცედურა

- სორბენტის სამუშაო მდგომარეობაში მოყვანა (კონდენცირება)
 სორბენტის კონდიცირება მოვახდინეთ №1 და №2 პირობებში მითითებული სხნარებით. გაავაშრეთ არაუმეტეს 76.2 მმვწყ. სვ. წნევაზე.

- ნიმუშის წინასწარი დამუშავება და სორბენტზე შეყვანა
 ნიმუშს დაუმატეთ №1 და №2 პირობებში მითითებული ხსნარები შევურიეთ/შევანჯღრიეთ სტიუარტის როტატორზე და ულტრაბერით აბაზანაზე ჰომოგენური სტრუქტურის მისაღებად. მოვახდინეთ ცენტრიფუგირება 10 წუთის განმავლობაში, 5000 ბრ/წთ და მოვაშორეთ ნალექი. მიღებული ნიმუშების pH უნდა იყოს 6.0 ± 0.5 . pH-ის რეგულირება მოვახდინეთ 100 მმოლი ერთფუძიანი ნატრიუმის ფოსფატით.
 პროცედურის დასრულების შემდეგ საანალიზო ნიმუში შევიტანეთ სორბენტზე.
- სორბენტის ჩარეცხვა
 სორბენტის ჩარეცხვა მოვახდინეთ რამოდენიმე ეტაპად №1 და №2 პირობებში მითითებული თანმიმდევრობით. ყველა ეტაპის შემდეგ ვაშრობდით 5 წუთის განმავლობაში არაუმეტეს 254 მმვწყ. სვ. წნევაზე.
- ელუატის შეგროვება
 ელუირება მოვახდენდით №1 და №2 პირობებში მითითებული თანმიმდევრობით.
- ელუატის შეგროვება
 №1 და №2 პირობების შესაბამისად შეგროვებული ელუატისთვის გამსხნელად გამოვიყენეთ ახალად მომზადებული ნარევი. 40 მლ იზოპროპანოლს დავუმატეთ 4 მლ კონცენტრირებული ამონიუმის ჰიდროქსიდი, შეურიეთ და დავუმატეთ 156 მლ მეთილენქლორიდი და განმეორებით შევურიეთ.
- პროცედურის დასრულების შემდეგ მიღებული ელუატი ავორთქლეთ არაუმეტეს 40°C ტემპერატურაზე აზოტის ნაკადის ქვეშ მშრალ ნაშთამდე.
- საანალიზო ნიმუშის მომზადება – მიღებული მშრალი ნაშთი გავსენით ნარევით, რომელიც შეიცავდა 200 მკლ აცეტონტრილის და დეიონიზირებულ წყალს 1:3 თანაფარდობით. კარგად შევურიეთ/შევანჯღრიეთ 30 წამის განმავლობაში და მოვახდინეთ ქრომატოგრაფში ინექცირება 5 მკლ-ის ოდენობით.

აპარატურული გაფორმება

კვლევის დროს ვიყენებდით სითხურ ქრომატოგრაფს – ტანდემური მასსპექტრომეტრით (LC-MS/MS), ქრომატოგრაფირების და დეტექტირების პირობები იხილეთ ქვეთავი 4.7.

შედეგები

სამიზნე ნივთიერებების იზოლირების ხარისხის შეფასება მოვახდინეთ სისხლის და პლაზმის საანალიზო ნიმუშების პიკის ფართობების შეფარდებით ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის სტანდარტული ხსნარების პიკის ფართობებთან, ექსტრაქციის ხარისხის მაჩვენებელი გამოვთვალეთ ფორმულით:

$$\text{ექსტრაქციის ხარისხი (\%)} = (R_{SM}) / (R_{ST}) \times 100\%$$

სადაც:

R_{SM} - საანალიზო ნიმუშის ქრომატოგრამაზე სამიზნე ნივთიერების პიკის ფართობი;

R_{ST} - სტანდარტული ხსნარების ქრომატოგრამაზე სამიზნე ნივთიერების პიკის ფართობები;

ცხრილი 11: ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის სისხლიდან და პლაზმიდან იზოლირების ხარისხის მონაცემები

დასახელება	სისხლიდან იზოლირების ხარისხი, %	
	ექსტრაქციის პირობა №1	ექსტრაქციის პირობა №2
ოლანზაპინი	92	78
რისპერიდონი	94	45
ქვეტიაპინი	91	76
კლოზაპინი	93	69
დასახელება	პლაზმიდან იზოლირების ხარისხი, %	
	ექსტრაქციის პირობა №1	ექსტრაქციის პირობა №2
ოლანზაპინი	91	71
რისპერიდონი	93	62
ქვეტიაპინი	92	53
კლოზაპინი	94	67

მოცემული ექსპერიმენტში გამოვიყენეთ მყარფაზური ექსტრაქციის ორი განსხვავებული პირობა. მოვახდინეთ სამიზნე ნივთიერებების სისხლიდან და პლაზმიდან ექსტრაქცია და მიღებულ ნიმუშებში საკვლევი ნივთიერების თვისობრივ-რაოდენობრივი განსაზღვრა, რისთვისაც ვიყენებდით სითხურ ქრომატოგრაფს-ტანდემური მასსპექტრომეტრით. მიღებული შედეგებით გამოვთვალეთ სხვადასხვა იზოლირების პირობებში ექსტრაქციის ხარისხი. ცხრილში მოცემული შედეგების მიხედვით დავადგინეთ, რომ ბიოლოგიური სითხეებიდან (სისხლი, პლაზმა) ოლნზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ოპტიმალური იზოლირებისათვის შემუშავებულია მყარფაზური ექსტრაქციის პირობები. წარმოდგენილი მეთოდით შესაძლებელია ოთხი სამიზნე ნივთიერების ორი სხვადასხვა ბიოლოგიური მატრიციდან ერთდროული, მაქსიმალური იზოლირება.

4.4 ბიოლოგიურ ობიექტებში ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის თვისობრივი ანალიზის მასსპექტრომეტრული პარამეტრების შერჩევა

მოცემული სადისერტაციო ნაშრომის მიზანს წარმოადგენდა ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ბიოლოგიური და არაბიოლოგიური წარმოშობის ობიექტებში ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზის მეთოდების სრულყოფა და ახალი უფრო ეფექტური მეთოდების შემუშავება, შესაბამისად ოთხივე სამიზნე ნივთიერების თვისობრივ-რაოდენობრივი ანალიზის ოპტიმალური პირობების შერჩევისათვის ჩავატარეთ შემდეგი ექსპერიმენტები:

- ბიოლოგიურ სითხეებში ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის პროდუქტ იონების ექსპერიმენტი სითხურ ქრომატოგრაფიული – ტანდემური მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდით განსაზღვრისას ოპტიმალური კოლიზიური ენერჯის დასადგენად.
- ბიოლოგიურ სითხეებში MRM ექსპერიმენტი სამიზნე ნივთიერებების სითხურ ქრომატოგრაფიული – ტანდემური მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდით განსაზღვრისას ოპტიმალური პირობების დასადგენად.
- ადამიანის სისხლში ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ინდივიდუალური ანალიზი სითხურ ქრომატოგრაფიული – ტანდემური მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდის ოპტიმალური პირობების შესარჩევად.
- ადამიანის პლაზმაში ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ინდივიდუალური ანალიზი სითხურ ქრომატოგრაფიული – ტანდემური მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდის ოპტიმალური პირობების შესარჩევად.
- ადამიანის შარდში ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ინდივიდუალური ანალიზი სითხურ ქრომატოგრაფიული – ტანდემური მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდის ოპტიმალური პირობების შესარჩევად.

მიღებული შედეგების საფუძველზე შევიმუშავეთ ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ანალიზის ქრომატომასპექტრალური (აირად და თხევად ფაზებში) მეთოდების ახალი, ოპტიმალური პირობები.

4.5 ადამიანის შარდში და სხვადასხვა საგანმატარებლებში ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ერთდროული თვისობრივი ანალიზის გაზურ ქრომატოგრაფიული – მასსპექტრომეტრული (GC-MS) მეთოდის შემუშავება

ექსპერიმენტის მიზანი

ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზისას საკვლევი ნივთიერებების იდენტიფიკაციისათვის ხშირად გამოიყენება გაზურ ქრომატოგრაფიული – მასსპექტრომეტრული მეთოდი, რომელიც წარმოადგენს სპეციფიურ, მაღალი მგრძობელობის ექსპრეს მეთოდს. გაზური ქრომატოგრაფის საშუალებით ხდება ნარევის დაყოფა კომპონენტებად, ხოლო მასსპექტრომეტრით დაყოფილი კომპონენტების დეტექტირება. აღნიშნული მეთოდით ტოქსიური ნივთიერებების იდენტიფიკაცია გამოირჩევა მაღალი სანდობით, რადგან ქრომატომასსპექტრალური მეთოდების კომბინირებით შესაძლებელია საკვლევი ნივთიერებისთვის დამახასიათებელი სპეციფიური მასსპექტრების შედარება ბიბლიოთეკის მონაცემებთან. ასევე ანალიზის შედეგად მიღებულ ქრომატოგრამაზე ნივთიერების შეკავების დროის მიხედვით შესაძლებელია შესაბამისი დასკვნის გაკეთება [22].

მოცემული ექსპერიმენტის მიზანს წარმოადგენდა შარდში და საგანმატარებელზე (არამარკირებული ტაბლეტები) ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის თვისობრივი ანალიზის გაზურ ქრომატოგრაფიული – მასსპექტრომეტრული მეთოდის ოპტიმალური პირობების შემუშავება.

ობიექტი და მასალები

ექსპერიმენტისთვის გამოყენებული იყო სედარექსის, ოლზაპის, აზალეპტინის, ქვეტიაპინი ფუმარატის ტაბლეტები.

ექსპერიმენტი

მედიკამენტების ტაბლეტები მოვსრისეთ როდინში ჰომოგენური მასის მიღებამდე. მიღებული ფხვნილის საშუალებით მოვამზადეთ სედარექსის, ოლზაპის, აზალეპტინის, ქვეტიაპინის 1.0 მგ/მლ კონცენტრაციის ძირითადი ხსნარები მეთანოლში, აქტიურ ნივთიერებებზე გადაანგარიშებით.

ძირითადი ხსნარიდან მოვამზადეთ ორი ტიპის საანალიზო ნიმუში:

1. შარდში სამიზნე ნივთიერებების ანალიზისათვის – ძირითადი ხსნარების შარდში განზავებით მოვამზადეთ საანალიზო ნიმუშები კონცენტრაციით 100 ნგ/მლ.
2. საგანმატარებლების (არამარკირებული ტაბლეტები) ანალიზისათვის - ძირითადი ხსნარი განვაზავეთ მეთანოლით, რომ მიგვეღო საანალიზო ხსნარი, რომელიც შეიცავდა ოთხივე საკვლევე ნივთიერებას კონცენტრაციით 10 ნგ/მლ.

ნიმუშების მომზადებისას ოპტიმალური გადანაწილებისათვის ვიყენებდით ულტრაბგერით აბაზანას 5 წუთის განმავლობაში.

შარდის საანალიზო ნიმუშებიდან იზოლირებას ვახდენდით სითხე-სითხე ექსტრაქციის მეთოდით შემდეგი თანმიმდევრობით: 5 მლ საანალიზო ნიმუშს დავამატეთ ამონიუმის ჰიდროქსიდის 9% ხსნარი (არის pH 9.0-ის მისაღებად), შემდეგ დავამატეთ 3 მლ გამხსნელთა ნარევი ეთილაცეტატი – ჰექსანი – დიქლორმეთანი – იზოპროპანოლი, 60 : 20 : 15 : 5 თანაფარდობით და შეურიეთ 5-5 წთ-ის განმავლობაში Stuart SB3-ის როტორულ შემრევზე. შერევის პროცედურის შემდეგ მოვახდინეთ ცენტრიფუგირება 5 წუთის განმავლობაში (3500 ბრ/წთ) და გამოვაცალკევეთ ორგანული გამხსნელის ფენა.

მეთანოლით მომზადებული საანალიზო ნიმუში და შარდიდან მიღებული გამონაწველილი მოვათავსეთ კონცენტრატორში და ავაქროლეთ 50°C ტემპერატურაზე აზოტის ნაკადის გამოყენებით. მიღებული მშრალი მასა გავხსენით 100 მკლ ეთილაცეტატით, კარგად შევურიეთ 30 წამის განმავლობაში და მოვახდინეთ ქრომატოგრაფში ინექცირება 1 მკლ-ის ოდენობით.

აპარატურული გაფორმება

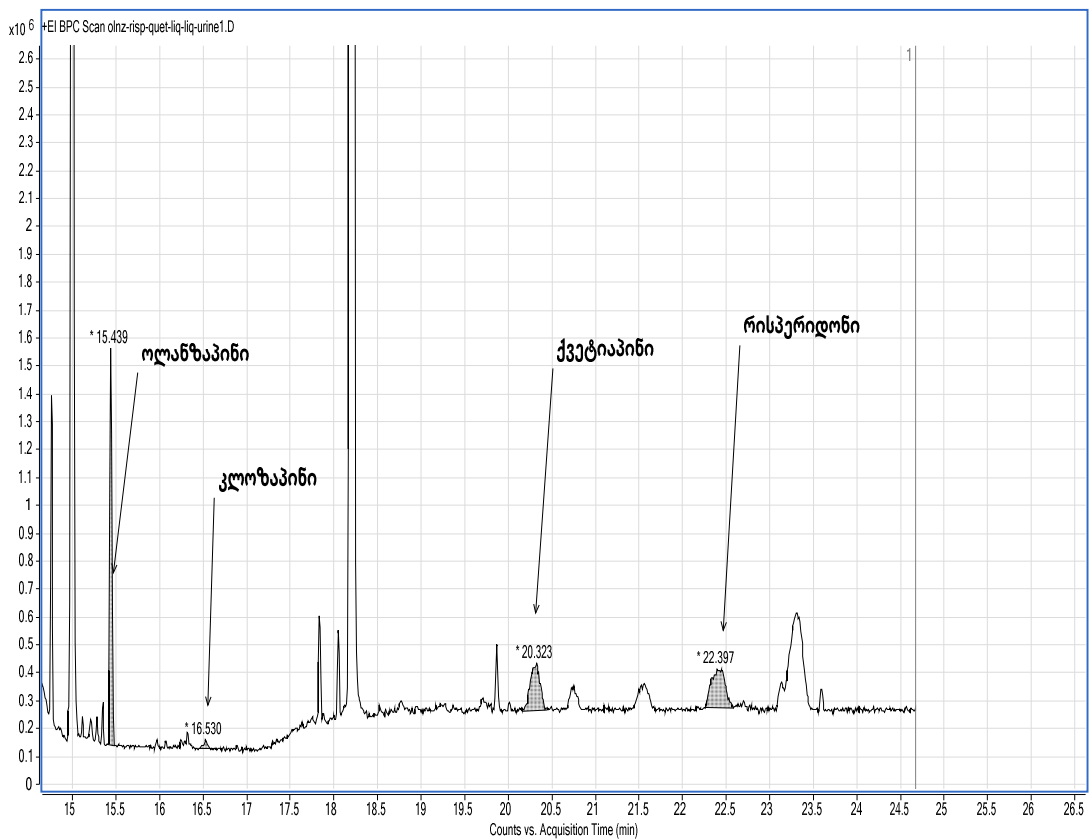
ანალიზი ჩატარდა გაზურ ქრომატოგრაფზე Agilent 7000A Quadrupole GC-MS, რომელიც აღჭურვილი იყო გერსტელის ავტომატური სემპლერით. იონიზაცია მიმდინარეობდა დადებითი ელექტრონული იმპულსის რეჟიმით (EI⁺), სკანირება სრული იონური ნაკადით (TIC).

მეთოდი

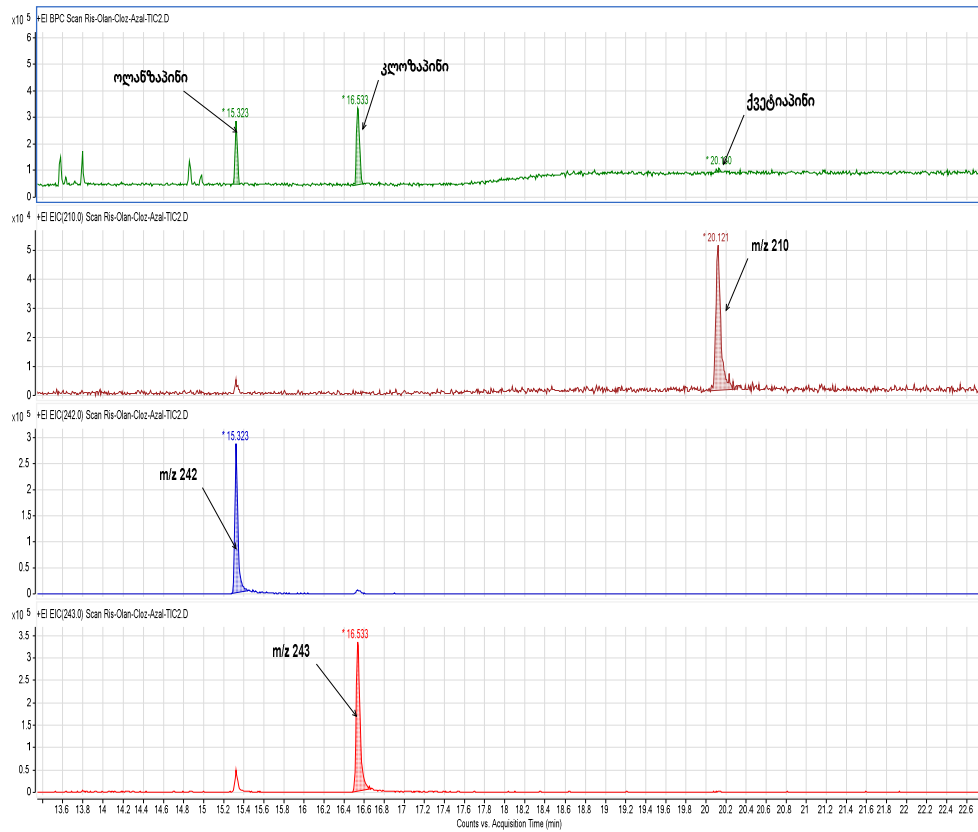
ჩვენს მიერ შერჩეული იყო გაზური ქრომატოგრაფის მუშაობის ოპტიმალური პირობები:

- ინჟექტორის ტემპერატურა: 250°C
- ღუმელის ტემპერატურა: 60°C
- ტემპერატურული გრადიენტი: 60°C 1 წთ; 60°C→250°C 15⁰ C/წთ; 250°C→300°C 10⁰ C/წთ
- სვეტი MS-5, 30 მ X 250 მკმ
- ტრანსფერლაინის ტემპერატურა: 300°C
- ინჟექტირების მოცულობა: 1 მკლ
- იონიზაცია: 70 ევ
- აირმატარებელი ჰელიუმი
- აირის დინების სიჩქარე 1 მლ/წთ.
- დეტექტირება: TIC – m/z 45 – 750 Da

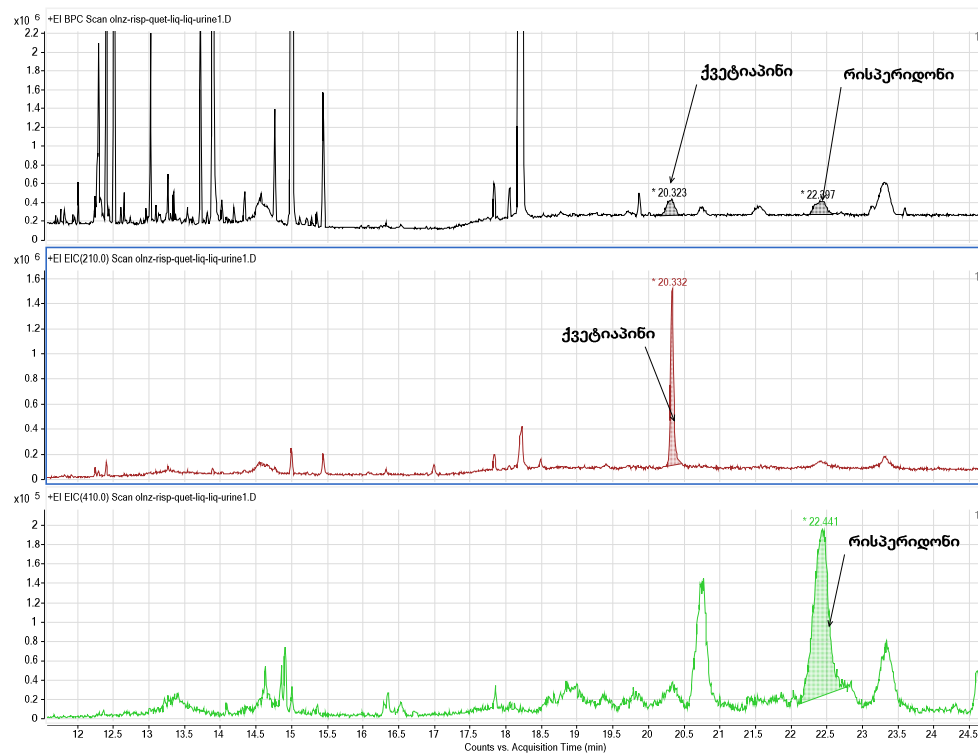
მიღებული GC-MS ქრომატოგრამები და მას სპექტრი მოცემულია №21-25 სურათზე.



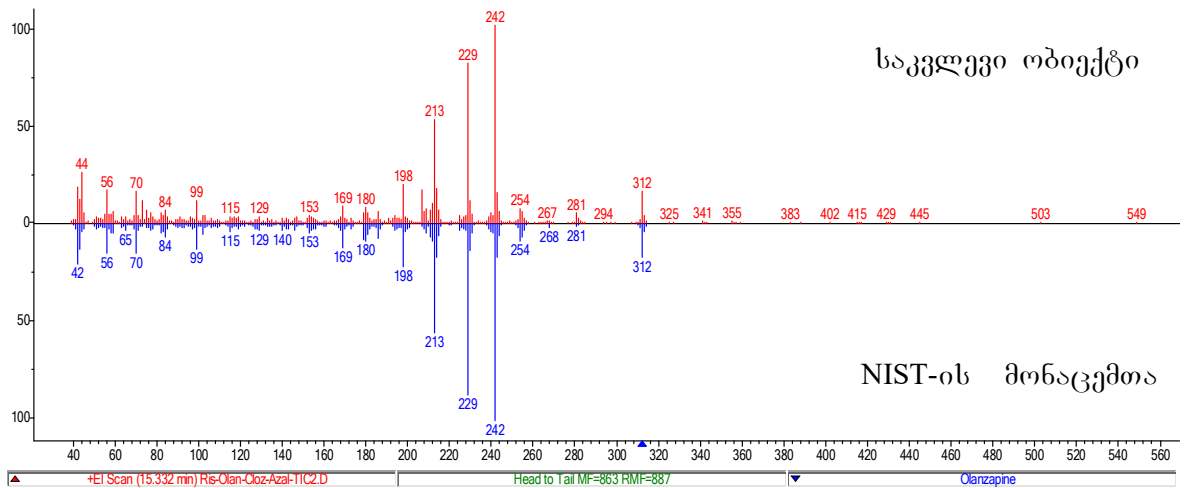
სურათი 21: საკვლევი ნიმუშში ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიპინის და კლოზაპინის GC-MS ქრომატოგრამა



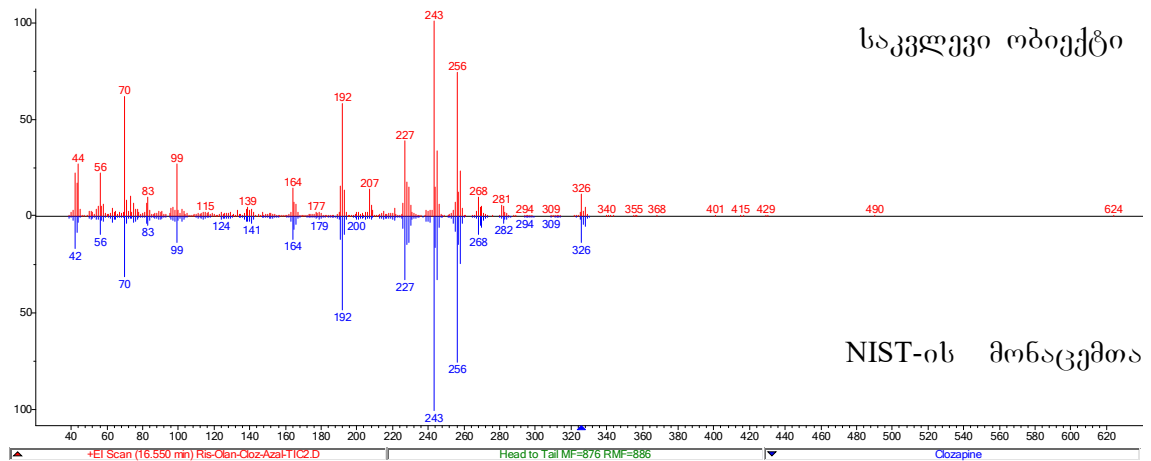
სურათი 22: საგანმატარებელში ოლანზაპინის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის GC-MS ქრომატოგრამა



სურათი 23: საგანმატარებელიში ქვეტიაპინის და რისპერიდონის GC-MS ქრომატოგრამა



სურათი 24: ოლანზაპინის მასსპექტრები მონაცემთა ბაზასა (NIST) და საკვლევი ობიექტში



სურათი 25: კლოზაპინის მასსპექტრები მონაცემთა ბაზასა (NIST) და საკვლევი ობიექტში

ანალიზის შედეგად მიღებულ ქრომატოგრამებზე წარმოდგენილია საკვლევი ნივთიერებების პიკები შემდეგი შეკავების დროით: ოლანზაპინი – 15 წთ, კლოზაპინი 16 წთ, ქვეტიპინი 20 წთ, რისპერიდონი 22 წთ, ხოლო მასსპექტრების მიხედვით მოვახდინეთ სამიზნე ნივთიერებების იდენტიფიცირება, როგორც შარდის ნიმუშში, ასევე საგანმატარებლებში (ტაბლეტები).

ჩატარებული ექსპერიმენტის საფუძველზე მოწოდებულია ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიპინის და კლოზაპინის, როგორც თვისობრივი ასევე დამადასტურებელი გაზურ ქრომატოგრაფიული მასსპექტრომეტრული მეთოდი, რომელიც შესაძლებელია გამოყენებული იყოს, როგორც ბიოლოგიური

სითხეების, ასევე ნივთმტკიცებულებების სახით ამოღებული არამარკირებული ტაბლეტების მიზანმიმართული ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზისათვის. შემუშავებული მეთოდი წარმოადგენს სიახლეს, რადგანაც პირველად ჩვენს მიერ ჩატარდა ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ერთდროული გაზურ ქრომატოგრაფიული მასსპექტრომეტრული ანალიზი.

4.6 გარდაცვლილი ადამიანის შარდში კლოზაპინის თვისობრივი ანალიზი გაზურ ქრომატოგრაფიული – მასსპექტრომეტრული (GC-MS) მეთოდით

ექსპერიმენტის მიზანი

ექსპერიმენტის მიზანს წარმოადგენდა გარდაცვლილი ადამიანის შარდში კლოზაპინის იდენტიფიკაციისათვის, ჩვენს მიერ ექსპერიმენტით შემუშავებული გაზურ ქრომატოგრაფიული – მასსპექტრომეტრული (GC-MS) მეთოდის პრაქტიკული აპრობაცია.

ნედლეული და მასალები

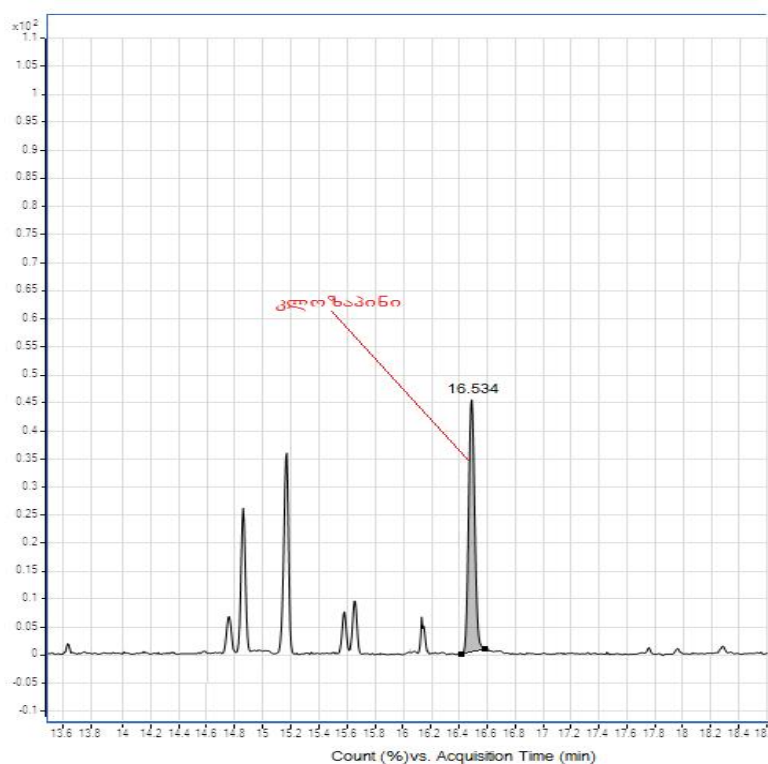
კვლევის ობიექტს წარმოადგენდა გარდაცვლილი ადამიანის შარდი.

საანალიზო ობიექტი წარმოდგენილი იყო სსიპ ლევან სამხარაულის სახელობის სასამართლო ექსპერტიზის ეროვნული ბიუროში. მოთხოვნილი იყო ნარკოტიკული და ფსიქოტროპული ნივთიერებების ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზი.

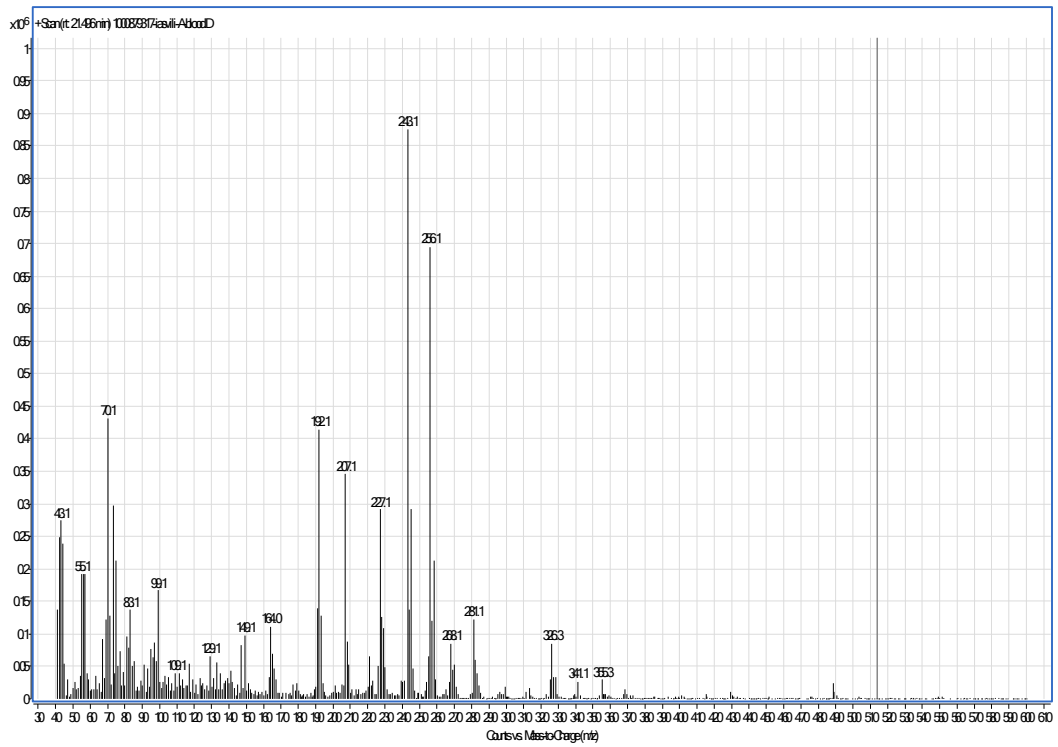
ექსპერიმენტი

საანალიზოდ აღებული იყო შარდი 5 მლ-ს ოდენობით. იზოლირების და ანალიზის პროცედურა ჩატარდა ქვეთავი 4.5-ში მოცემული სქემის მიხედვით.

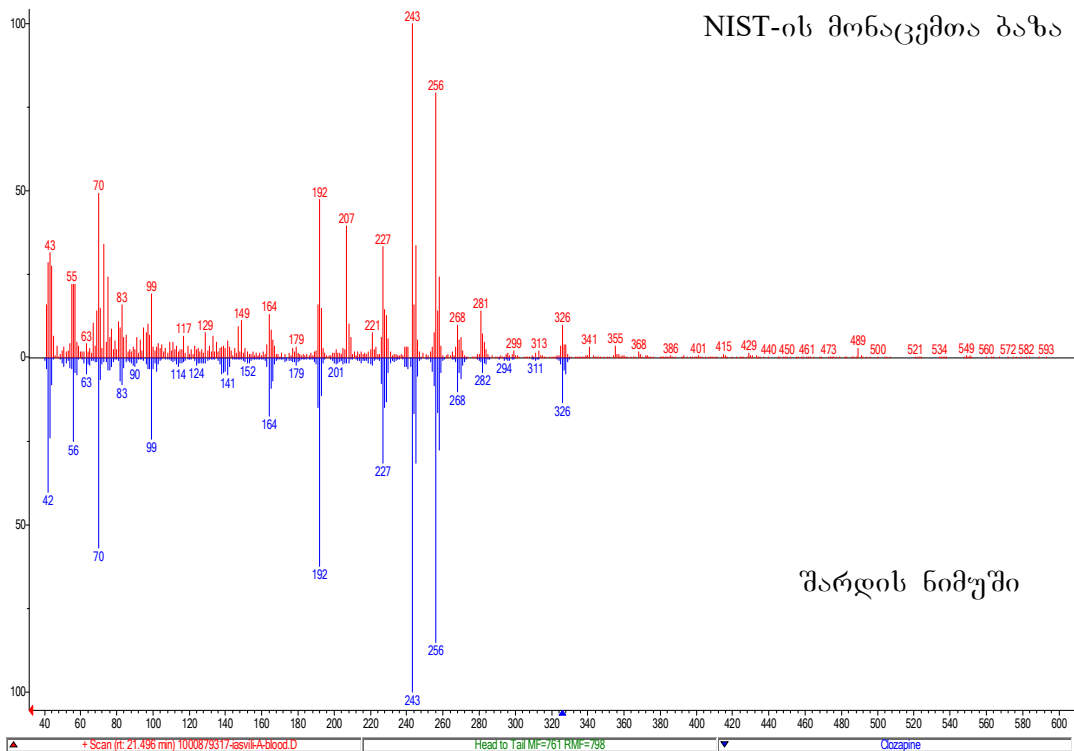
ანალიზის შედეგად მიღებული GC-MS ქრომატოგრამა და მასსპექტრი მოცემულია № 26-28 სურათზე.



სურათი 26: შარდის ნიმუშში კლოზაპინის GC-MS ქრომატოგრამა



სურათი 27: შარდის ნიმუშში კლოზაპინის მას სპექტრი



NIST-ის მონაცემთა ბაზა

შარდის ნიმუში

სურათი 28: კლოზაპინის მასსპექტრები მონაცემთა ბაზასა (NIST) და შარდის ნიმუშებში

წინამდებარე კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ფსიქოაქტიური ნივთიერებების ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზი ჩვენს მიერ შემუშავებული გაზურ ქრომატოგრაფიული-მასსპექტრომეტრული მეთოდით.

ანალიზის შედეგად მიღებული მასსპექტრი შევადარეთ ბიბლიოთეკის მინაცემებს. NIST-ის ბაზასთან შედარების საფუძველზე მოვახდინეთ კლოზაპინის იდენტიფიკაცია გარდაცვლილი ადამიანის შარდში. ქრომატოგრამაზე მოცემულია კლოზაპინის პიკი შეკავების დროით 16.5 წთ.

შესაბამისად, წარმოდგენილი შედეგებით დავადასტურეთ ჩვენს მიერ შემუშავებული ანალიზის მეთოდის პრაქტიკული გამოყენების ეფექტურობა, როგორც სკრინინგ, ასევე დამადასტურებელი ანალიზისთვის.

4.7 ადამიანის სისხლში ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის თვისობრივ - რაოდენობრივი ანალიზის სითხურ ქრომატოგრაფიული - ტანდემური მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდის შემუშავება

ექსპერიმენტის მიზანი

მოცემული ექსპერიმენტის მიზანს წარმოადგენდა ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის თვისობრივ-რაოდენობრივი ანალიზის ოპტიმალური პირობების შემუშავება.

ობიექტი და მასალები

გამოყენებული იყო ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის სტანდარტები. ბიოლოგიურ ობიექტს წარმოადგენდა ადამიანის სისხლი.

აპარატურული გაფორმება

კვლევის დროს ვიყენებდით სითხურ ქრომატოგრაფს – ტანდემური მასსპექტრომეტრით (LC-MS-MS) - AGILENT TECHNOLOGIES 1290 Infinity AGILENT TECHNOLOGIES 6460 Triple quad LC/MS, სვეტი - Zorbax Eclipse, სტაციონარული ფაზა - C18 (100×2.1mm, 1.8µm). ხელსაწყო აგრეთვე აღჭურვილი იყო წინასვეტით - UHPLC GUARD Zorbax Eclipse, სტაციონარული ფაზა - C18 (5×2.1mm, 1.8µm). საანალიზოდ შერჩეული იყო სისტემა: 0.1% ჭიანჭველმჟავას წყალხსნარი (B ხსნარი) : 0.1% ჭიანჭველმჟავას ხსნარი აცეტონიტრილში - 60 : 40 (A ხსნარი), რეჟიმი გრადიენტული (იხილეთ ცხრილი №12), მოძრავი ფაზის დინების სიჩქარე 0.45 მლ/წთ, სვეტის ტემპერატურა 40°C. იონიზაცია მიიღწეოდა დადებითი ელექტროგაფრქვევით (ESI⁺). ქრომატოგრაფირების დრო 10 წთ. სკანირება მიმდინარეობდა მრავალჯერადი რეაქციის მონიტორინგით (MRM).

ცხრილი 12: მოძრავი ფაზის გრადიენტული მიწოდების პირობები

№	დრო	B%	მოძრავი ფაზის დინების სიჩქარე
1	0.00	90.0	0.45
2	2.00	70.0	0.45
3	4.00	60.0	0.45
4	6.00	50.00	0.45
5	10.0	90.00	0.45

ექსპერიმენტი

საკვლევი ნივთიერებების ძირითად ხსნარს ვამზადებდით მეთანოლში კონცენტრაციით 1.0 მგ/მლ. შუალედური ხსნარის მოსამზადებლად ძირითადი ხსნარი განვაზავეთ მეთანოლით 500 ნგ/მლ კონცენტრაციის მისაღებად. საკვლევი ნივთიერებების საკალიბრო ხსნარების მოსამზადებლად მოხდა შუალედური ხსნარის სისხლით განზავება შემდეგი კონცენტრაციების მისაღებად: 10.0, 15.0, 20.0, 30.0, 50.0 და 100 ნგ/მლ. საანალიზო ნიმუშები მომზადდა კონცენტრაციით 10.0, 25.0 და 50.0 ნგ/მლ. ყველა ნიმუში ინახებოდა 4°C ტემპერატურაზე შემდგომი ანალიზებისათვის.

იზოლირების პროცედურა მყარფაზური ექსტრაქციის გამოყენებით

სისხლის ნიმუშებიდან ოლანზაპინის იზოლირებისათვის გამოყენებულ იყო გილსონის GX-271 ASPEC სისტემა კარტრიჯით Supelclean LC-18 SPE 500მგ.

ექსტრაქციის პროცედურა

➤ ნიმუშის წინასწარი დამუშავება

1მლ ნიმუშს დაუმატეთ 4მლ დეიონიზირებული წყალი და 2მლ 100მმ ფოსფატის ბუფერი (pH 6.0).

შეკურიეთ/შეგანჯღრიეთ სტიუარტის როტატორზე და ულტრაბგერით აბაზანაზე ჰომოგენური სტრუქტურის მისაღებად.

მოვახდინე ცენტრიფუგირება 10 წუთის განმავლობაში, 500 ბრ/წთ და მოვაშორეთ ნალექი. მიღებული ნიმუშების pH უნდა იყოს 6.0 ± 0.5 . დავარეგულირეთ pH შესაბამისად 100 მმოლი ერთფუძიანი ნატრიუმის ფოსფატით.

➤ სორბენტის (კარტრიჯის) კონდეცირება

გამოვრეცხეთ 1 x 3 მლ მეთანოლით და გამოვაშრეთ ასპირაციის გზით. გამოვრეცხეთ 1 x 3მლ დეიონიზირებული წყლით და გამოვაშრეთ ასპირაციის გზით.

გამოვრეცხეთ 1 x 1 მლ 100 მოლი ფოსფატური ბუფერით (pH 6.0) და გამოავშრეთ ასპირაციის გზით. ასპირაცია უნდა მოხდეს არაუმეტეს 76.2 მმეწყ. სვ. საანალიზო ნიმუშის მოთავსება მოვახდინეთ ნაკადით 1მლ/წთ.

➤ სორბენტის ჩარეცხვა

სორბენტის ჩამორცხვა მოვახდინეთ რამოდენიმე ეტაპად: I. 3 მლ დეიონიზირებული წყლით, II. 1 მლ 100მმოლი ძმარმჟავით, III. 3 მლ

მეთანოლით. ყველა ეტაპის შემდეგ გაშრობით ასპირაციის გზით 5 წუთის განმავლობაში არაუმეტეს 254 მმვწყ. სვ.

➤ ელუირება

ელუირებას ვახდენდით 3მლ ნარევიტ რომელიც შეიცავდა მეთილენქლორიდს (CH_2Cl_2)/იზოპროპილის სპირტს (IPA)/ამონიუმის ჰიდროქსიდს (NH_4OH), 78:20:2 თანაფარდობით.

შეგროვებული ელუატისთვის გამსხნელად გამოვიყენეთ ახალად მომზადებული ნარევი. 40მლ იზოპროპანოლს დავემატეთ 4მლ კონცენტრირებული ამონიუმის ჰიდროქსიდი, შეურიეთ და დავემატეთ 156მლ მეთილენქლორიდი და განმეორებით შევეურიეთ.

➤ პროცედურის დასრულების შემდეგ მიღებული ნარევი მოვათავსე კონცენტრატორში და ავაორთქლეთ არაუმეტეს 40°C ტემპერატურაზე გამომშრალ მდგომარეობამდე.

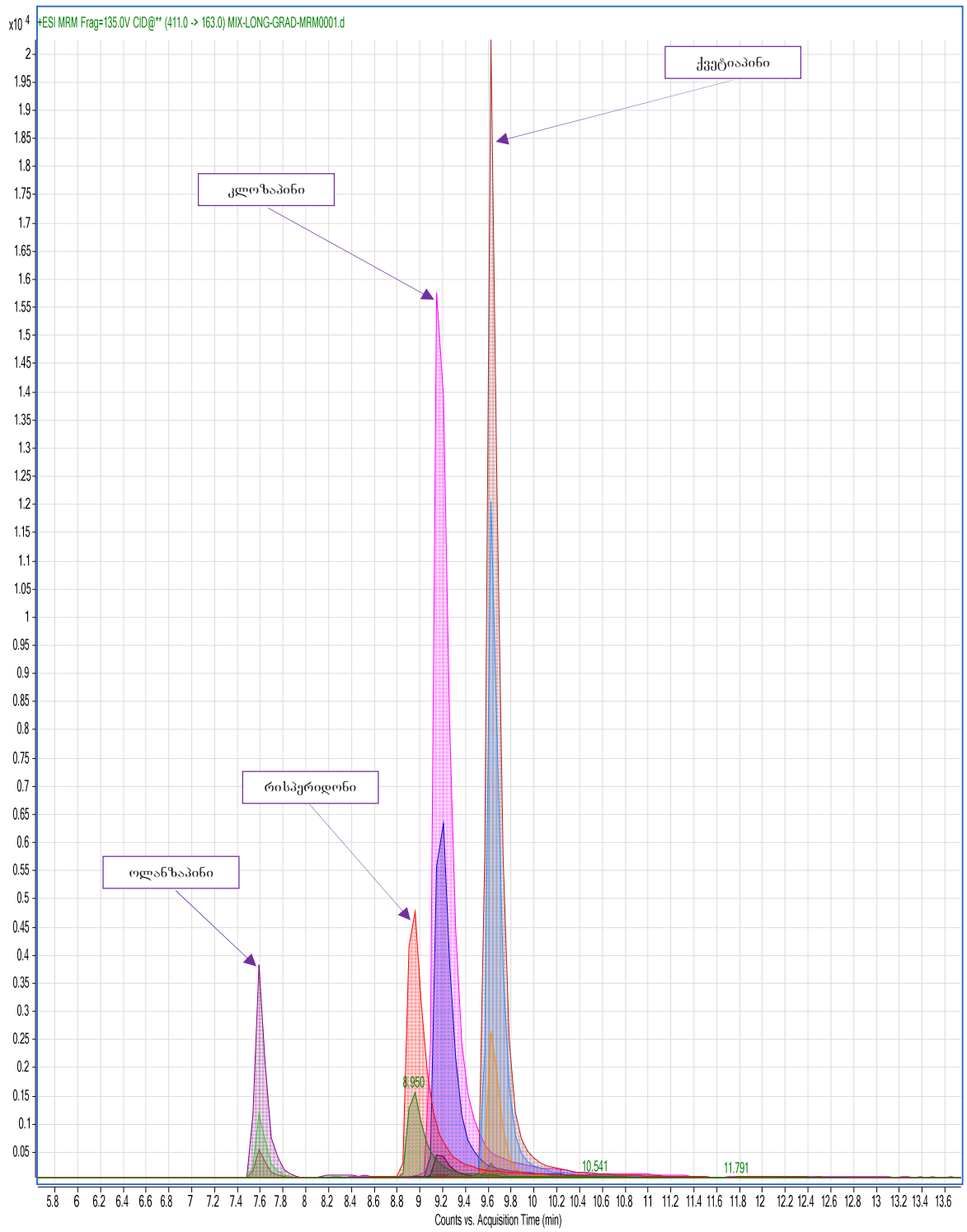
➤ საანალიზო ნიმუშის მომზადება – მიღებული მშრალი მასა გავსხენით 200მკლ ნარევიტ, რომელიც შეიცავდა აცეტონტრილის და დეიონიზირებულ წყალს 1:3 თანაფარდობით. კარგად შევეურიეთ/შევანჯღრიეთ 30 წამის განმავლობაში და მოვახდინეთ ქრომატოგრაფში ინექცირება 5მკლ-ის ოდენობით.

ანალიზის შედეგად მიღებული ქრომატოგრამები იხილეთ №29-38 სურათზე.

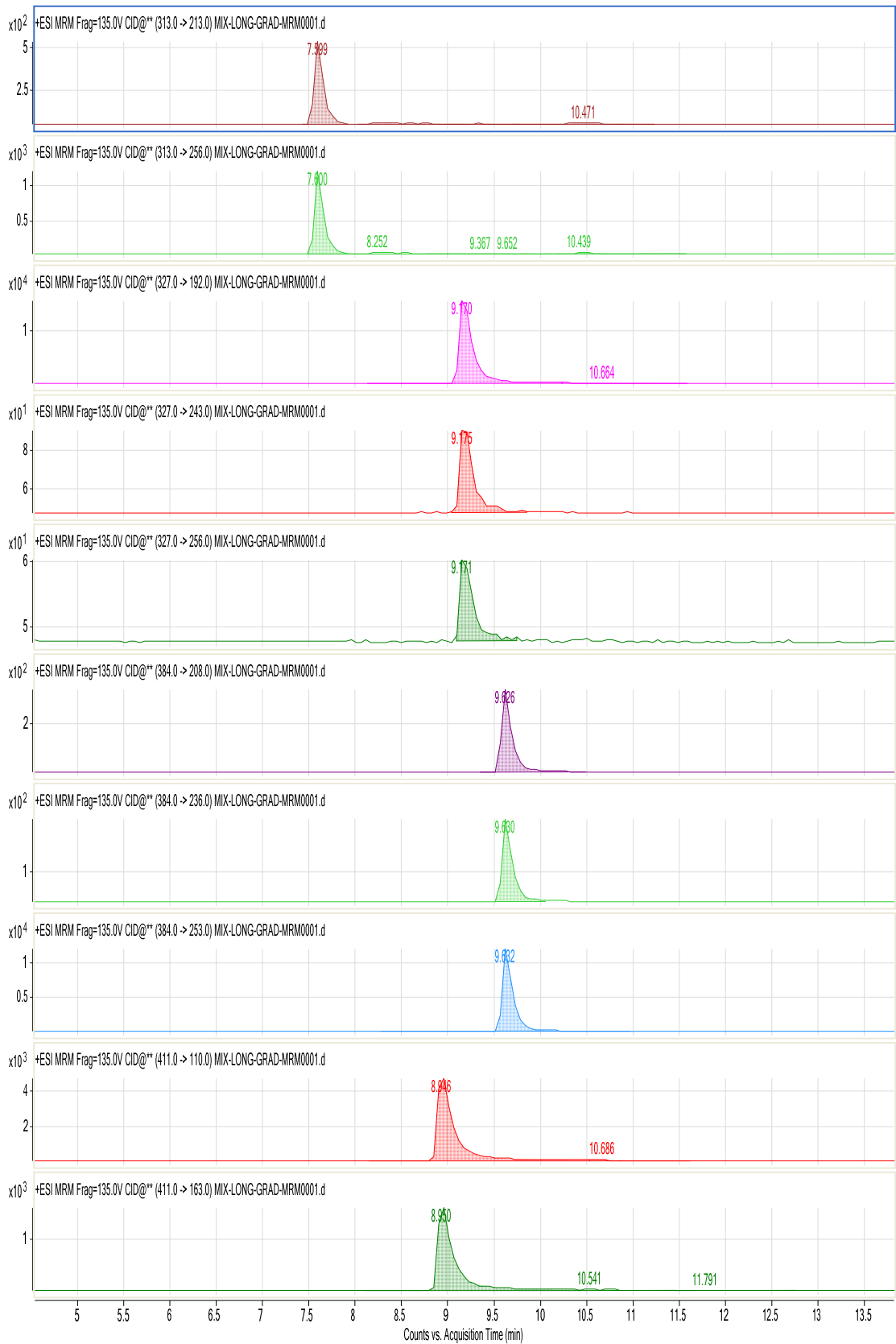
ქრომატოგრამების მიხედვით საანალიზო ნივთიერებების თვისობრივი და რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის ოპტიმალური MRM ტრანზაქცია არის:

- ოლანზაპინი m/z 313 \rightarrow 198, m/z 313 \rightarrow 213, m/z 313 \rightarrow 256;
- რისპერიდონი m/z 411 \rightarrow 110, m/z 411 \rightarrow 163, m/z 411 \rightarrow 191;
- ქვეტიაპინი m/z 384 \rightarrow 208, m/z 384 \rightarrow 221; m/z 384 \rightarrow 236, m/z 384 \rightarrow 253, m/z 384 \rightarrow 279;
- კლოზაპინი m/z 327 \rightarrow 192, m/z 327 \rightarrow 227, m/z 327 \rightarrow 243, m/z 327 \rightarrow 256, m/z 327 \rightarrow 270.

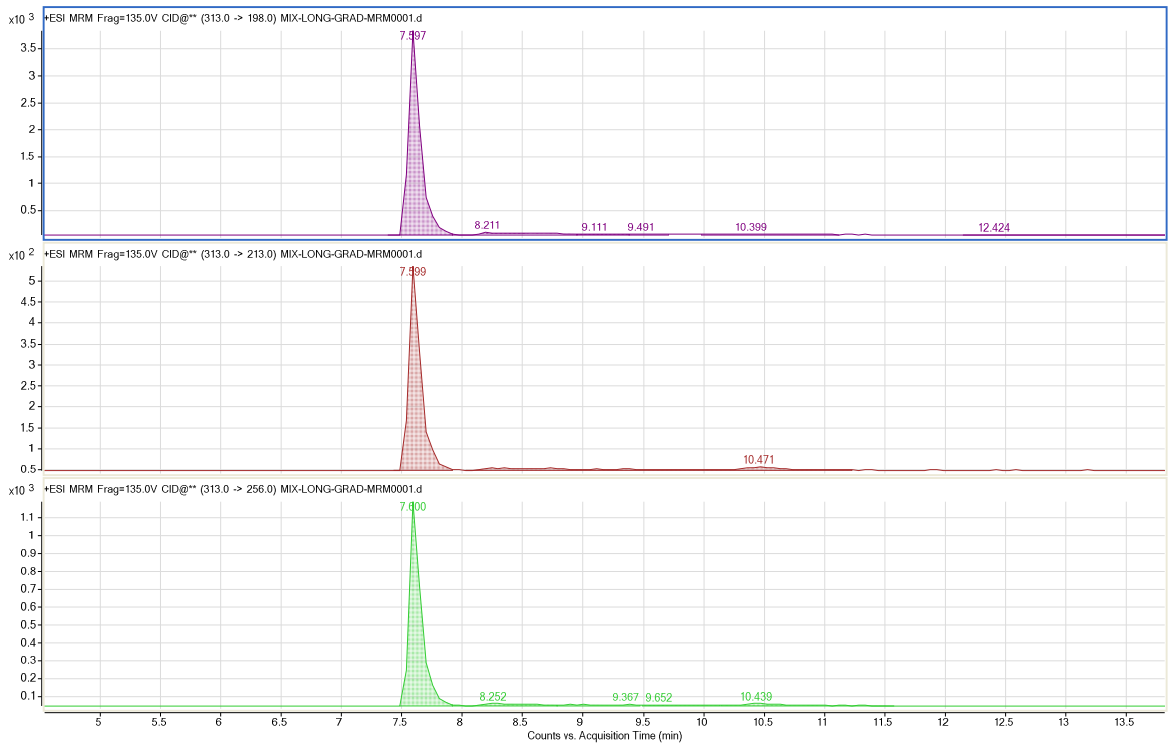
მოვახდინეთ შემუშავებული მეთოდების ვალიდაცია, იხილეთ ქვეთავი 4.12.



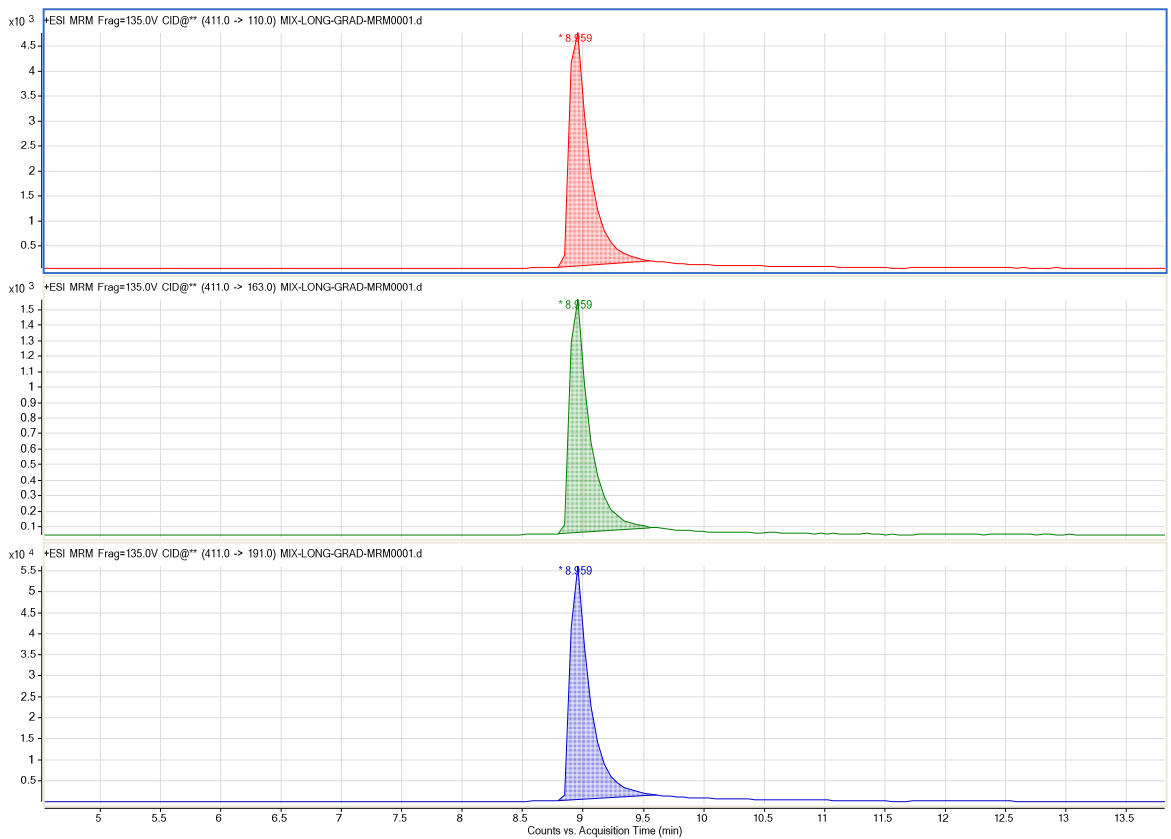
სურათი 29: ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის MRM ქრომატოგრამა



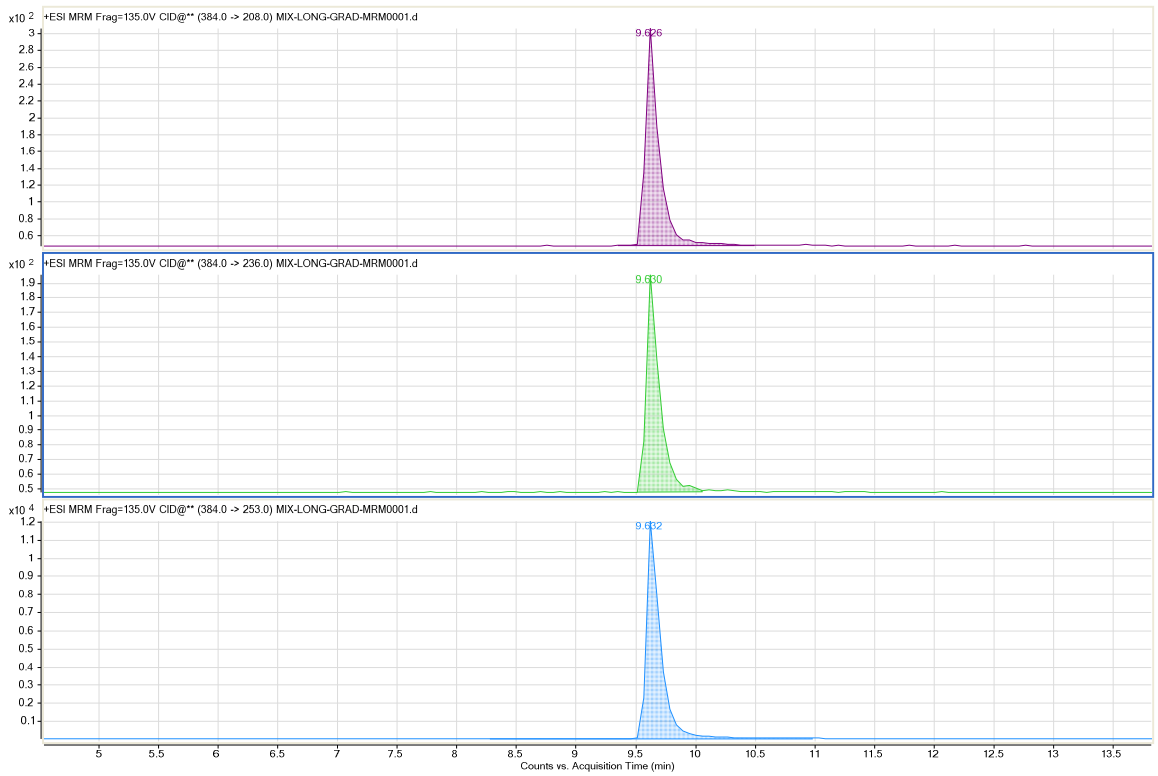
სურათი 30: ოღანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის MRM ქრომატოგრამები



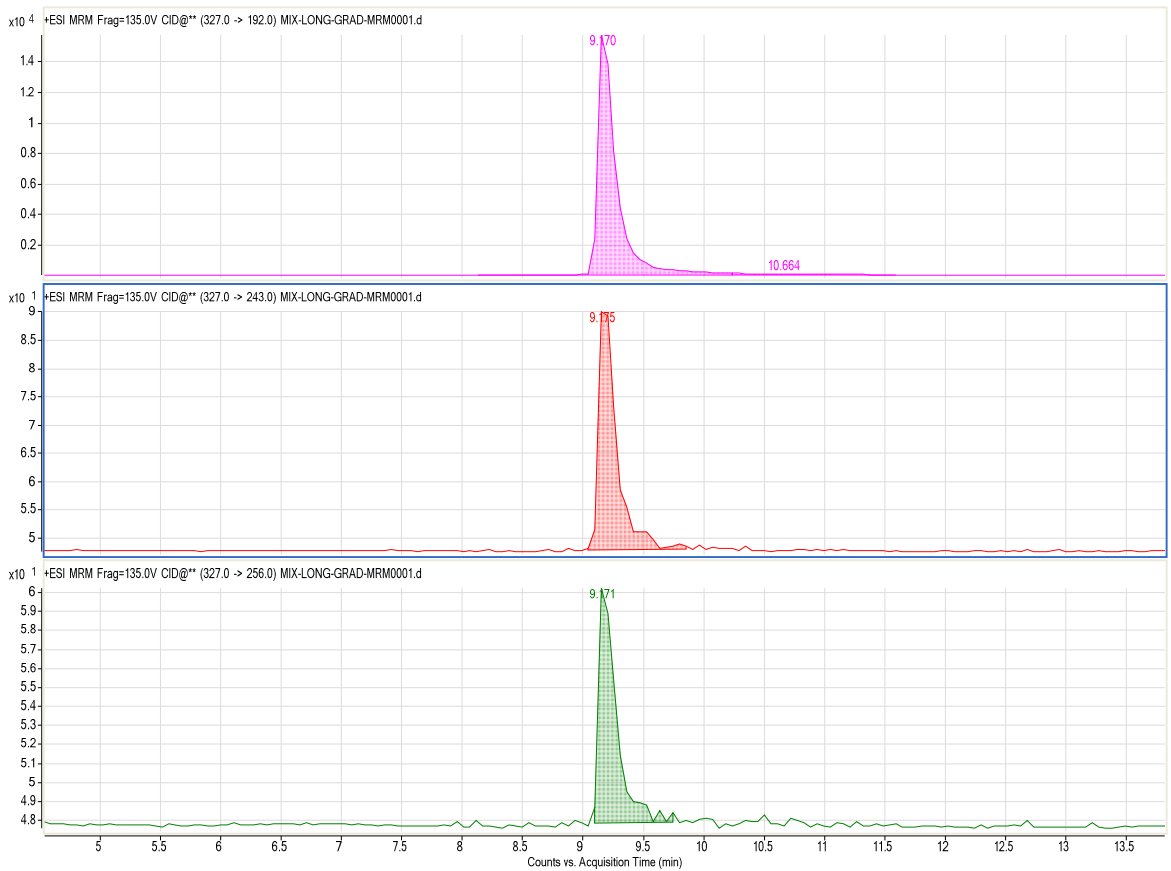
სურათი 31: ოლანზაპინის MRM ქრომატოგრამები



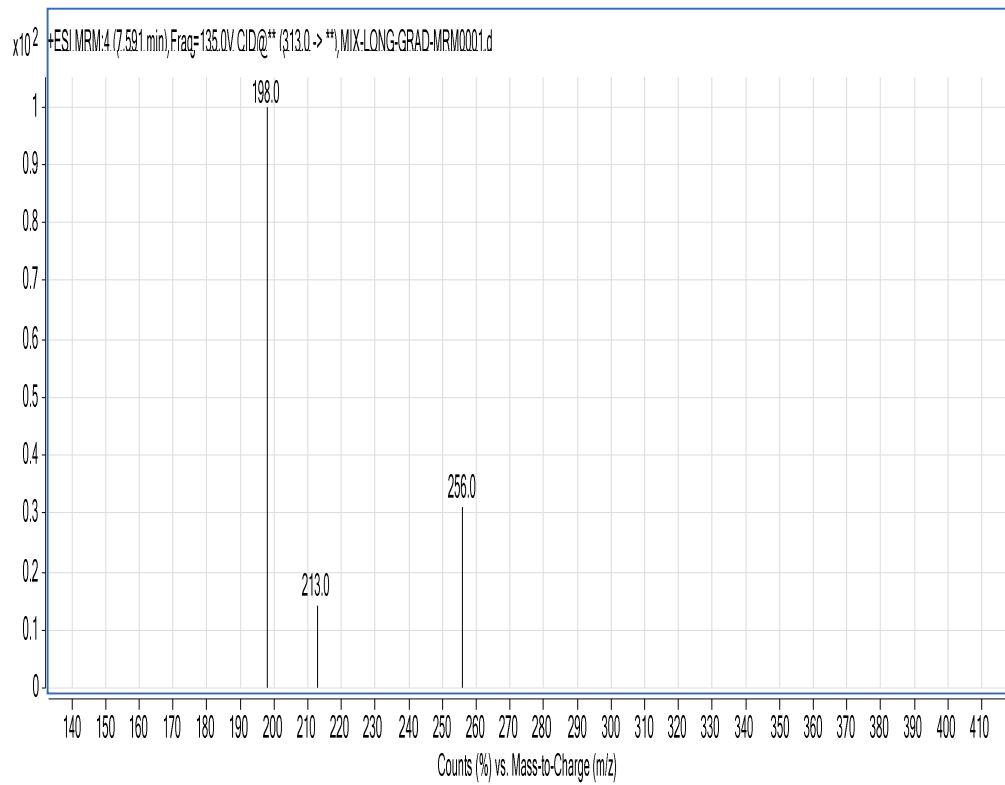
სურათი 32: რისპერიდონის MRM ქრომატოგრამები



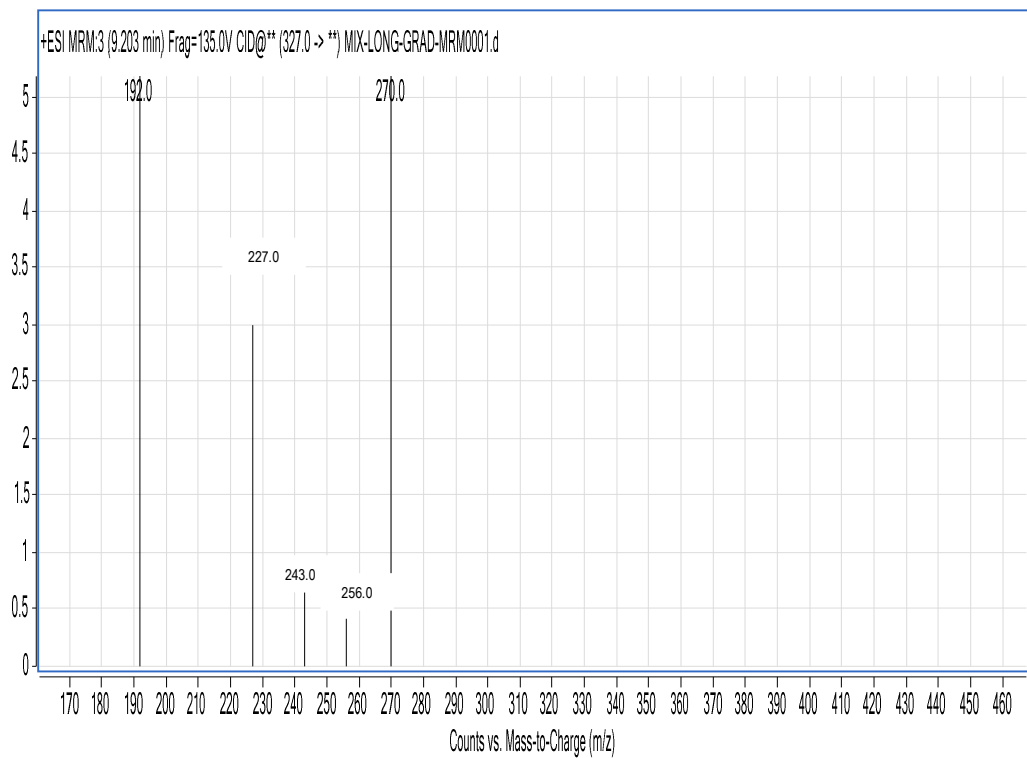
სურათი 33: ქვეტიპინის MRM ქრომატოგრამები



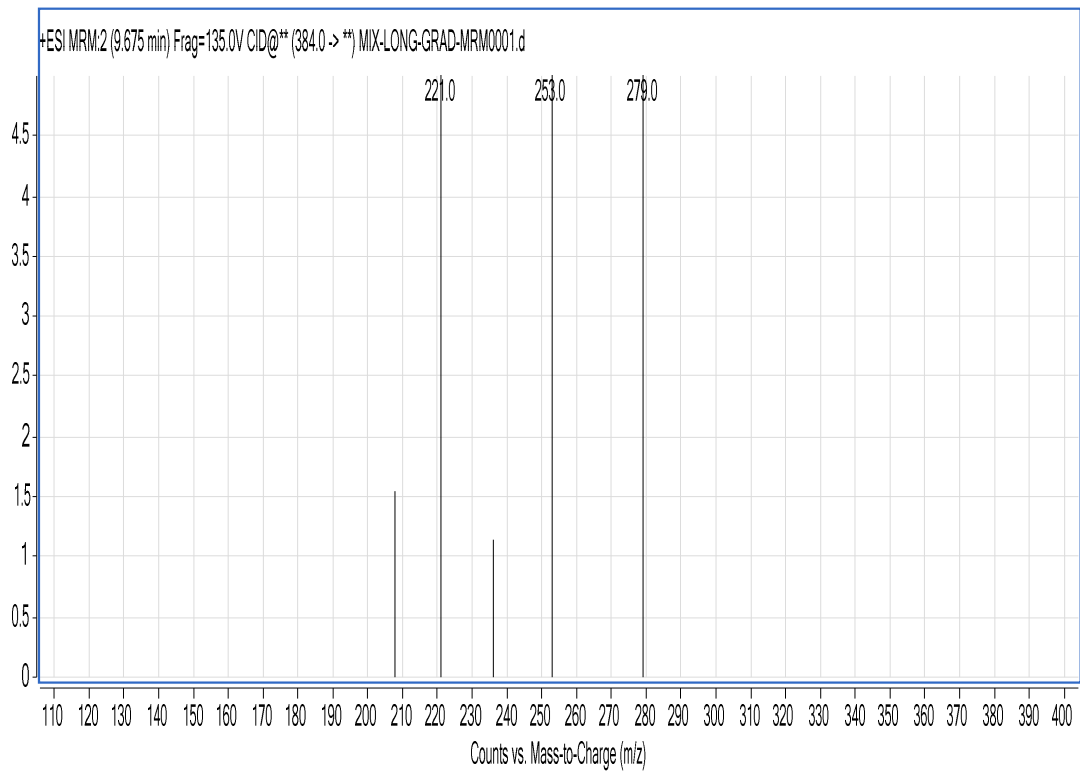
სურათი 34: კლოზაპინის MRM ქრომატოგრამა



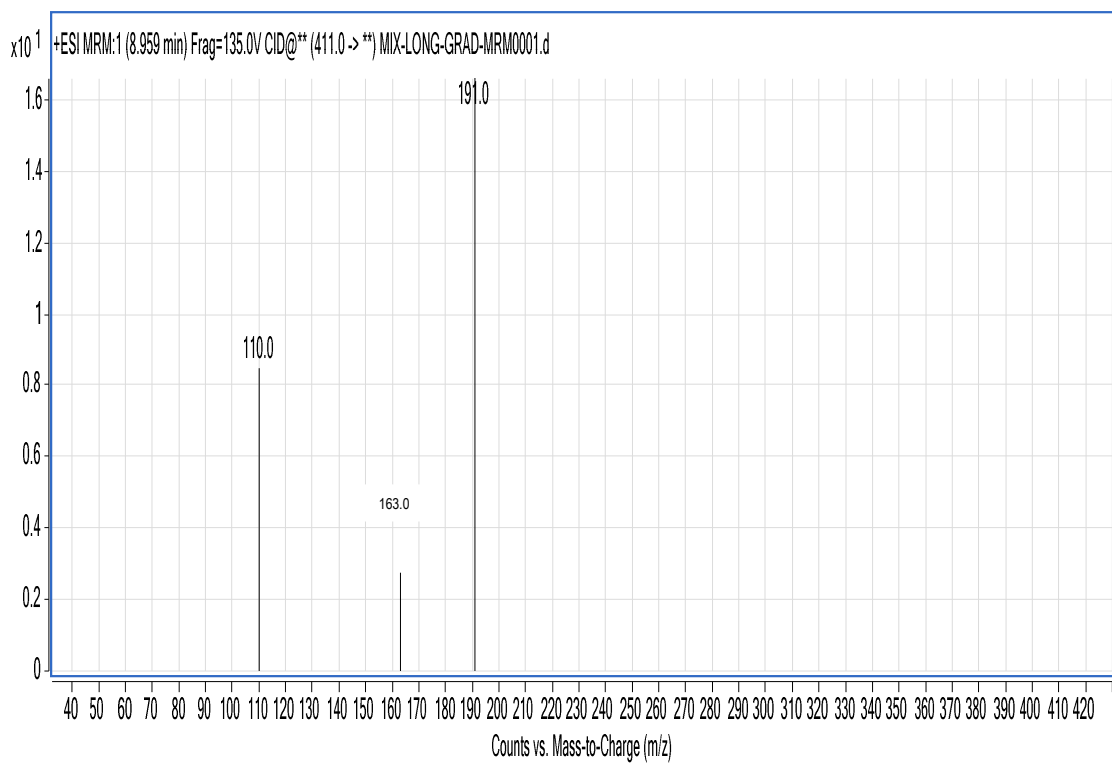
სურათი 35: ოღანზაპინის MS/MS მასსპექტრი



სურათი 36: კლოზაპინის MS/MS მასსპექტრი



სურათი 37: ქვეტიამინის MS/MS მასსპექტრი



სურათი 38: რისპერიდონის MS/MS მასსპექტრი

4.8 ადამიანის პლაზმაში და შარდში ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ანალიზი სითხურ ქრომატოგრაფიული – ტანდემური მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდით

ექსპერიმენტის მიზანი

ექსპერიმენტის მიზანს წარმოადგენდა ადამიანის პლაზმაში და შარდში ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ანალიზი ექსპერიმენტით შემუშავებული სითხურ ქრომატოგრაფიული - ტანდემური მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდით.

ობიექტი, მასალები და მეთოდები

ბიოლოგიურ ობიექტებს წარმოადგენდა ადამიანის პლაზმა და შარდი. მყარფაზური ექსტრაქციისათვის გამოიყენებოდა სორბენტი Supelclean LC-18 SPE. კვლევის დროს ანალიზისათვის ვიყენებდით სითხურ ქრომატოგრაფს – ტანდემური მასსპექტრომეტრით.

ექსპერიმენტისთვის *in vitro* მოდელური ნიმუშების მოსამზადებლად გამოყენებული იყო სედარექსის, ოლზაპის, აზალეპტინის, ქვეტიაპინი ფუმარატის ტაბლეტები.

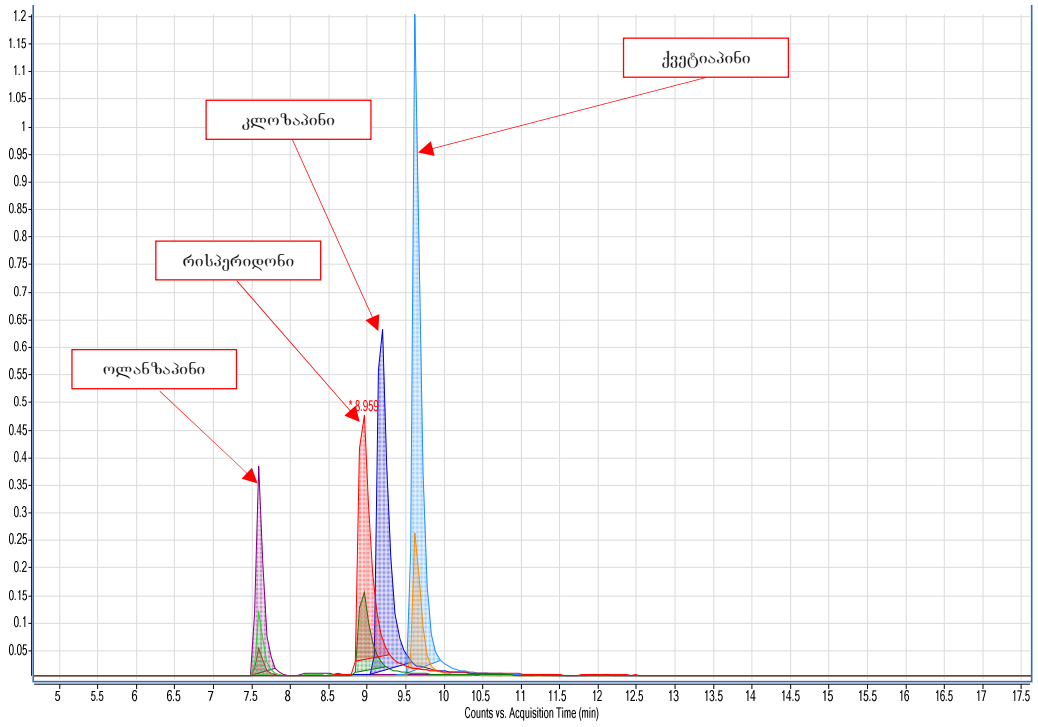
ექსპერიმენტი

მედიკამენტების ტაბლეტები მოვსრისეთ როდინში ჰომოგენური მასის მიღებამდე. მიღებული ფხვნილის საშუალებით მოვამზადეთ სედარექსის, ოლზაპის, აზალეპტინის, ქვეტიაპინის 1.0 მგ/მლ კონცენტრაციის ძირითადი ხსნარები მეთანოლში, აქტიურ ნივთიერებებზე გადაანგარიშებით.

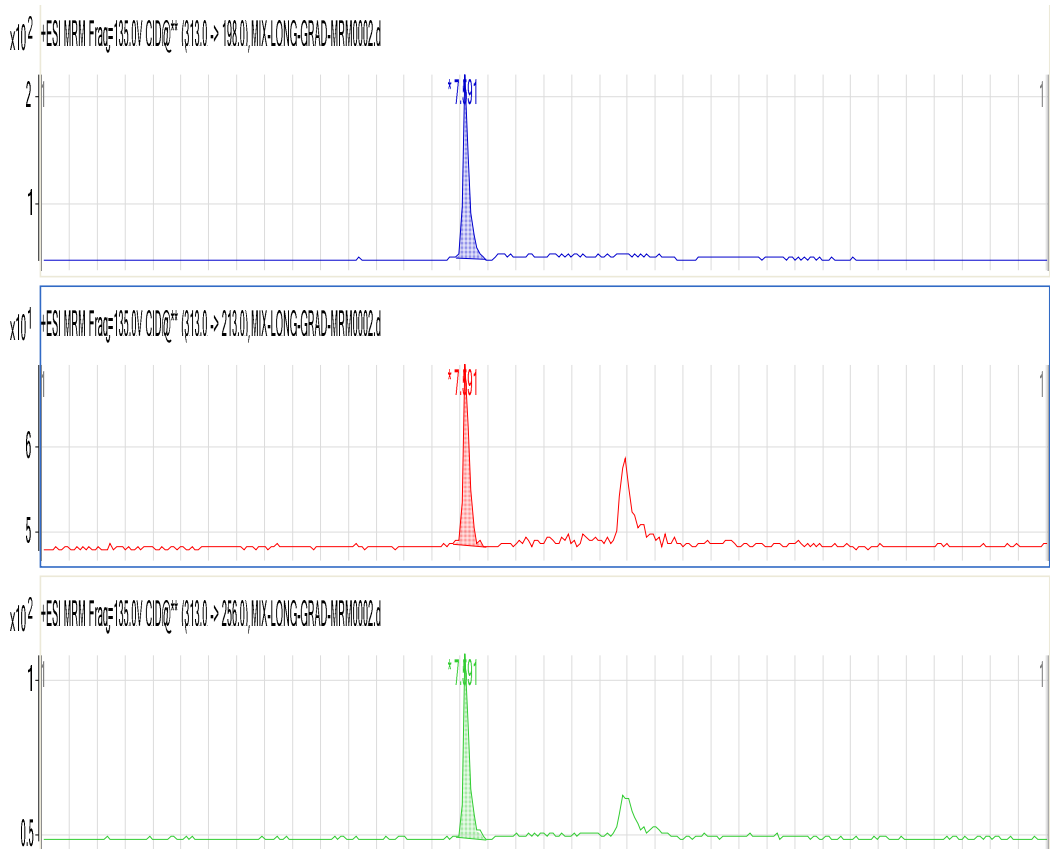
ძირითადი ხსნარების პლაზმაში და შარდში განზავებით მოვამზადეთ საანალიზო ნიმუშები კონცენტრაციით 10 ნგ/მლ.

იზოლირების და ანალიზის პირობები იხილეთ ქვეთავში 4.7.

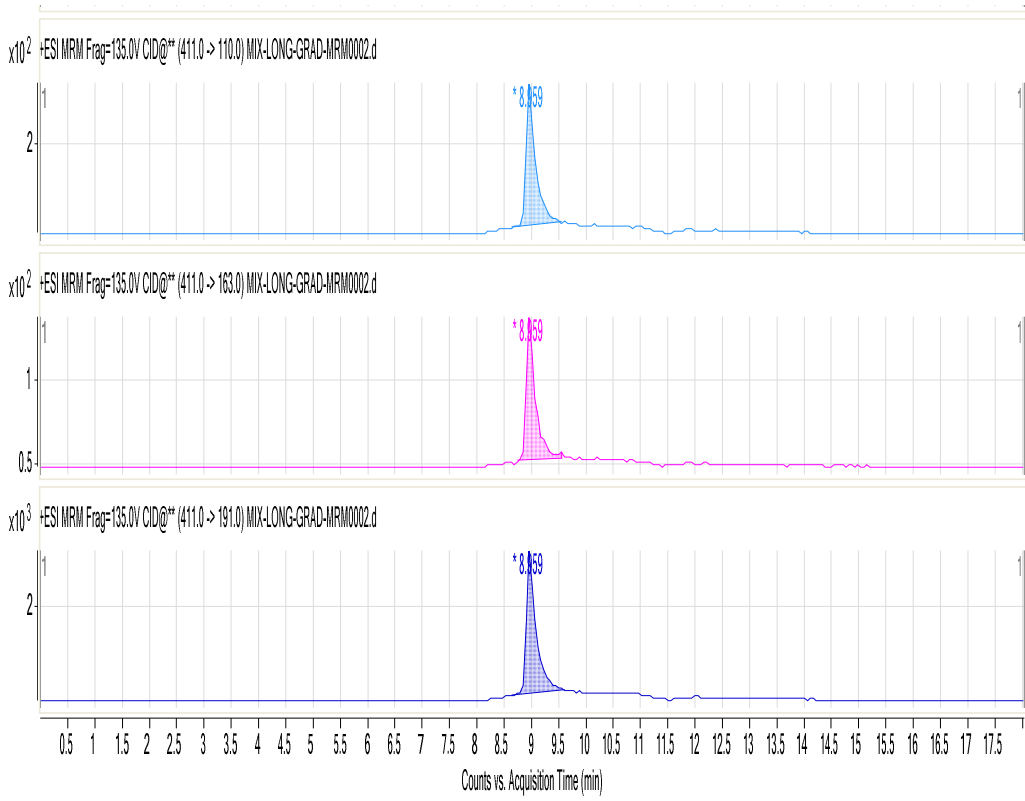
ანალიზის შედეგად მიღებული ქრომატოგრამები მოცემულია №39-47 სურათზე.



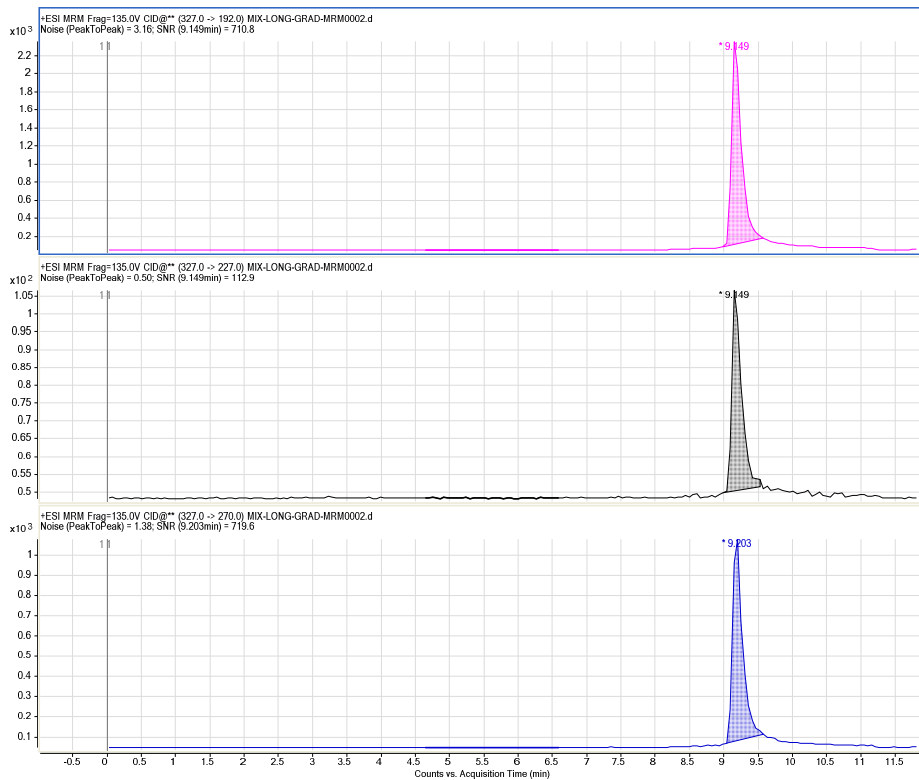
სურათი 39: პლაზმაში ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეციაპინის და კლონაპინის MRM ქრომატოგრა



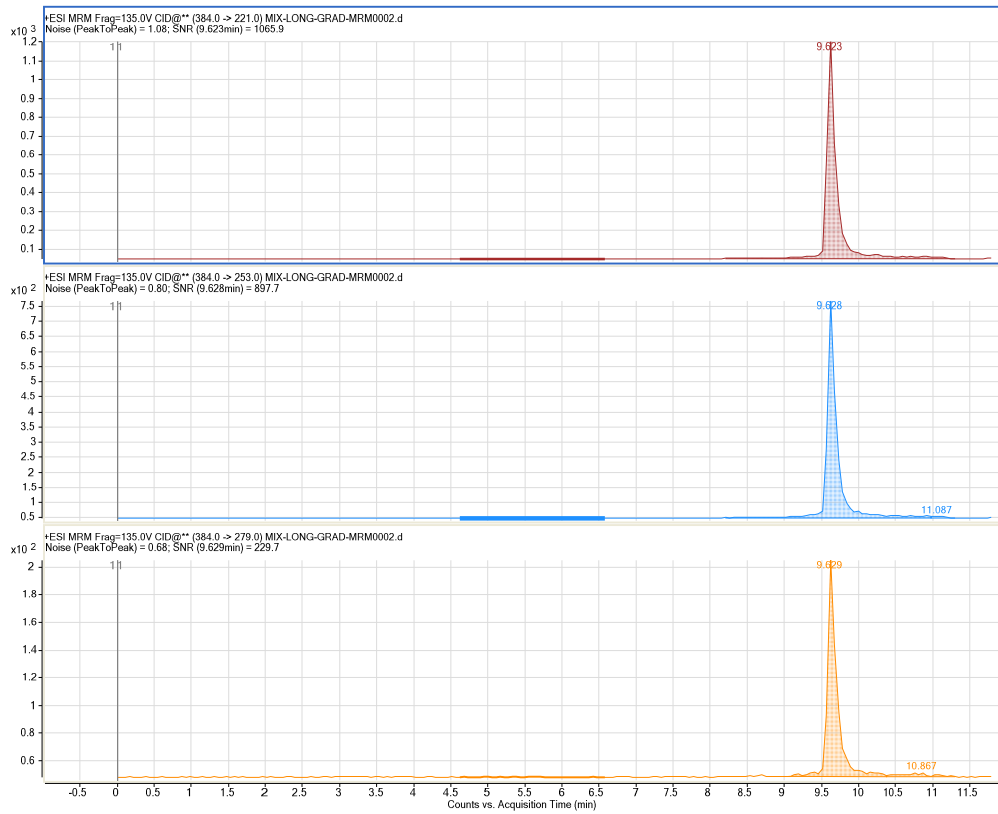
სურათი 40: პლაზმაში ოლანზაპინის MRM ქრომატოგრაფები



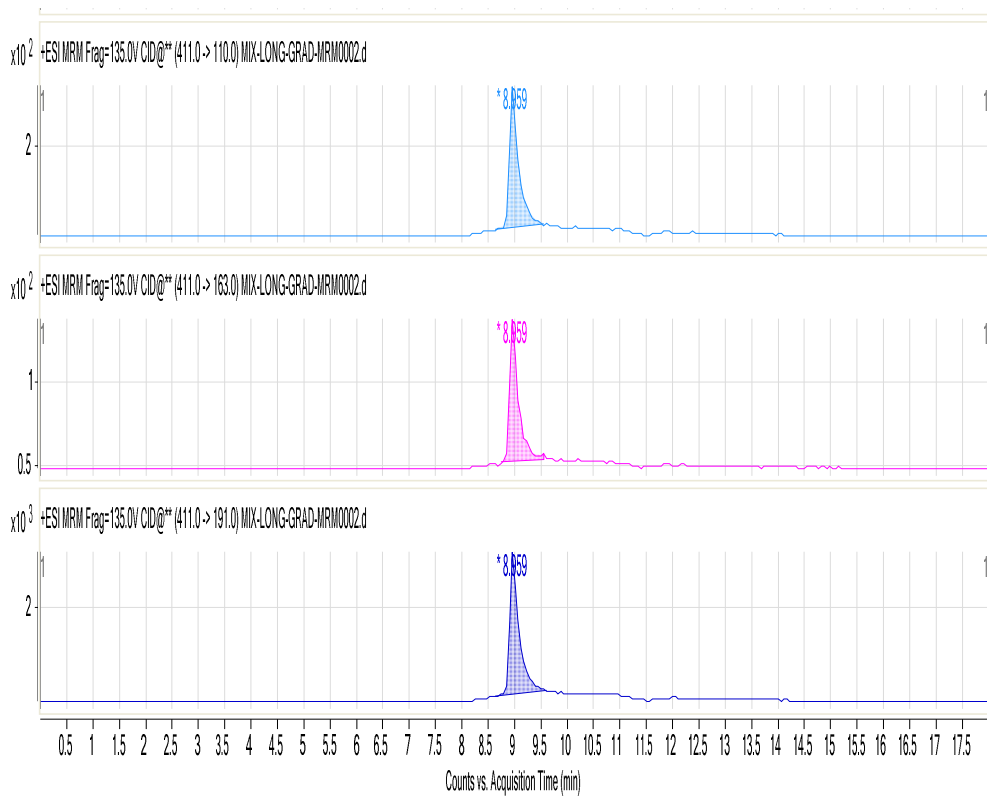
სურათი 41: პლაზმაში რისპერიდონის MRM ქრომატოგრამები



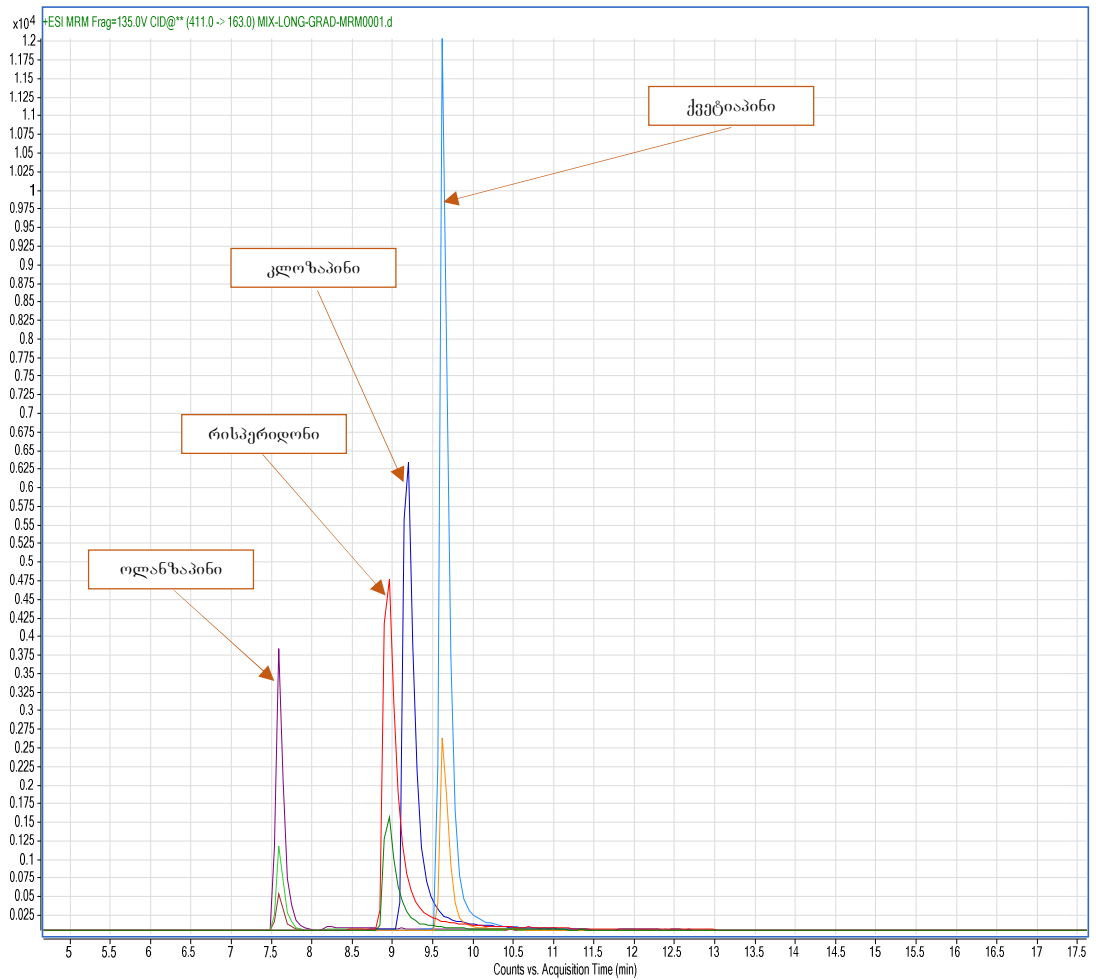
სურათი 42: პლაზმაში კლოზაპინის MRM ქრომატოგრამები



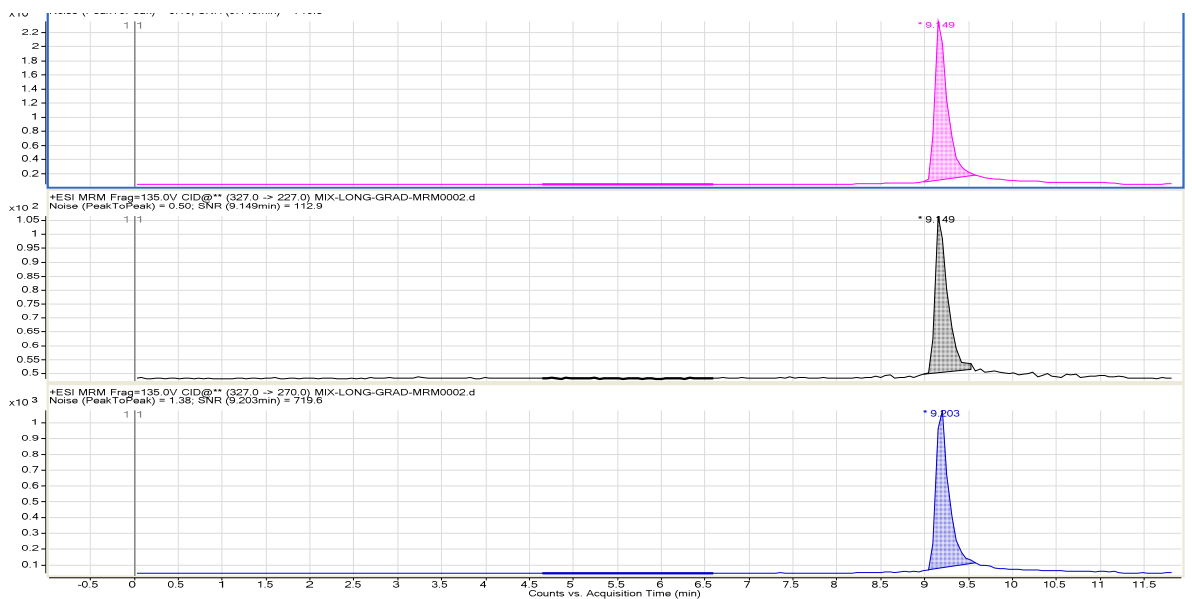
სურათი 43: პლაზმაში ქვეტიაპინის MRM ქრომატოგრამები



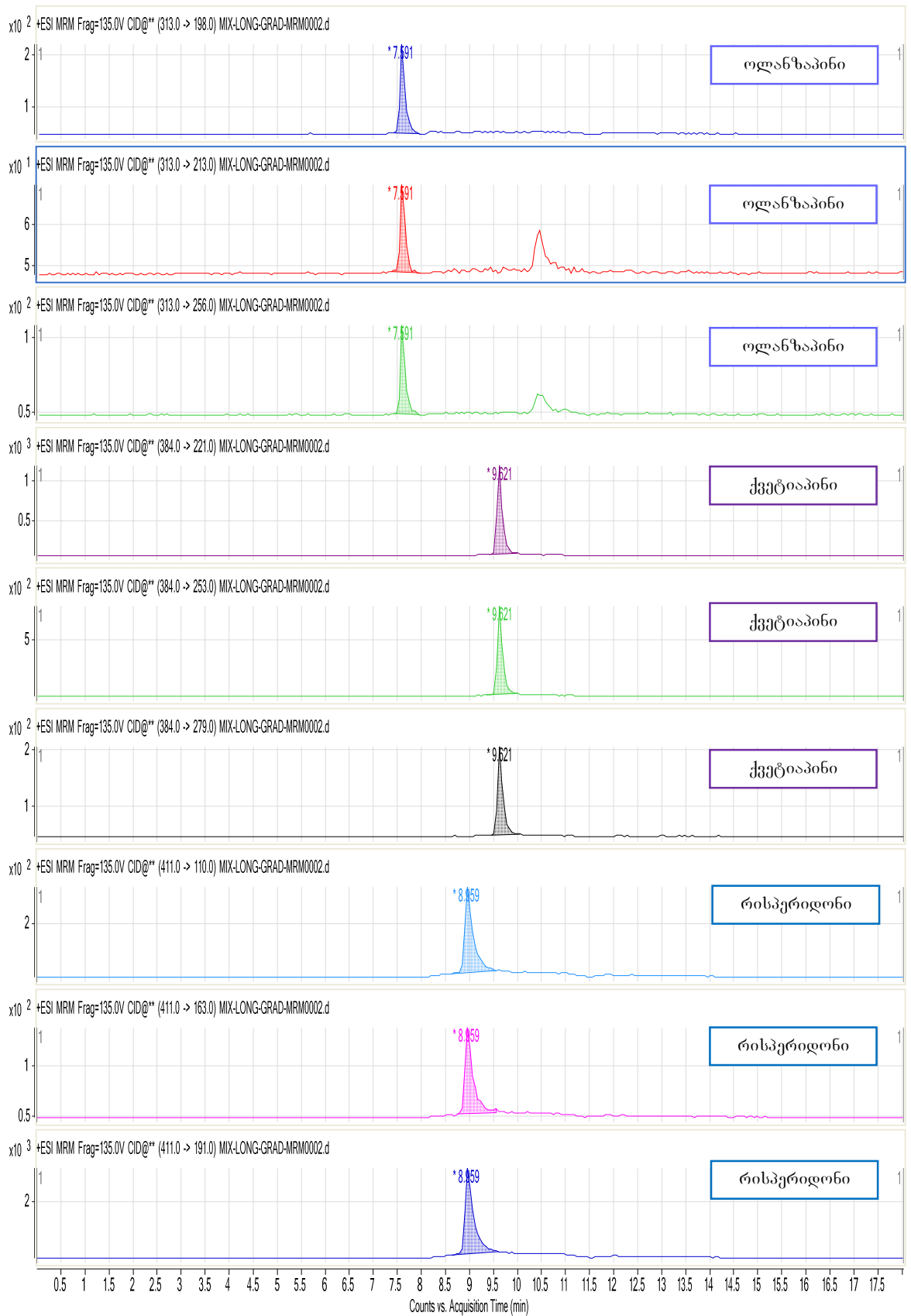
სურათი 44: პლაზმაში რისპერიდონის MRM ქრომატოგრამები



სურათი 45: შარდში ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის MRM ქრომატოგრა



სურათი 46: შარდში კლოზაპინის MRM ქრომატოგრაფები



სურათი 47: შარღში ოლანზაპინის, რისპერიდონის და ქვეტიაპინის MRM ქრომატოგრამებები

ქრომატოგრამაზე წარმოდგენილია სამიზნე ნივთიერებები პიკები, რომელთა შეკავების დრო ემთხვევა ჩვენს მიერ შემუშავებული, ვალიდირებული მეთოდით ანალიზისას მიღებული ქრომატოგრამებზე შესაბამისი ნივთიერების შეკავების დროს.

შესაბამისად, წარმოდგენილი შედეგებით დაგადასტურეთ, რომ ჩვენს მიერ ექსპერიმენტის შედეგად შემუშავებული ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ანალიზის სითხურ ქრომატოგრაფიული - ტანდემური მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდი შესაძლებელია გამოყენებული იყოს პლაზმაში და შარდში მოცემული სამიზნე ნივთიერებების განსაზღვრისათვის.

4.9 გარდაცვლილი ადამიანის სისხლში ოლანზაპინის და კლოზაპინის ერთდროული თვისობრივი ანალიზი სითხური ქრომატოგრაფიული – ტანდემური მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდით

ექსპერიმენტის მიზანი

ექსპერიმენტის მიზანს წარმოადგენდა გარდაცვლილი ადამიანის სისხლში ოლანზაპინის და კლოზაპინის ერთდროული ანალიზი ჩვენს მიერ ექსპერიმენტით შემუშავებული სითხურ ქრომატოგრაფიული – ტანდემური მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდით.

ობიექტი და მეთოდები

კვლევის ობიექტს წარმოადგენდა გარდაცვლილი ადამიანის სისხლი, რომელიც ანალიზისთვის მიღებული იყო სსიპ ლევან სამხარაულის სახელობის სასამართლო ექსპერტიზის ეროვნული ბიუროში. უნდა ჩატარებულიყო მიზანმიმართული ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზი, რადგან შემთხვევის ადგილიდან ამოღებული იყო კლოზაპინის და ოლანზაპინის ცარიელი ბლისტერები. ექსპერტიზას უნდა დაედგინა შეიცავდა თუ არა სისხლის ნიმუში სამიზნე ნივთიერებებს.

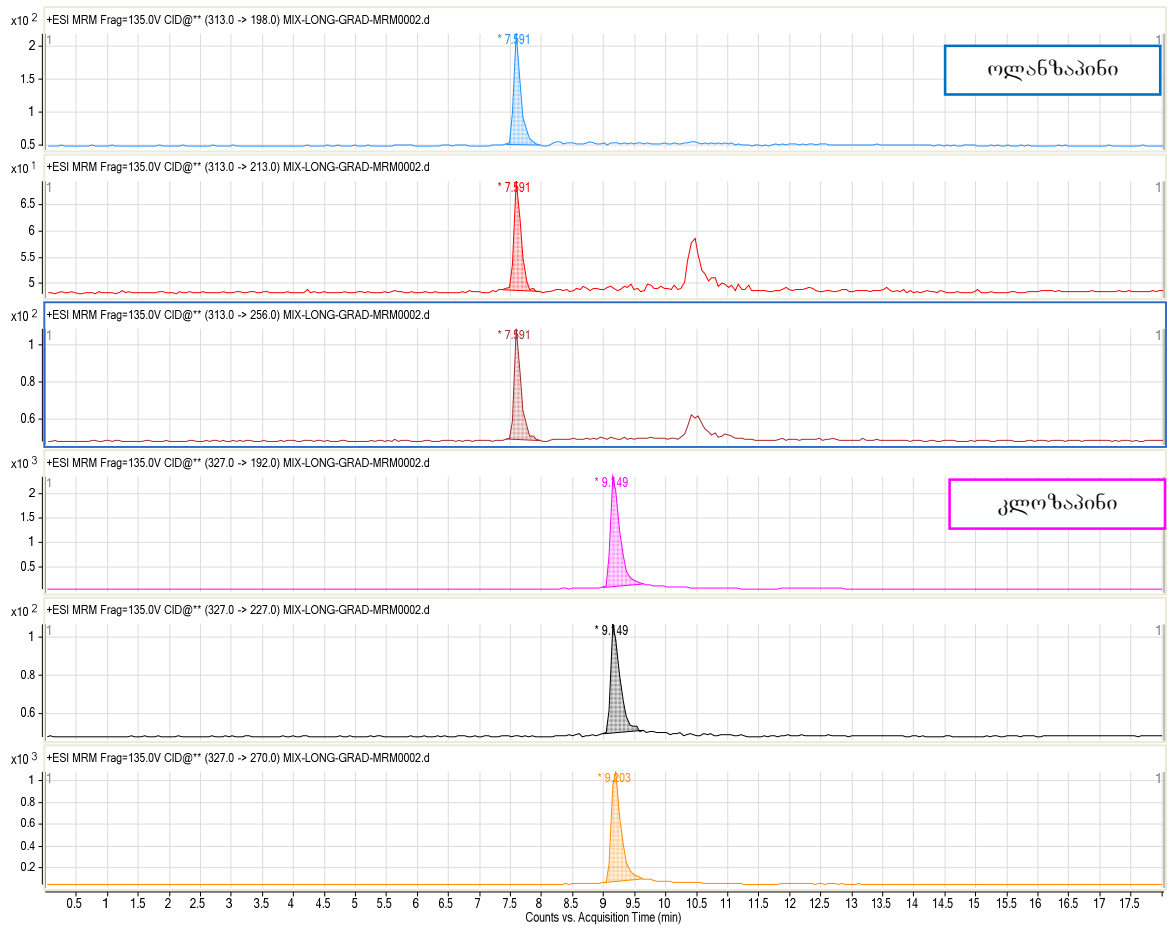
საკვლევი ნივთიერებების იზოლირება მოხდა მყარფაზური ექსტრაქციის გამოყენებით (სორბენტი Supelclean LC-18 SPE), ხოლო ანალიზი სითხური ქრომატოგრაფია – ტანდემური მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS).

ექსპერიმენტი

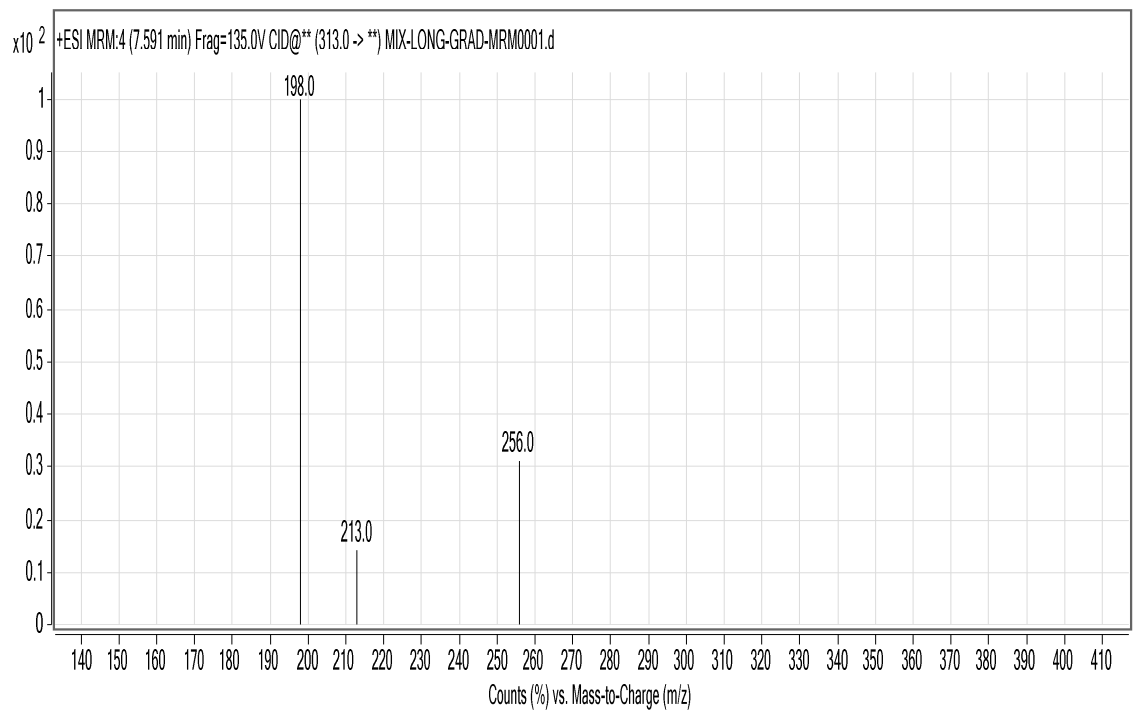
საანალიზოდ აღებული იყო სისხლი 3 მლ ოდენობით.

იზოლირების და ანალიზის პირობები იხილეთ ქვეთავში 4.7.

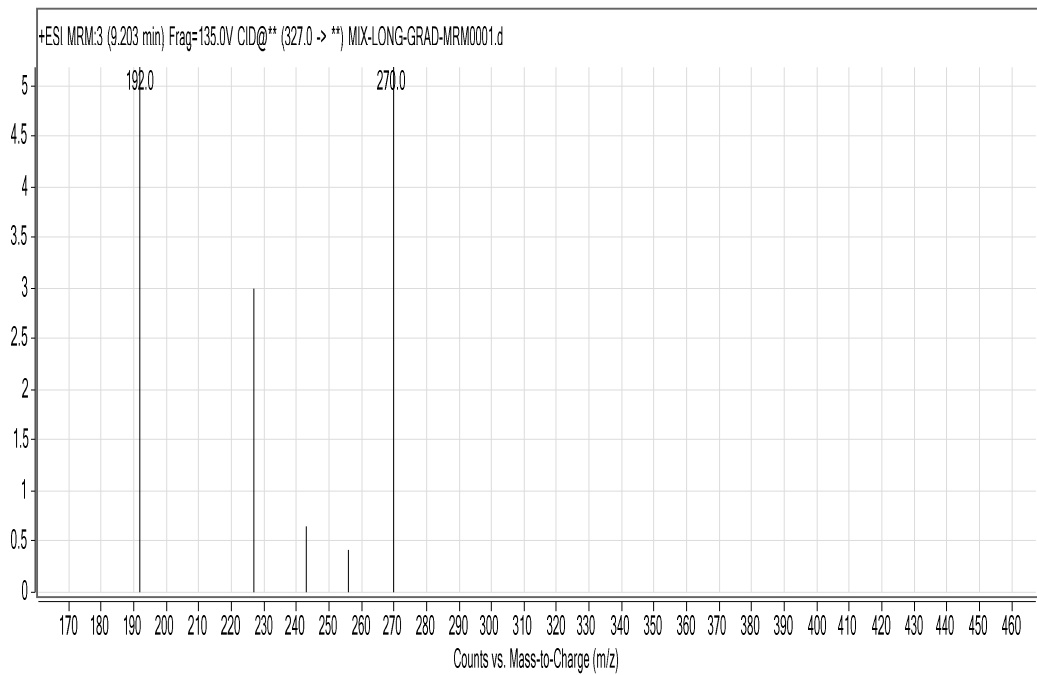
ანალიზის შედეგად მიღებული ქრომატოგრამები და მასსპექტრები მოცემულია №48-50 სურათზე.



სურათი 48: სისხლში ოლანზაპინის და კლოზაპინის MRM ქრომატოგრამები



სურათი 49: სისხლში ოლანზაპინის MS/MS მასსპექტრი



სურათი 50: სისხლში კლოზაპინის MS/MS მასსპექტრი

ქრომატოგრამაზე წარმოდგენილია ოლანზაპინის და კლოზაპინის პიკები, შეკავების დროით 7.5 წთ და 9.2 წთ, რომლებიც მივიღეთ შემდეგი MRM ტრანზაქციის პირობებში ოლანზაპინი m/z 313 \rightarrow 198, m/z 313 \rightarrow 213, m/z 313 \rightarrow 256; კლოზაპინი m/z 327 \rightarrow 192, m/z 327 \rightarrow 227, m/z 327 \rightarrow 270; მასსპექტრების საშუალებით მოვახდინეთ გარდაცვლილი ადამიანის სისხლში სამიზნე ნივთიერებების იდენტიფიკაცია, ხოლო ქრომატოგრამაზე მოცემულ პიკებზე შეკავების დრო ემთხვევა ჩვენს მიერ შემუშავებული, ვალიდირებული მეთოდის ანალიზისას მიღებული ქრომატოგრამებზე შესაბამისი ნივთიერების შეკავების დროს.

წარმოდგენილი შედეგებით დავადასტურეთ, რომ ჩვენს მიერ ექსპერიმენტის შედეგად შემუშავებული ანალიზის სითხურ ქრომატოგრაფიული - ტანდემური მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდი შესაძლებელია გამოყენებული იყოს მიზანმიმართული ანალიზისთვის საკვლევი ნივთიერებების, როგორც ინდივიდუალური ასევე მათი ერთდროული განსაზღვრისთვის და ჩართული იყოს ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზის სქემაში.

4.10 ფარმაცევტული წარმოების პროცესში გამოყენებულ დანადგარებზე აქტიური ნივთიერების ნარჩენი კონტამინაციის განსაზღვრა სითხურ ქრომატოგრაფიული - ტანდემური მასსპექტრომეტრული მეთოდით

ექსპერიმენტის მიზანი

კარგი საწარმოო პრაქტიკის მოთხოვნების მიხედვით, პროდუქტის წარმოების შემდეგ დანადგარები უნდა შემოწმდეს აქტიური ნივთიერების ნარჩენ რაოდენობაზე, რათა არ მოხდეს კონტამინაცია შემდეგი პროდუქტის დამზადებისას. ნებისმიერი ნარჩენი სამედიცინო თვალსაზრისით უნდა იყოს უსაფრთხო, არ უნდა ახდენდეს გავლენას პროდუქტის ხარისხზე. წარმოების შემდგომი დასუფთავება ჩაითვლება არასრულფასოვნად, იმ შემთხვევაში თუ დანადგარიდან აღებული სინჯი შეიცავს დასაშვებ ზღვარზე მეტი რაოდენობით ნარჩენებს. შესაბამისად, მნიშვნელოვანია არსებობდეს მაღალი მგრძობელობის სპეციფიური მეთოდი, რომლის საშუალებითაც მოხდება დანადგარზე არსებული მცირე რაოდენობით სამიზნე აქტიური ნივთიერების თვისობრივ-რაოდენობრივი ანალიზი [149, 218].

ექსპერიმენტის მიზანს წარმოადგენდა დასუფთავების შემდეგ აღებულ სინჯში აქტიური ნივთიერების ნარჩენი რაოდენობის განსაზღვრისათვის ჩვენს მიერ ვალიდირებული სითხურ ქრომატოგრაფიული - ტანდემური მასსპექტრომეტრული მეთოდის პრაქტიკული აპრობაცია.

ობიექტი და მასალები

ექსპერიმენტისთვის გამოყენებული იყო სედარექსის ტაბლეტები და საწარმო პროცესის დასრულების შემდეგ დასუფთავებული დანადგარიდან აღებული სინჯი. მომწოდებელი ფარმაცევტული საწარმო „GM Pharmaceuticals”, საქართველო.

აპარატურული გაფორმება

გამოყენებული აპარატურა, ქრომატოგრაფირების და დეტექტირების პირობები იხილეთ ქვეთავში 4.7.

ექსპერიმენტი

სტანდარტული ხსნარის მომზადება

გავხსენით სედარექსი 1მგ №10 ტაბლეტის ბლისტერი და ამოვიღეთ ტაბლეტები, რომელიც მოვსრისეთ როდინში ჰომოგენური მასის მიღებამდე. ფხვნილის საშუალებით მოვამზადეთ 1.0 მგ/მლ კონცენტრაციის ძირითადი ხსნარი

მეთანოლში, სუფთა რისპერიდონზე გადაანგარიშებით. ძირითადი ხსნარი განვაზავეთ მეთანოლით, რომ მიგველო აპარატურაზე ნარჩენი რისპერიდონის დასაშვები ზღვარის შესაბამისი კონცენტრაციის საკონტროლო ხსნარი.

დანადგარის ზედაპირებზე საკვლევი ნივთიერების დასაშვები ზღვრების დადგენისათვის გამოიყენება მაქსიმალური დასაშვები გადატანა (MACO) და ნარჩენების დასაშვები კონცენტრაცია - C_{RS} (მგ/ლ).

მაქსიმალური დასაშვები გადატანა გამოითვლება შემდეგი ფორმულით:

$$MACO = \frac{TDD_p \times MBS}{SF \times TDD_{nx}}$$

სადაც:

TDD_p – საკვლევი ნივთიერების სადღეღამისო თერაპიული დოზა

MBS – სერიის მინიმალური მოცულობა პროდუქტისა, რომელიც უნდა დამზადდეს საწარმოში დასუფთავების შემდეგ.

SF – უსაფრთხოების ფაქტორი (= 1000 ორალური წამლის ფომებისთვის)

TDD_{nx} – სადღეღამისო თერაპიული დოზა პროდუქტისა, რომელიც უნდა დამზადდეს საწარმოში დასუფთავების შემდეგ

ნარჩენების დასაშვები კონცენტრაცია (მგ/ლ) გამოითვლება შემდეგი ფორმულით:

$$C_{rs} = \frac{\left(\frac{MACO}{E_s}\right) \times E_a \times R}{V}$$

სადაც:

$MACO$ - მაქსიმალური დასაშვები გადატანა (მგ)

E_s - დასუფთავებული აპარატის საერთო ფართობი

E_a - დანადგარის ფართობი, საიდანაც აიღება სინჯი

R – ექსტრაქციის ხარისხი

V – ექსტრაგირებისას გამოყენებული გამხსნელის მოცულობა

წარმოდგენილი ფორმულების საშუალებით დავადგინეთ რისპერიდონის ნარჩენი დასაშვები კონცენტრაცია, რომელიც მოცემული ექსპერიმენტის შემთხვევაში არის $C_{RS} \leq 0.003$ მგ/მლ

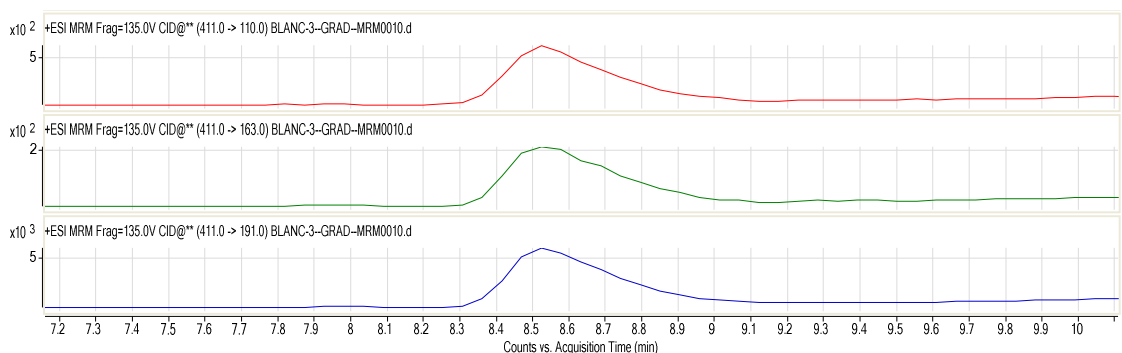
საკონტროლო ნიმუშის მომზადება

დანადგარის მასალისგან დამზადებულ დასუფთავებულ, მშრალ ფირფიტაზე დავიტანეთ ცნობილი კონცენტრაციის საკონტროლო ხსნარი სამიზნე ნივთიერების შემცველობით. დაველოდეთ გაშრობას და ავიღეთ სინჯი ნინასწარ თარგით მონიშნული ადგილიდან ეთანოლით გაუღებელი ტამპონით. სინჯის აღება მოვახდინეთ საწარმოს მიერ მოწოდებული წინასწარ დადგენილი პროცედურის შესაბამისად. ტამპონი მოვათავსეთ 5 მლ მოცულობის ვიალაში და შევავსეთ ეთანოლით. დავაყოვნეთ 1 საათი და ექსტრაგირებისათვის ტამპონიანი ვიალა მოვათავსეთ ულტრაბგერით აბაზანაში 5 წუთის განმავლობაში.

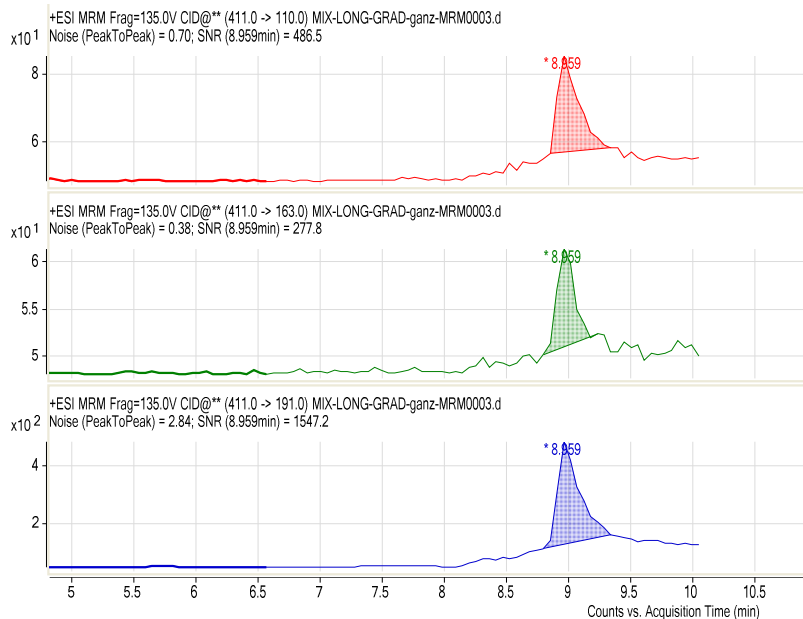
საკვლევი ნიმუშის მომზადება

საანალიზო ობიექტი, რომელსაც წარმოადგენდა დასუფთავებული დანადგარიდან ტამპონით აღებული სინჯი, მოთავსებული იყო 5 მლ მოცულობის ვიალაში, რომელიც შევსებული იყო მეთანოლით. საანალიზო ნივთიერების სრული ექსტრაგირებისათვის ტამპონიანი ვიალა მოვათავსეთ ულტრაბგერით აბაზანაში 5 წუთის განმავლობაში.

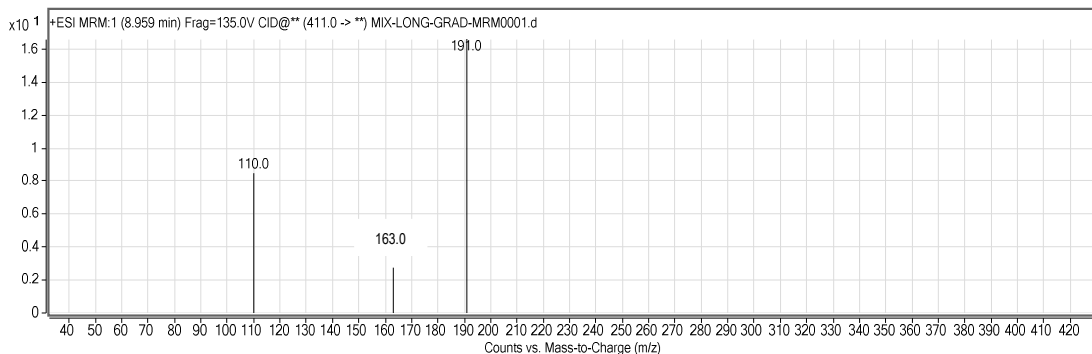
საკვლევი და საკონტროლო ნიმუშებიდან მიღებული გამონაწვდილი მოვათავსეთ კონცენტრატორში და ავართქლეთ არაუმეტეს 40°C ტემპერატურაზე გამომშრალ მდგომარეობამდე. მიღებული მშრალი ნაშთი გავხსენით 200 მკლ მოძრავ ფაზაში. მიღებული ხსნარები გავფილტრეთ, გადავიტანეთ ქრომატოგრაფირების მინის ვიალაში და მოვახდინეთ 5 მკლ ნიმუშის ინჟექტირება ხელსაწყოში. საკვლევი და საკონტროლო ნიმუშების ანალიზის შედეგები მოცემულია ქრომატოგრამების და მასსპექტრების სახით (სურათი 51-53).



სურათი 51: საკვლევი ნიმუშის MRM ქრომატოგრამა



სურათი 52: საკონტროლო ნიმუშის MRM ქრომატოგრამა



სურათი 53: საკონტროლო ნიმუშში რისპერიდონის MS/MS მასსპექტრი

ჩატარებული ექსპერიმენტების შედეგად საკონტროლო ხსნარის ქრომატოგრამაზე მივიღეთ რისპერიდონის სიმეტრიული პიკი, შეკავების დროით 8.95 წთ, ხოლო საკვლევი ხსნარის ქრომატოგრამაზე იმავე დროს აღნიშნული სიგნალი არ ფიქსირდება, რაც მიუთითებს საანალიზო ნიმუშში რისპერიდონის ნარჩენის არარსებობაზე.

ექსპერიმენტით მიღებული შედეგებზე დაყრდნობით შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ჩვენს მიერ შემუშავებული ანალიზის სითხურ ქრომატოგრაფიული - ტანდემური მასსპექტრომეტრული მეთოდი შესაძლებელია გამოყენებული იყოს, საწარმოო დანადგარებზე რისპერიდონის ნარჩენი კონტამინაციის განსაზღვრისათვის, რაც წარმოადგენს სავალდებულო მოთხოვნას კარგი საწარმოო პრაქტიკის რეკომენდაციების მიხედვით.

4.11 საგანმატარებლებში ოლანზაპინის, რისპერდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ანალიზი სითხურ ქრომატოგრაფიული - ტანდემური მასსპექტრომეტრული მეთოდით

ექსპერიმენტის მიზანი

სასამართლო ქიმიური ექსპერტიზის დროს საკვლევე მასალას შესაძლოა წარმოადგენდეს, როგორც ბიოლოგიური ობიექტები, ასევე სხვადასხვა საგანმატარებლები (მელიკამენტის ბლისტერი, ფლაკონი, კუჭის შიგთავსიდან ამოღებული დაუშლელი ტაბლეტები, ანაწმენდი). ნივთმტკიცებები შესაძლოა ნაპოვნი იყოს გარდაცვლილი ადამიანის პირად ნივთებში ან დანაშაულის ადგილას. ასეთ შემთხვევაში ხშირად საგანმატარებელი არ არის მარკირებული. აღნიშნულ შემთხვევაში ექსპერტიზის სრულფასოვანი ჩატარებისათვის მნიშვნელოვანია არსებობდეს მეთოდი, რომლის საშუალებითაც ერთი და იგივე პირობებში მოხდება, როგორც ბიოლოგიური ობიექტების შესწავლა ასევე თანმხლები საგანმატარებლების ანალიზი [2, 20, 54].

ექსპერიმენტის მიზანს წარმოადგენდა საგანმატარებელზე ოლანზაპინის, რისპერდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ანალიზი ჩვენს მიერ ექსპერიმენტით შემუშავებული სითხურ ქრომატოგრაფიული - ტანდემური მასსპექტრომეტრული მეთოდით.

აპარატურული გაფორმება

გამოყენებული აპარატურა, ქრომატოგრაფირების და დეტექტირების პირობები იხილეთ ქვეთავში 4.7.

ექსპერიმენტი

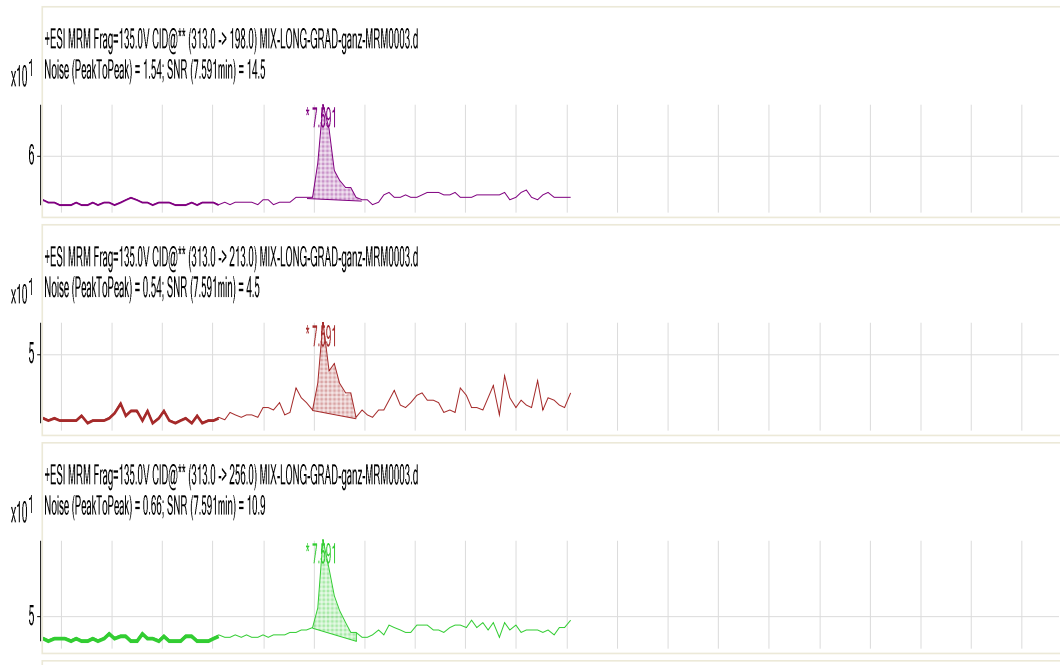
საკვლევი ნიმუშის მომზადება.

ტაბლეტებისგან გავანთავისუფლეთ სედარექსის, ოლზაპის, აზალპეტინის ბლისტერები და ქვეტიაპინის ფუმარატის ფლაკონი. მოვახდინეთ შესაფუთი მასალის შიდა ზედაპირებიდან ბამბის ეთანოლიანი ტამპონით სინჯის აღება. ტამპონი მოვათავსეთ 10 მლ მოცულობის ვიალაში და ექსტრაქცია მოვახდინეთ მეთანოლით. ექსტრაქციას ვაწარმოებდით ულტრაბერით აბაზანაში 5 წუთის განმავლობაში.

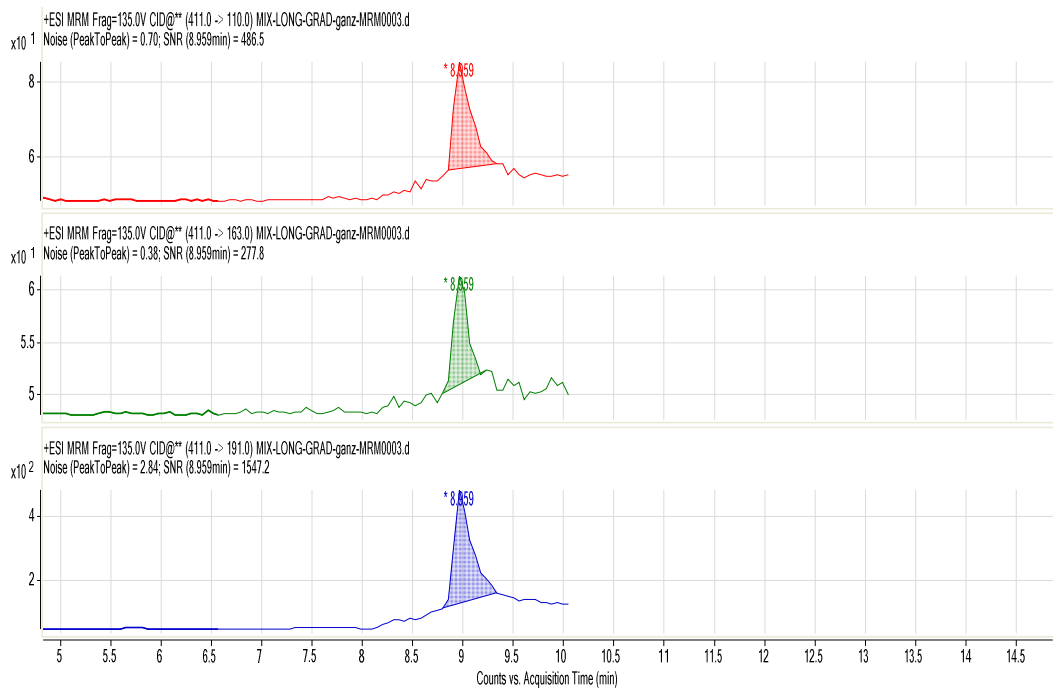
ვიალიდან სითხე გადავიტენეთ კონცენტრატორში და ავავსეთ არაუმეტეს 40°C ტემპერატურაზე მშრალ მდგომარეობამდე. მიღებული მშრალი ნაშთი

გავსენით 200 მკლ მოძრავ ფაზაში. მიღებული ხსნარები გავფილტრეთ, გადავიტანეთ ქრომატოგრაფირების მინის ვიალაში და მოვახდინეთ 5 მკლ ნიმუშის ინჟექტირება ხელსაწყოში.

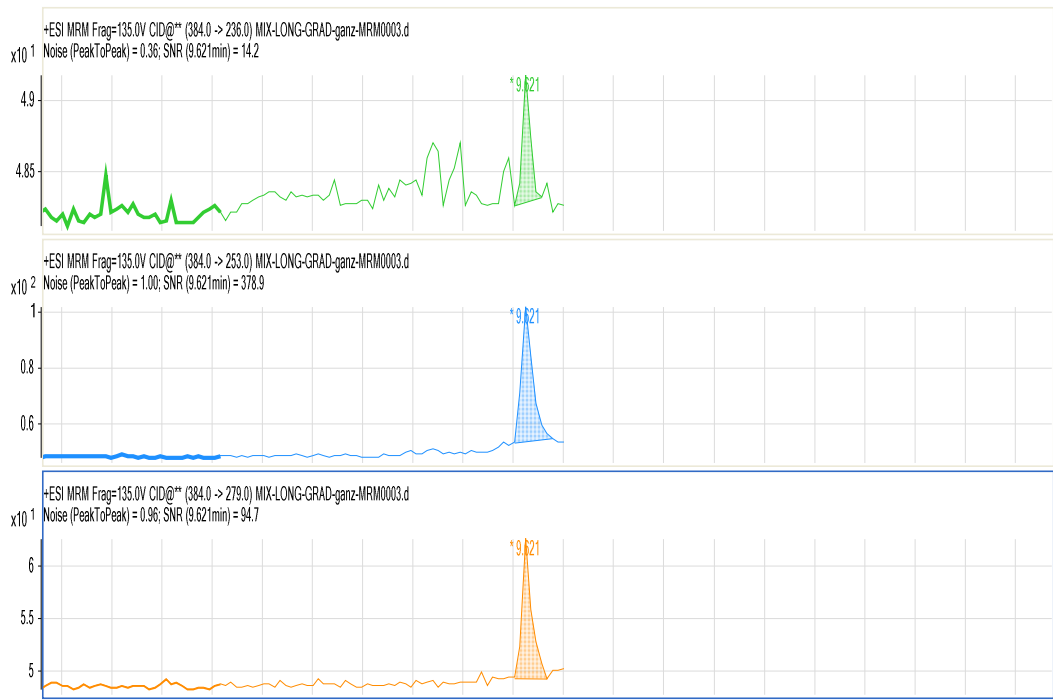
სურათზე №54-61 მოცემულია ანალიზის შედეგად მიღებული ქრომატოგრამები და მასპექტრები.



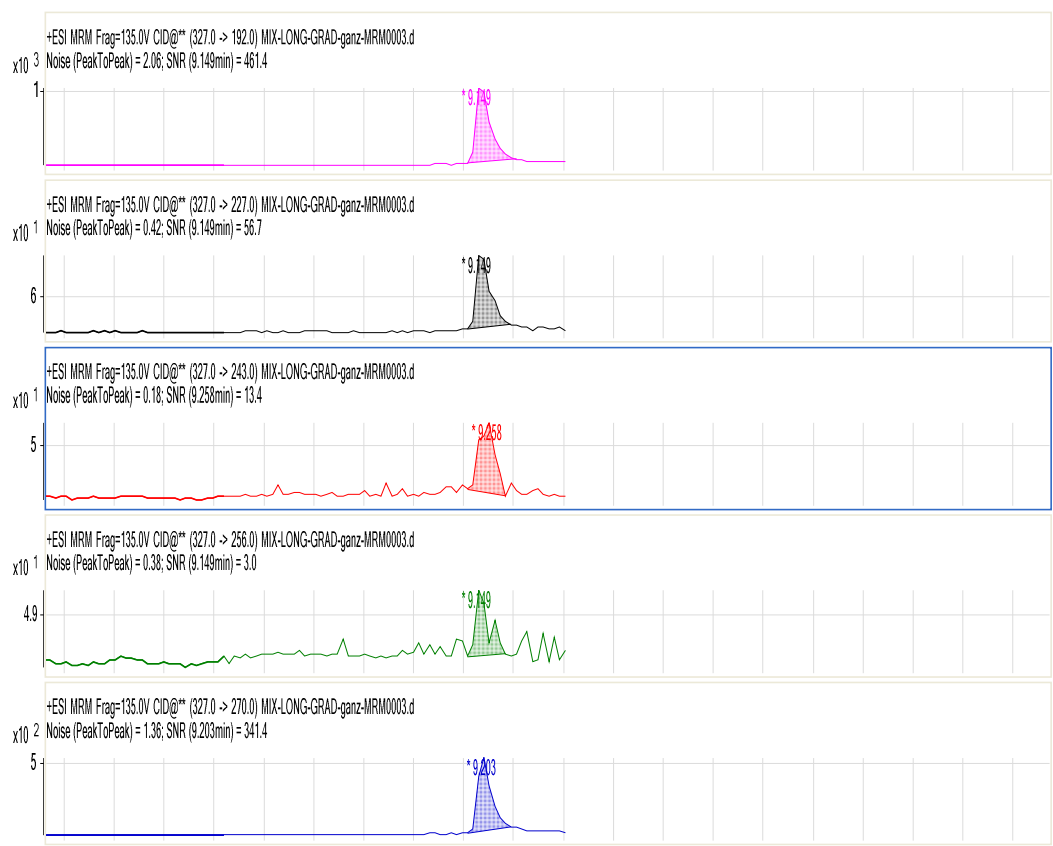
სურათი 54: საგანმატარებლებში ოლანზაპინის MRM ქრომატოგრამები



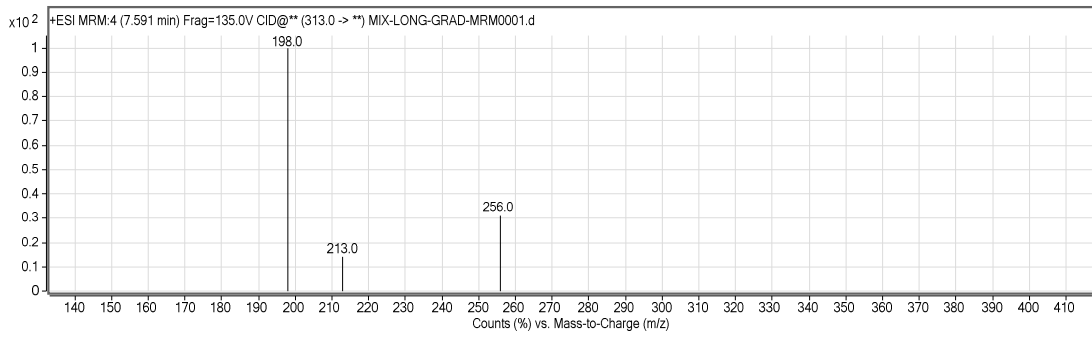
სურათი 55: საგანმატარებლებში რისპერიდონის MRM ქრომატოგრამები



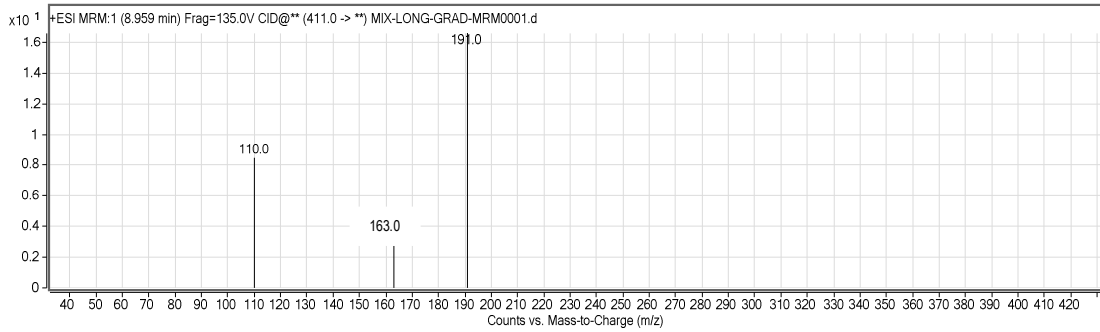
სურათი 56: საგანმატარებლებში ქვეტიაპინის MRM ქრომატოგრამები



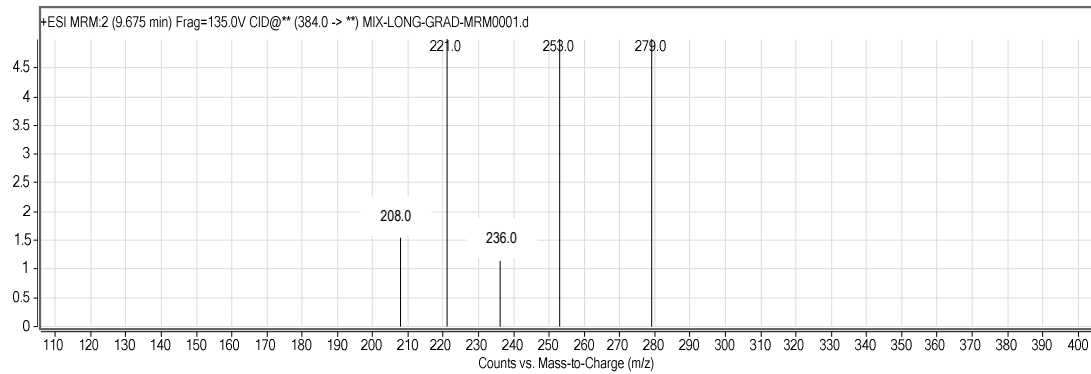
სურათი 57: საგანმატარებლებში კლოზაპინის MRM ქრომატოგრამები



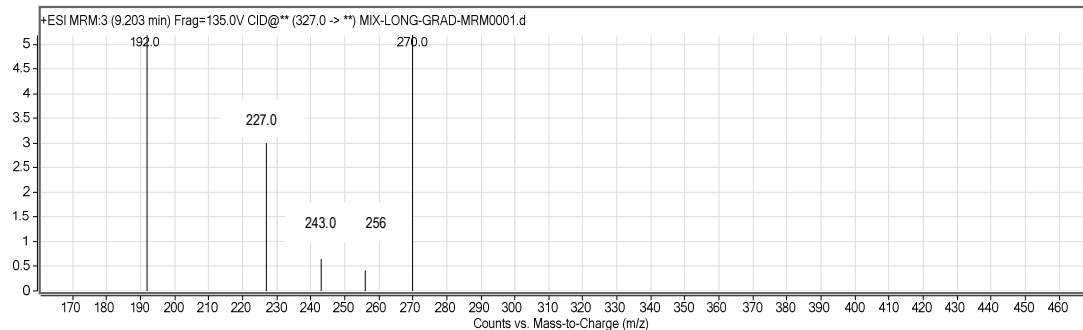
სურათი 58: საგანმატარებლებში ოლანზაპინის MS/MS მასსპექტრი



სურათი 59: საგანმატარებლებში რისპერიდონის MS/MS მასსპექტრი



სურათი 60: საგანმატარებლებში ქვეტიპინის MS/MS მასსპექტრი



სურათი 61: საგანმატარებლებში კლოზაპინის MS/MS მასსპექტრი

ბლისტერის და ფლაკონის ანაწმენდის ანალიზის შედეგად მიღებულ მასსპექტრებზე წარმოდგენილია სამიზნე ნივთიერებების მოლეკულური იონების ფრაგმენტაცია, რითაც დადასტურდა მათი იდენტიფიკაცია საკვლევ ობიექტში. ქრომატოგრამებზე მოცემული სიმეტრიული პიკები იძლევა საკვლევ ნივთიერებების როდენობრივი ანალიზის საშუალებას.

ექსპერიმენტით მიღებული შედეგების საფუძველზე ჩვენს მიერ შემუშავებული ანალიზის სითხურ ქრომატოგრაფიული - ტანდემური მასსპექტრომეტრული მეთოდი შესაძლებელია გამოყენებული იყოს, ოლანზაპინის, რისპერდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზისათვის. მოცემულ პირობებში შესაძლებელია ჩატარდეს საგანმატარებლებში საკვლევ ნივთიერებების თვისობრივი-რაოდენობრივი განსაზღვრა. აღნიშნული საკითხი მნიშვნელოვანი ნაწილია კრიმინალისტიკისათვის და საგამოძიებო პროცედურების სრულფასოვანი წარმართვისათვის.

4.12 ადამიანის სისხლში ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის თვისობრივი - რაოდენობრივი განსაზღვრის სითხურ ქრომატოგრაფიული - ტანდემური მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდის ვალიდაცია

მეთოდი, რომელიც გამოყენებული იქნება სასამართლო ქიმიური ექსპერტიზისთვის უნდა იყოს ვალიდირებული, რათა დამტკიცდეს მისი მაღალი სანდოობა და მიღებული შედეგების რელიევანტურობა. მეთოდის ვალიდაცია უზრუნველყოფს მაღალ სარწმუნოებას და წარმოადგენს მეთოდის ვეფექტურობის დოკუმენტალურ მტკიცებულებას [189].

არსებობს სხვადასხვა მარეგულირებლის მიერ შემუშავებული რეკომენდაციები, რომელიც განსაზღვრავს ვალიდაციის პარამეტრებს და მისი ჩატარების წესებს, მათ შორის არის:

- აშშ-ს კვების პროდუქტების და მედიკამენტების ადმინისტრაციის (FDA) რეკომენდაცია „ბიონალიზური მეთოდის ვალიდაცია“
- აშშ-ს ფარმაკოპეა
- ევროპის მედიკამენტების სააგენტოს(EMA) და ჰარმონიზაციის საერთაშორისო კონფერენციის (ICH) მეთოდოლოგია ვალიდაციის ჩატარების პროცედურის შესახებ.
- სასამართლო ექსპერტიზის ტოქსიკოლოგთა ასოციაციის (SOFT) და ამერიკის სასამართლო ექსპერტიზის სამეცნიერო აკადემიის (AAFS) მიერ შემუშავებული გაიდლაინი (SOFT/AAFS 2006) სასამართლო ქიმიური ექსპერტიზის ლაბორატორიებისთვის. ვალიდაციის პარამეტრების შერჩევასას გასათვალისწინებელია იმ ანალიზის მეთოდის დანიშნულება, რომლის ვალიდაციაც არის დაგეგმილი, მაგალითისათვის შეიძლება განვიხილოთ ანალიზის მეთოდი განკუთვნილია თვისობრივი თუ რაოდენობრივი ანალიზისათვის, მედიკამენტების კონტროლის თუ სასამართლო ქიმიური ექსპერტიზისათვის [134, 187, 205].

მოცემული რეკომენდაციების საფუძველზე განხორციელდა ადამიანის სისხლში ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის თვისობრივი და რაოდენობრივი განსაზღვრის სითხური ქრომატოგრაფიული – მასსპექტრომეტრული (LC-MS/MS) მეთოდის ვალიდაცია.

ანალიზის მეთოდის ვალიდაცია ჩავატარეთ შემდეგ ძირითად პარამეტრებზე:

1. სწორხაზოვნება (Linearity)
2. სელექციურობა (Selectivity)
3. სისწორე (Accuracy)
4. სიზუსტე (Precision)
5. აღმოსაჩენი მინიმუმი (LOQ)
6. განსასაზღვრავი მინიმუმი (LOD)
7. ექსტრაქციის ხარისხი (Recovery)
8. მატრიცის ეფექტი (Matrix Effect)
9. სტაბილურობა (Stability)

სწორხაზოვნება

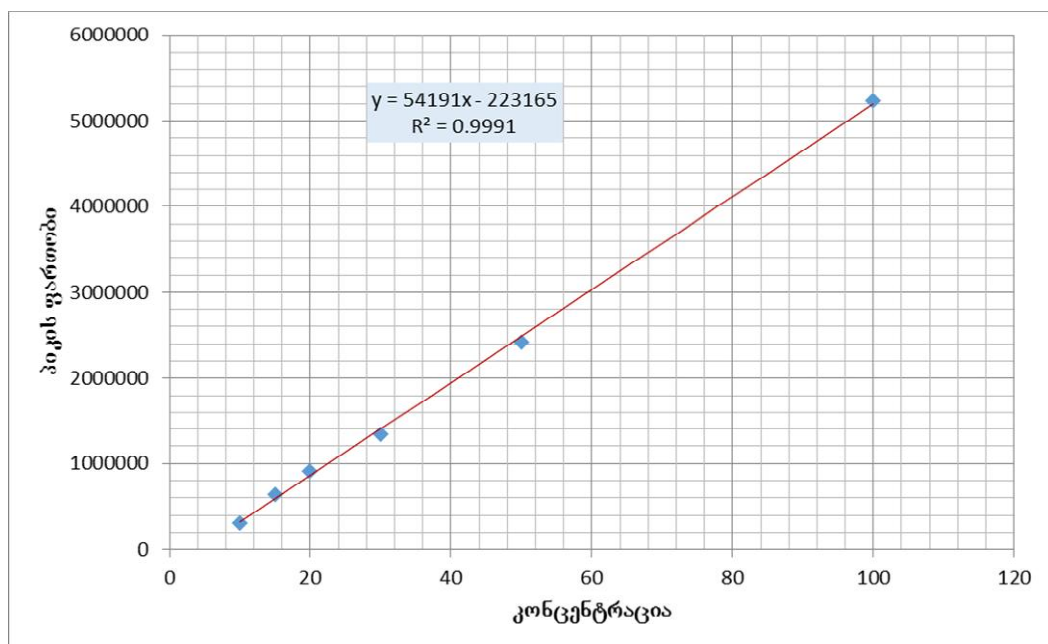
სწორხაზოვნება გულისხმობს რაოდენობრივი ანალიზის შედეგების და კონცენტრაციის სწორხაზოვან დამოკიდებულებას. მიღებული შედეგების სწორხაზოვნება შესაძლოა წარმოდგენილი იყოს გრაფიკის სახით და სათანადო სტატისტიკური მეთოდით, რეგრესიის წრფის მიხედვით დადგინდეს კორელაციის კოეფიციენტი R^2 , რომელიც არ უნდა იყოს 0.995 ზე ნაკლები. სწორხაზოვნების დადგენისათვის უნდა მოხდეს არანაკლებ 5 სხვადასხვა კონცენტრაციის ნიმუშის რაოდენობრივი განსაზღვრის შედეგების სტატისტიკური დამუშავება [29].

სწორხაზოვნების დასადგენად ანალიზის პროცედურის დროს გამოყენებული იყო საკვლევი ნივთიერებების შემდეგი კონცენტრაციის საკალიბრო ხსნარები 10, 15, 20, 30, 50 და 100 ნგ/მლ. ანალიზის შედეგად მიღებული პიკის ფართობის და კონცენტრაციის დამოკიდებულება მოცემულია №13-16 ცხრილში. მონაცემები დავამუშავეთ სტატისტიკური სწორხაზოვანი რეგრესიის მეთოდით, გამოვიყენეთ Graph Pad Prism პროგრამული უზრუნველყოფა და დავდგინეთ კორელაციის კოეფიციენტი. მონაცემების დადასტურება მოვახდინეთ Microdest Excel-ის მონაცემთა სტატისტიკური დამუშავების პროგრამით. შედეგად დავადგინეთ, რომ წარმოდგენილი ანალიზის მეთოდის პირობებში ოლანზაპინის კორელაციის კოეფიციენტი $R^2=0.9991$, რისპერიდონის $R^2=0.9980$, ქვეტიაპინის $R^2=0.9989$, კლოზაპინის $R^2=0.9986$, მონაცემები შესაბამისობაშია დადგენილ ნორმებთან. წარმოდგენილი საკალიბრო გრაფიკების ანალიზის მიხედვით შეგვიძლია

დავასკვნათ რომ, მეთოდმა აჩვენა სწორხაზოვნება 10-100ნგ/მლ კონცენტრაციის ფარგლებში, საკალიბრო გრაფიკი იხილეთ სურათი 62-65.

ცხრილი №13: ოლანზაპინის პიკის ფართობის და კონცენტრაციის დამოკიდებულება

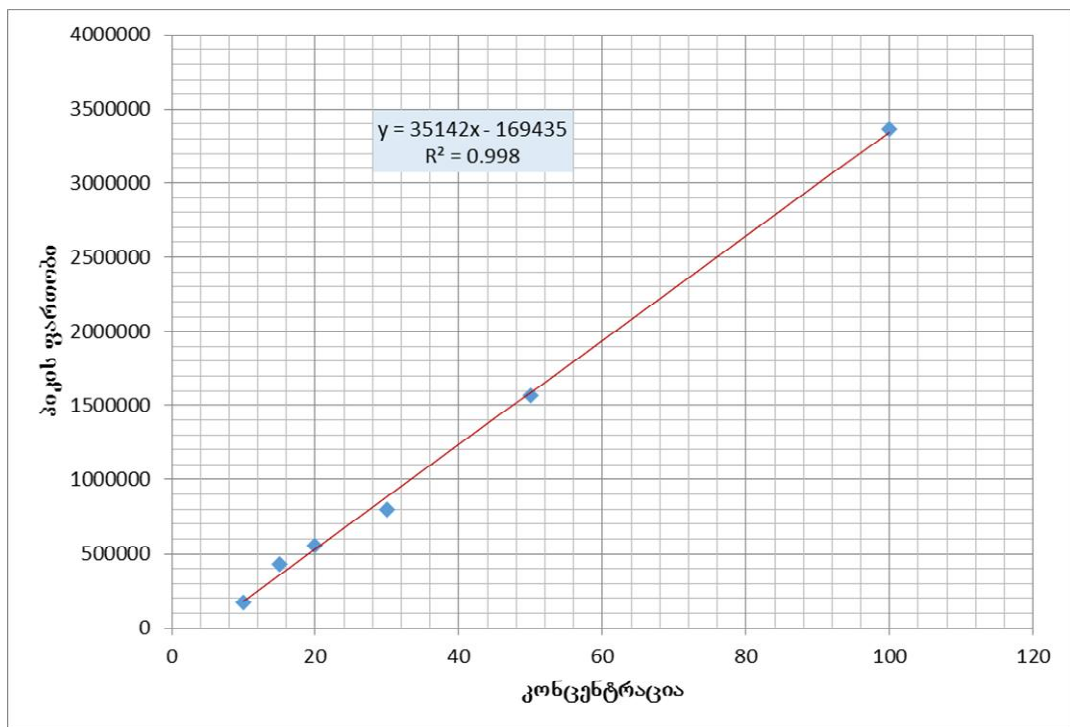
№	ოლანზაპინის საკალიბრო ხსნარების კონცენტრაცია ნგ/მლ	ოლანზაპინის საკალიბრო ხსნარების პიკის ფართობების საშუალო მნიშვნელობა (n=6)
1	10	309521
2	15	641751
3	20	908518
4	30	1346099
5	50	2417018
6	100	5231139



სურათი 62: ოლანზაპინის საკალიბრო გრაფიკი

ცხრილი №14: რისპერიდონის პიკის ფართობის და კონცენტრაციის დამოკიდებულება

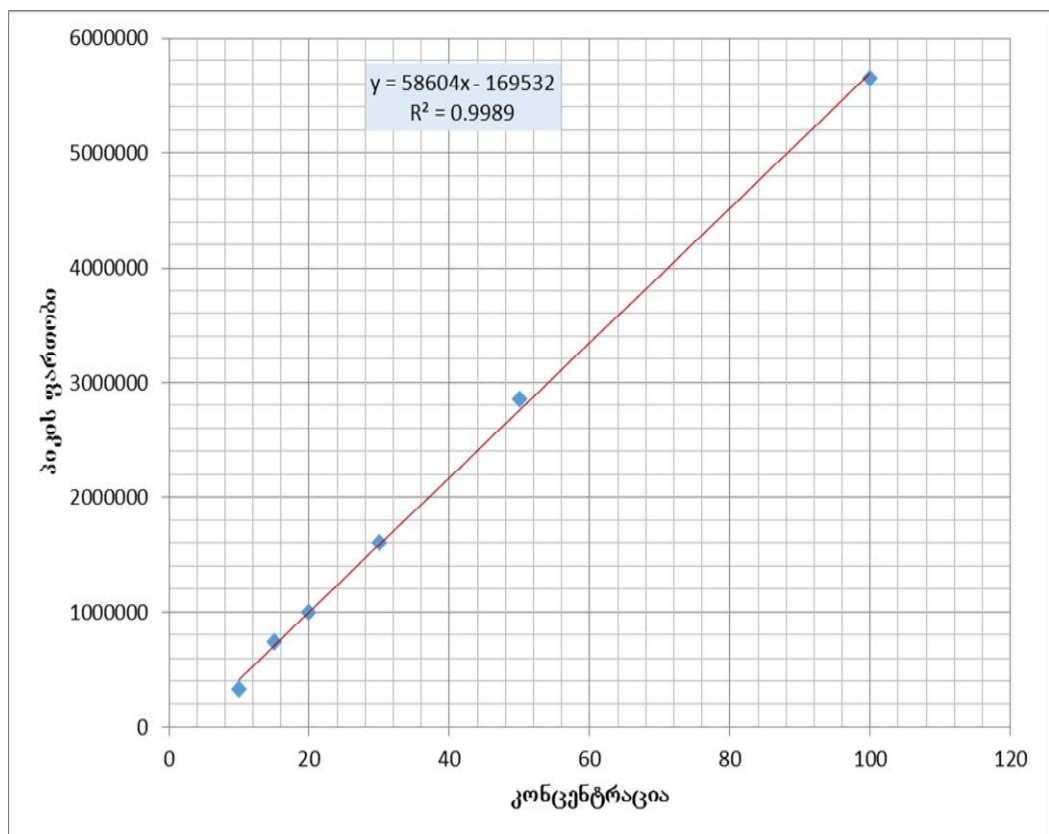
№	რისპერიდონის საკალიბრო ხსნარების კონცენტრაცია ნგ/მლ	რისპერიდონის საკალიბრო ხსნარების პიკის ფართობების საშუალო მნიშვნელობა (n=6)
1	10	176510
2	15	427842
3	20	555861
4	30	796990
5	50	1565306
6	100	3367828



სურათი 63: რისპერიდონის საკალიბრო გრაფიკი

ცხრილი №15: ქვეტიაპინის პიკის ფართობის და კონცენტრაციის დამოკიდებულება

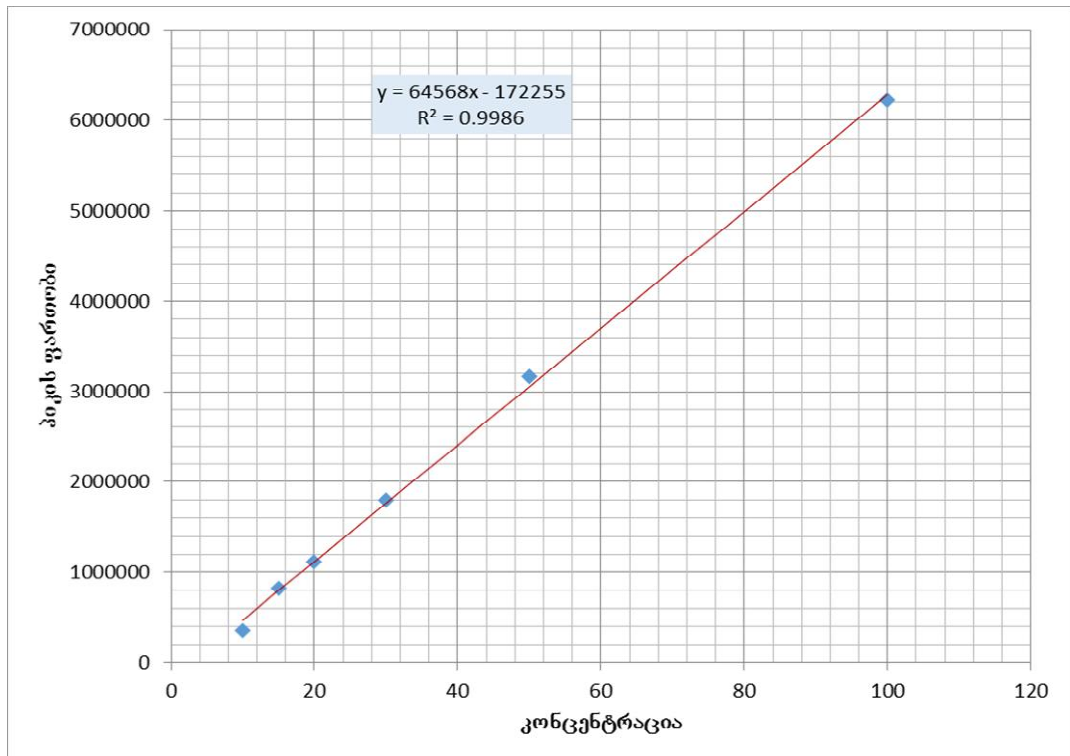
№	ქვეტიაპინის საკალიბრო სსნარების კონცენტრაცია ნგ/მლ	ქვეტიაპინის საკალიბრო სსნარების პიკის ფართობების საშუალო მნიშვნელობა (n=6)
1	10	326580
2	15	740128
3	20	1000165
4	30	1601320
5	50	2856477
6	100	5644000



სურათი 64: ქვეტიაპინის საკალიბრო გრაფიკი

ცხრილი №16: კლოზაპინის პიკის ფართობის და კონცენტრაციის დამოკიდებულება

№	კლოზაპინის საკალიბრო ხსნარების კონცენტრაცია ნგ/მლ	კლოზაპინის საკალიბრო ხსნარების პიკის ფართობების საშუალო მნიშვნელობა (n=6)
1	10	357139
2	15	822334
3	20	1122469
4	30	1794799
5	50	3173802
6	100	6223809



სურათი 65: კლოზაპინის საკალიბრო გრაფიკი

სისწორე და სიზუსტე

ანალიზის მეთოდის სიზუსტე გამოხატავს ერთი და იგივე პირობებში ჩატარებული, სერიული ანალიზის შედეგების თანხვედრის ხარისხს. სიზუსტე გამოიხატება ვარიაციის კოეფიციენტით (CV %), რომელიც უნდა იყოს $\leq 15\%$, განსასაზღვრი მინიმუმის შემთხვევაში $\leq 20\%$.

სისწორე არის ანალიზის შედეგების სიახლოვის ხარისხი ნომინალურ ან დადგენილ, ჭეშმარიტ მაჩვენებელთან. ანალიზის მეთოდის სისწორის შეფასება ხდება მინიმუმ სამი სახვადასხვა კონცენტრაციის ნიმუშის ხუთჯერადი განსაზღვრით. სისწორის დასადგენად ანალიზის შედეგად მიღებული მონაცემები უნდა შევადაროთ ნომინალურ კონცენტრაციას. გადახრა ნომინალური კონცენტრაციიდან უნდა იყოს $\pm 15\%$ - ის, ხოლო განსასაზღვრი მინიმუმის შემთხვევაში $\pm 20\%$ - ის ფარგლებში [106].

სიზუსტის და სისწორის დადგენის მიზნით მოვამზადეთ 3 სხვადასხვა კონცენტრაციის საანალიზო ნიმუში (10, 25, 50.0 ნგ/მლ) სისხლში განზავებით. მოცემული პარამეტრების დასადგენად მოვახდინეთ თითოეული ნიმუშის ხუთჯერად განსაზღვრა (n=5) სამი დღის პერიოდში.

ვალიდაციის ექსპერიმენტის შედეგები მოცემულია № 17-24 ცხრილში.

ცხრილი 17. ოლანზაპინის დღის განმავლობაში და დღეთაშორისი რაოდენობრივი განსაზღვრის სიზუსტე (n=5)

C n ნგ/მლ	დათვლილი კონცენტრაცია ნგ/მლ					საშუალო	SD	CV%
დღის განმავლობაში								
10	9.71	9.3	10.8	10.7	9.1	9.92	0.70	7.1
25	23.19	23.98	26.9	25.7	22.5	24.55	1.62	6.6
50	46.2	51.74	52.9	46.1	53.1	50.01	3.18	6.4
დღეთაშორისი								
10	9.1	9.06	10.9	10.78	9.05	9.82	0.87	8.8
25	23.19	22.98	26.8	26.7	22.9	24.60	1.83	7.4
50	45.2	52.74	52.8	46.1	53.29	50.02	3.59	7.2

C n – ოლანზაპინის ნომინალური კონცენტრაცია;

CV % – ვარიაციის კოეფიციენტი;

SD – სტანდარტული გადახრა

ცხრილი 18: რისპერიდონის დღის განმავლობაში და დღეთაშორისი რაოდენობრივი განსაზღვრის სიზუსტე (n=5)

C n ნგ/მლ	დათვლილი კონცენტრაცია ნგ/მლ					საშუალო	SD	CV%
დღის განმავლობაში								
10	9.25	9.41	10.95	10.7	9.11	9.88	0.78	7.9
25	22.52	23.52	26.8	25.91	22.45	24.24	1.79	7.4
50	52.2	45.9	53.6	46	53.7	50.28	3.58	7.1
დღეთაშორისი								
10	8.7	9.06	10.9	10.95	9.05	9.73	0.98	10.1
25	22.8	22.98	27.8	27.7	22.8	24.82	2.40	9.7
50	45.15	45.2	54.93	46.15	54.9	49.27	4.63	9.4

C n – რისპერიდონის ნომინალური კონცენტრაცია;

CV % – ვარიაციის კოეფიციენტი;

SD – სტანდარტული გადახრა

ცხრილი 19: ქვეტიაპინის დღის განმავლობაში და დღეთაშორისი რაოდენობრივი განსაზღვრის სიზუსტე (n=5)

C n ნგ/მლ	დათვლილი კონცენტრაცია ნგ/მლ					საშუალო	SD	CV%
დღის განმავლობაში								
10.00	9.73	9.22	10.85	10.85	9.25	9.98	0.73	7.3
25.00	23.15	24.00	26.90	25.91	22.45	24.48	1.67	6.8
50.00	52.20	45.90	53.60	46.00	53.70	50.28	3.58	7.1
დღეთაშორისი								
10.00	8.90	9.00	10.95	10.95	9.05	9.77	0.96	9.8
25.00	23.00	22.55	26.80	27.95	22.50	24.56	2.33	9.5
50.00	46.25	45.90	54.90	45.00	54.80	49.37	4.49	9.1

C n – ქვეტიაპინის ნომინალური კონცენტრაცია;

CV % – ვარიაციის კოეფიციენტი;

SD – სტანდარტული გადახრა

ცხრილი 20: კლოზაპინის დღის განმავლობაში და დღეთაშორისი რაოდენობრივი განსაზღვრის სიზუსტე (n=5)

C n ნგ/მლ	დათვლილი კონცენტრაცია ნგ/მლ					საშუალო	SD	CV%
დღის განმავლობაში								
10.00	9.40	9.50	10.65	10.60	9.30	9.89	0.60	6.1
25.00	24.15	23.10	26.82	25.80	23.30	24.63	1.45	5.9
50.00	52.30	47.90	53.25	46.96	53.80	50.84	2.84	5.6
დღეთაშორისი								
10.00	8.89	9.10	10.65	10.89	9.15	9.74	0.85	8.8
25.00	23.18	23.01	26.92	26.88	22.19	24.44	2.04	8.3
50.00	46.30	46.10	54.84	46.89	53.60	49.55	3.85	7.8

C n – კლოზაპინის ნომინალური კონცენტრაცია;

CV % – ვარიაციის კოეფიციენტი;

SD – სტანდარტული გადახრა

ცხრილი 21: ოლანზაპინის დღის განმავლობაში და დღეთაშორისი რაოდენობრივი განსაზღვრის სისწორე (n=5)

C n ნგ/მლ	დათვლილი კონცენტრაცია % ნომინალურთან შედარებით					საშუალო %	SD
დღის განმავლობაში							
10.00	91.80	91.50	92.90	92.90	92.60	92.34	0.58
25.00	95.80	96.10	93.90	98.10	97.50	96.28	1.46
50.00	99.40	99.60	102.99	102.80	99.80	100.92	1.62
დღეთაშორისი							
10.00	89.50	88.60	88.30	89.90	91.20	89.50	1.03
25.00	90.50	91.30	91.10	92.50	93.80	91.84	1.18
50.00	92.80	91.10	91.10	92.50	92.10	91.92	0.71

C n – ქვეტიპინის ნომინალური კონცენტრაცია;

SD – სტანდარტული გადახრა

ცხრილი 22: რისპერიდონის დღის განმავლობაში და დღეთაშორისი რაოდენობრივი განსაზღვრის სისწორე (n=5)

C n ნგ/მლ	დათვლილი კონცენტრაცია % ნომინალურთან შედარებით					საშუალო %	SD
დღის განმავლობაში							
10.00	92.50	93.60	92.10	94.50	95.80	93.70	1.35
25.00	95.30	95.40	94.90	98.50	97.50	96.32	1.42
50.00	102.50	102.50	102.80	102.80	102.70	102.66	0.14
დღეთაშორისი							
10.00	89.70	91.30	90.20	92.90	90.80	90.98	1.10
25.00	92.80	94.20	94.10	95.00	96.50	94.52	1.22
50.00	98.90	102.70	100.90	94.50	99.60	99.32	2.74

C n – რისპერიდონის ნომინალური კონცენტრაცია;

SD – სტანდარტული გადახრა

ცხრილი 23: ქვეტიაპინის დღის განმავლობაში და დღეთაშორისი რაოდენობრივი განსაზღვრის სისწორე (n=5)

C n ნგ/მლ	დათვლილი კონცენტრაცია % ნომინალურთან შედარებით					საშუალო %	SD
დღის განმავლობაში							
10.00	92.00	91.10	93.70	91.80	93.90	92.50	1.10
25.00	96.73	97.17	93.50	96.50	95.90	95.96	1.30
50.00	103.50	99.80	98.22	102.30	102.90	101.34	2.01
დღეთაშორისი							
10.00	88.10	89.95	88.70	90.65	91.03	89.69	1.12
25.00	92.74	91.02	90.21	94.10	99.32	93.48	3.22
50.00	98.96	100.01	99.95	98.73	99.80	99.49	0.54

C n – ქვეტიაპინის ნომინალური კონცენტრაცია;

SD – სტანდარტული გადახრა

ცხრილი 24: კლოზაპინის დღის განმავლობაში და დღეთაშორისი რაოდენობრივი განსაზღვრის სისწორე (n=5)

C n ნგ/მლ	საშუალო დათვლილი კონცენტრაცია % ნომინალურთან შედარებით					საშუალო %	SD
	დღის განმავლობაში						
10.00	92.30	92.70	92.98	91.02	91.80	92.16	0.69
25.00	95.80	97.39	98.50	97.19	98.14	97.40	0.93
50.00	99.27	98.35	101.87	100.90	102.64	100.61	1.59
	დღეთაშორისი						
10.00	88.23	89.34	89.14	90.25	90.22	89.44	0.75
25.00	90.45	90.64	91.77	90.31	91.01	90.84	0.52
50.00	93.66	94.01	95.23	95.56	93.64	94.42	0.81

C n – კლოზაპინის ნომინალური კონცენტრაცია;

SD – სტანდარტული გადახრა

სიზუსტის და სისწორის შეფასება მოვახდინეთ სტანდარტული გადახრის და საშუალო დათვლილი კონცენტრაციის ფარდობით.

ცხრილში მოცემული შედეგების მიხედვით, მეთოდის სიზუსტე შეადგენდა: ოლანზაპინი - დღის განმავლობაში CV % 6.4% - 7.1%, დღეთაშორისი CV % 7.2% - 8.8%; რისპერიდონი - დღის განმავლობაში CV % 7.1% - 7.9%, დღეთაშორისი CV % 9.4%-10.1%; ქვეტიაპინი - დღის განმავლობაში CV % 7.2% - 7.3%, დღეთაშორისი CV % 9.9% - 9.1%; კლოზაპინი - დღის განმავლობაში CV % 5.6% - 6.1%, დღეთაშორისი CV % 7.8% - 8.8%.

დღის განმავლობაში სისწორე ოლანზაპინისთვის იყო 92.34% - 100.92% და დღეთაშორისი სისწორე იყო 89.50% - 91.92%; დღის განმავლობაში სისწორე რისპერიდონისთვის იყო 93.70% - 102.66% და დღეთაშორისი სისწორე იყო 90.98% - 99.32%. დღის განმავლობაში სისწორე ქვეტიაპინისთვის იყო 92.50% - 101.34% და დღეთაშორისი სისწორე იყო 89.69% - 99.49%. დღის განმავლობაში სისწორე კლოზაპინისთვის იყო 92.16% - 100.61% და დღეთაშორისი სისწორე იყო 89.44% - 94.42%.

მოცემული შედეგით დასტურდება, რომ ანალიზის მეთოდი სრულად აკმაყოფილებს დადგენილ მოთხოვნებს.

აღმოსაჩენი მინიმუმი (LOD) და რაოდენობრივად განსასაზღვრავი მინიმუმი (LOQ)

აღმოსაჩენი მინიმუმი არის საკვლევი ნიმუშში არსებული ნივთიერების ის მინიმალური რაოდენობა, რომლის აღმოჩენაც შესაძლებელია ხელსაწყოთა მიერ, ხოლო რაოდენობრივად განსასაზღვრავი მინიმუმი არის საკვლევი ნიმუშში არსებული ნივთიერების ის მინიმალური რაოდენობა, რომლის განსაზღვრა შესაძლებელია დადგენილი სისწორით და სიზუსტით. მოცემული პარამეტრით ხასიათდება ანალიზის მეთოდი, რომელიც განკუთვნილია საანალიზო ობიექტში მცირე რაოდენობის ნივთიერებების აღმოსაჩენად.

არსებობს აღმოსაჩენი და განსასაზღვრავი მინიმუმის დადგენის სხვადასხვა მიდგომა, რომელიც დამოკიდებულია მეთოდის სახეობაზე [80].

აღმოსაჩენი მინიმუმის დასადგენად შესაძლებელია გამოვიყენოთ შემდეგი მეთოდები:

- განსასაზღვრი და აღმოსაჩენი მინიმუმის გამოთვლა ხდება ცნობილი კონცენტრაციის ნიმუშის ანალიზით. დგინდება საკვლევი ნივთიერების ის მინიმალური რაოდენობა, რომლის აღმოჩენა და რაოდენობრივი განსაზღვრა სარწმუნოა მოცემული მეთოდის პირობებში.
- სიგნალის და ხმაურის თანაფარდობა - გამოიყენება იმ ანალიზის მეთოდის შემთხვევაში, რომელიც ავლენს საბაზისო ხმაურს. სიგნალის და ხმაურის თანაფარდობით აღმოსაჩენი მინიმუმის დადგენა ხდება დაბალი, ცნობილი კონცენტრაციის ნიმუშის ანალიზისას მიღებული სიგნალის შედარებით სუფთა ნიმუშის სიგნალთან. სიგნალის და ხმაურის თანაფარდობა არის განსასაზღვრი მინიმუმის შემთხვევაში 10:1, ხოლო აღმოსაჩენი მინიმუმის შემთხვევაში 3:1 თანაფარდობით [81].
- განსასაზღვრი და აღმოსაჩენი მინიმუმის დადგენა, დაფუძნებულია ხელსაწყოზე მიღებული სიგნალის და საკალიბრო მრუდის სტანდარტულ გადახრაზე, რომელიც გამოითვლება შემდეგი ფორმულით:

განსასაზღვრი მინიმუმი

$$QL = \frac{10 \times \delta}{S}$$

აღმოსაჩენი მინიმუმი

$$DL = \frac{3.3 \times \delta}{S}$$

სადაც:

δ - ხელსაწყოზე მიღებული სიგნალის სტანდარტული გადახრა

S - საკალიბრო მრუდის დახრილობის კუთხის მნიშვნელობა

ჩამოთვლილი მეთოდებიდან დასადგენად გამოვიყენეთ მეთოდი, რომელიც დაფუძნებულია პიკის (ხელსაწყო სიგნალი) და საკალიბრო მრუდის დახრილობის კუთხის დამოკიდებულებაზე.

ხელსაწყო სიგნალის სტანდარტული გადახრის გამომანგარიშების მიზნით მოვახდინეთ სუფთა სისხლის 20 ჯერადი ქრომატოგრაფირება და მიღებული შედეგებიდან გამოვთვალეთ სტანდარტული გადახრა δ . საკალიბრო მრუდის დახრილობის კუთხის მნიშვნელობის გამოსათვლელად გამოვიყენეთ Microsoft Excel-ის პროგრამა, დახრილობის კუთხე დავადგინეთ ექვსი სხვადასხვა კონცენტრაციის ნიმუშის საკალიბრო გრაფიკის მიხედვით. მიღებული შედეგები მოცემულია №25 ცხრილში.

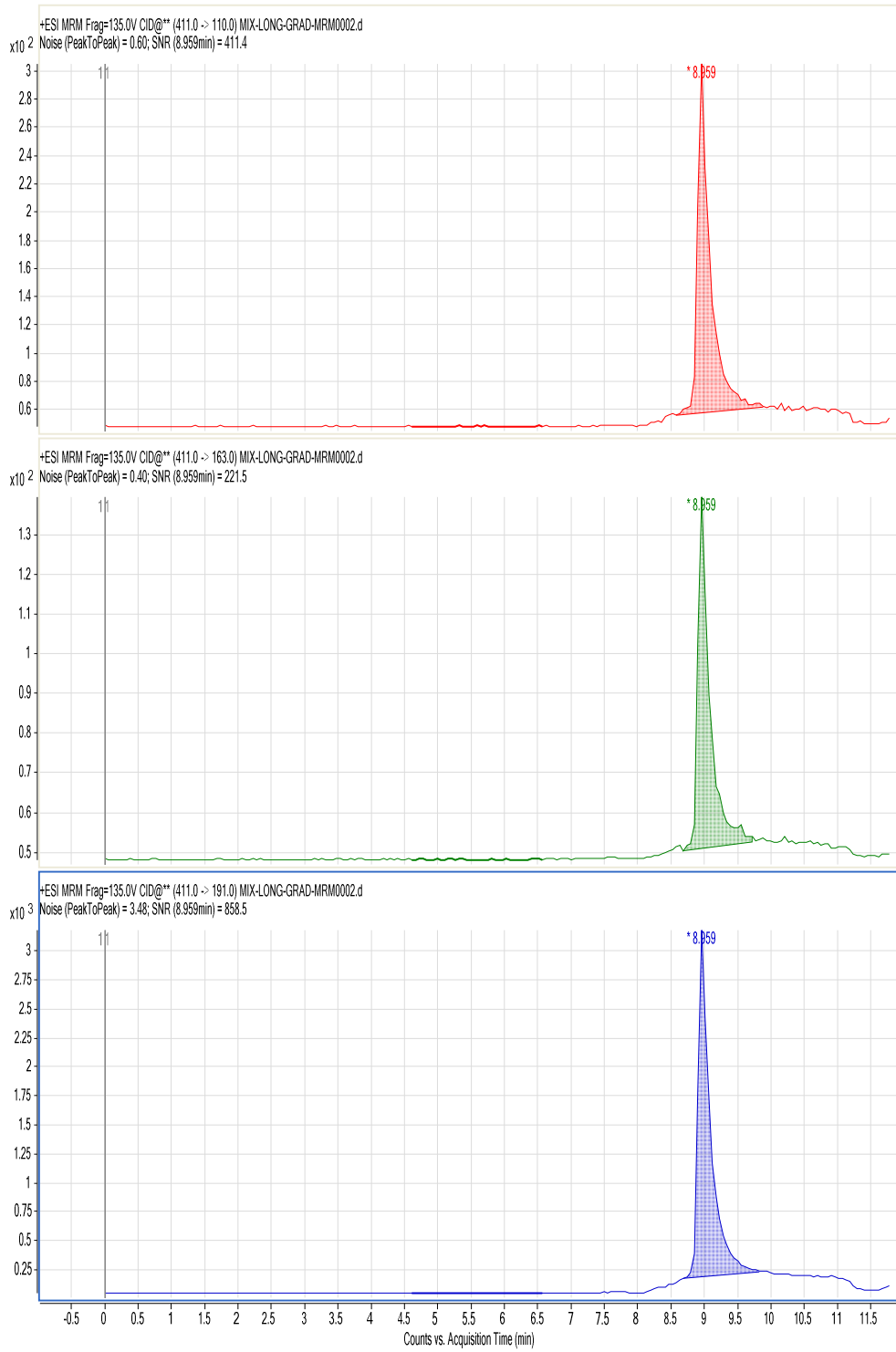
ცხრილი 25: საკვლევი ნივთიერებების განსასაზღვრი და აღმოსაჩენი მინიმუმის გამოთვლის შედეგები

ნივთიერების დასახელება	N*	აღმოსაჩენი მინიმუმი ნგ/მლ	განსასაზღვრი მინიმუმი ნგ/მლ
ოლანზაპინი	6	3.02	9.12
რისპერიდონი	6	2.45	7.43
ქვეტიაპინი	6	2.87	8.70
კლოზაპინი	6	2.12	6.31

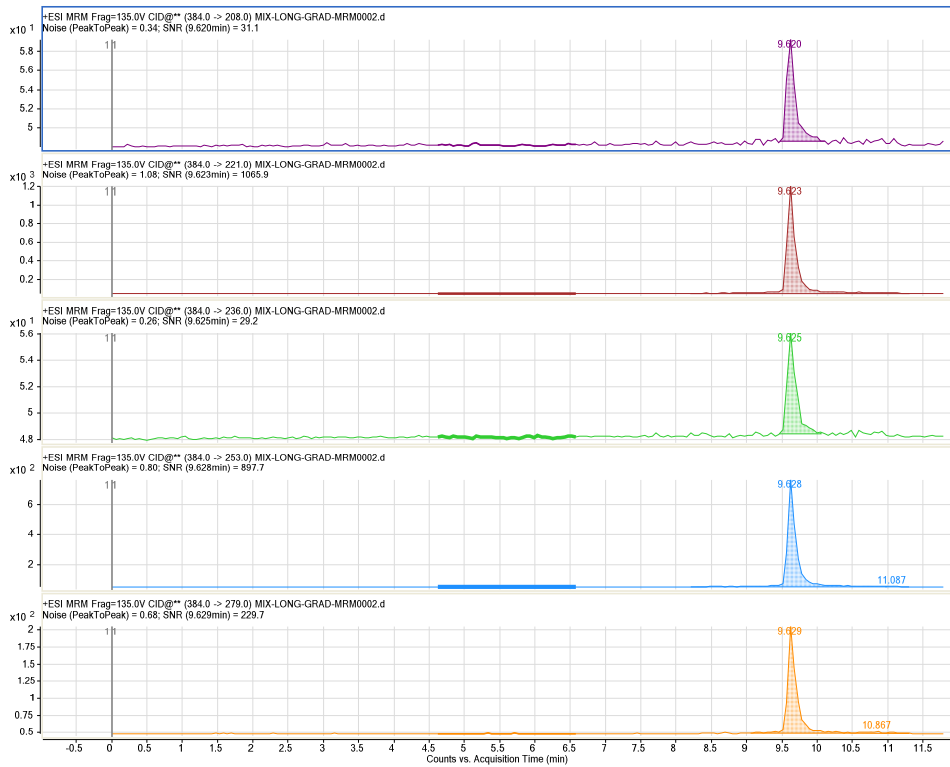
N* - ჩატარებული ანალიზის რაოდენობა

ცხრილში მოცემული შედეგების თანახმად წარმოდგენილი ანალიზის მეთოდით შესაძლებელია საკვლევ ობიექტში მცირე რაოდენობის ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის, კლოზაპინის აღმოჩენა (2.12-3.02 ნგ/მლ ფარგლებში) და რაოდენობრივი განსაზღვრა (6.31-9.12 ნგ/მლ ფარგლებში).

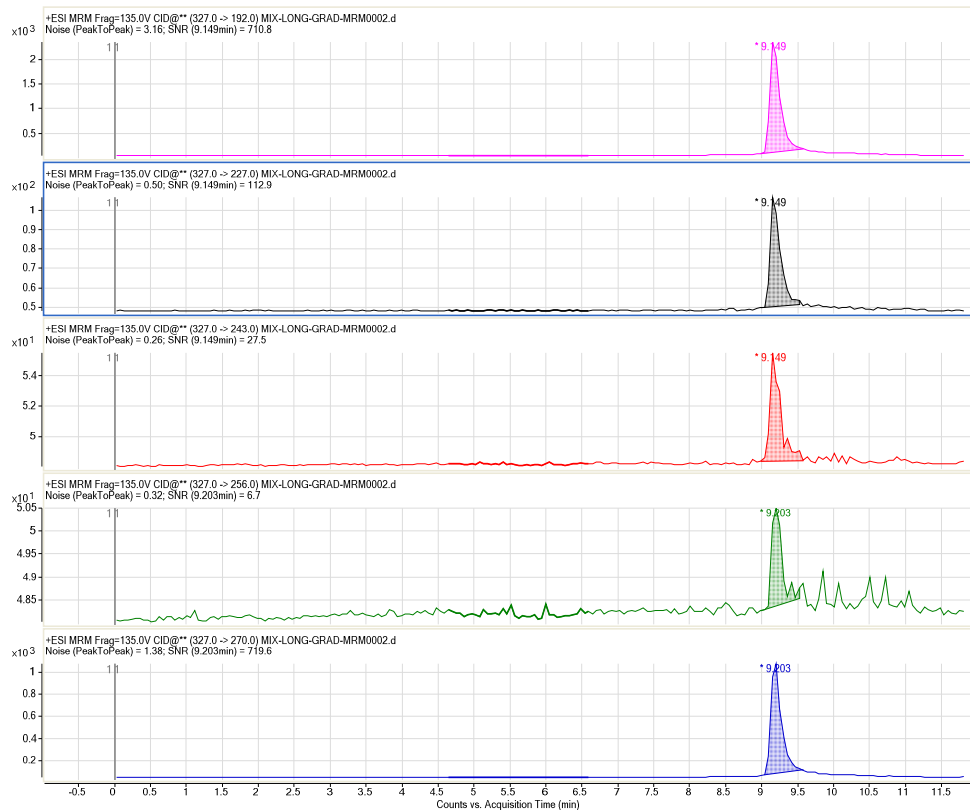
მოცემულ პირობებში ასევე დაგადგინეთ სიგნალის და ხმაურის თანაფარდობა, რომელიც იყო განსასაზღვრი მინიმუმის შემთხვევაში $\leq 10:1$, ხოლო აღმოსაჩენი მინიმუმის შემთხვევაში - $\leq 3:1$. შედეგები მოცემულია ქრომატოგრამების სახით, სურათი 66-69.



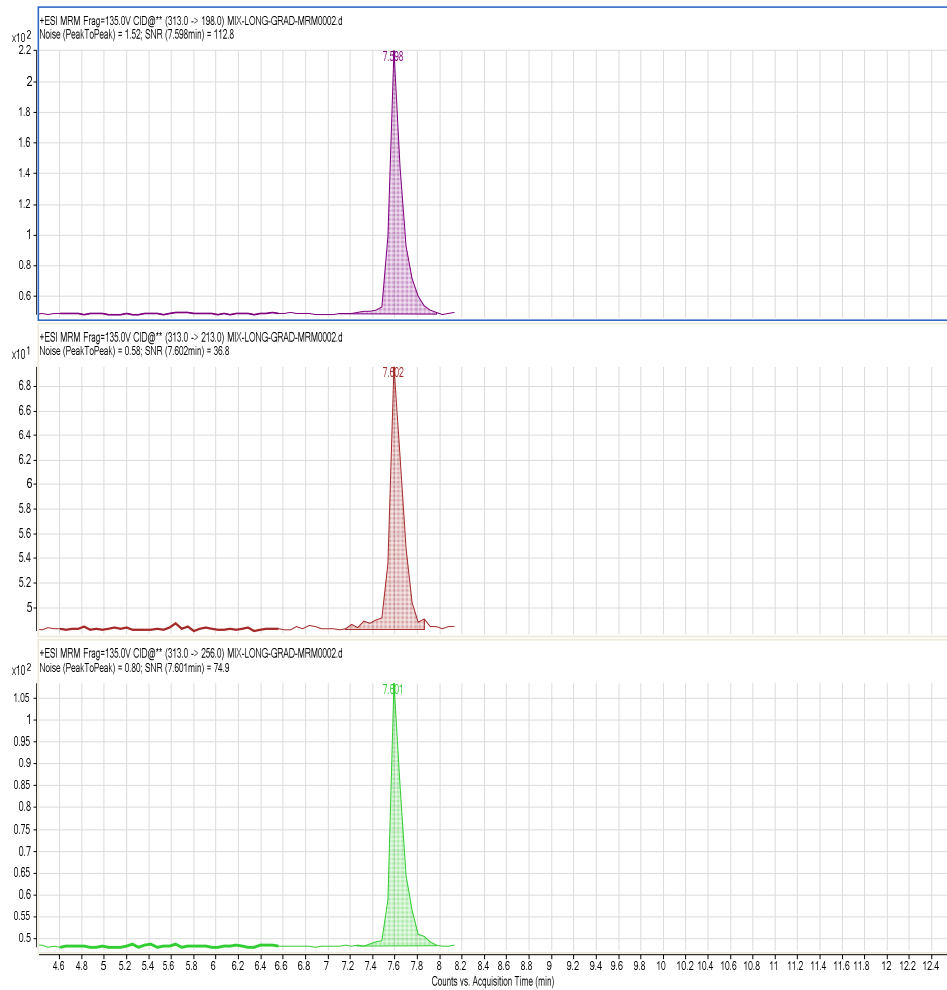
სურათი 66: რისპერიდონის MRM ქრომატოგრამა (S/N)



სურათი 67: ქვეციაპინის MRM ქრომატოგრამა (S/N)



სურათი 68: კლოზაპინის MRM ქრომატოგრამა (S/N)



სურათი 69: ოლანზაპინის MRM ქრომატოგრამა (S/N)

სელექციურობა

სელექციურობა არის ანალიზის მეთოდის შესაძლებლობა მოახდინოს საკვლევი ნივთიერების დიფერენცირება მატრიცაში არსებული ენდოგენური ნივთიერებებისაგან და საანალიზო ნიმუშში არსებული სხვა სავარაუდოდ თანმხლები კომპონენტებისაგან. ეს შეიძლება იყოს დაშლის და სინთეზის პროექტები, მინარევები, მატრიცა და ასე შემდეგ.

ანალიზის მეთოდის სელექციურობა შესაბამისად გულისხმობს შემდეგ შედეგებს:

- თვისობრივი ანალიზი - უზრუნველყოფს საკვლევი ნივთიერების იდენტიფიკაციას. უნდა დადასტურდეს მჭიდროდ დაკავშირებული

სტრუქტურულ ნაერთებს შორის სამიზნე ნივთიერების იდენტიფიკაციის შესაძლებლობა.

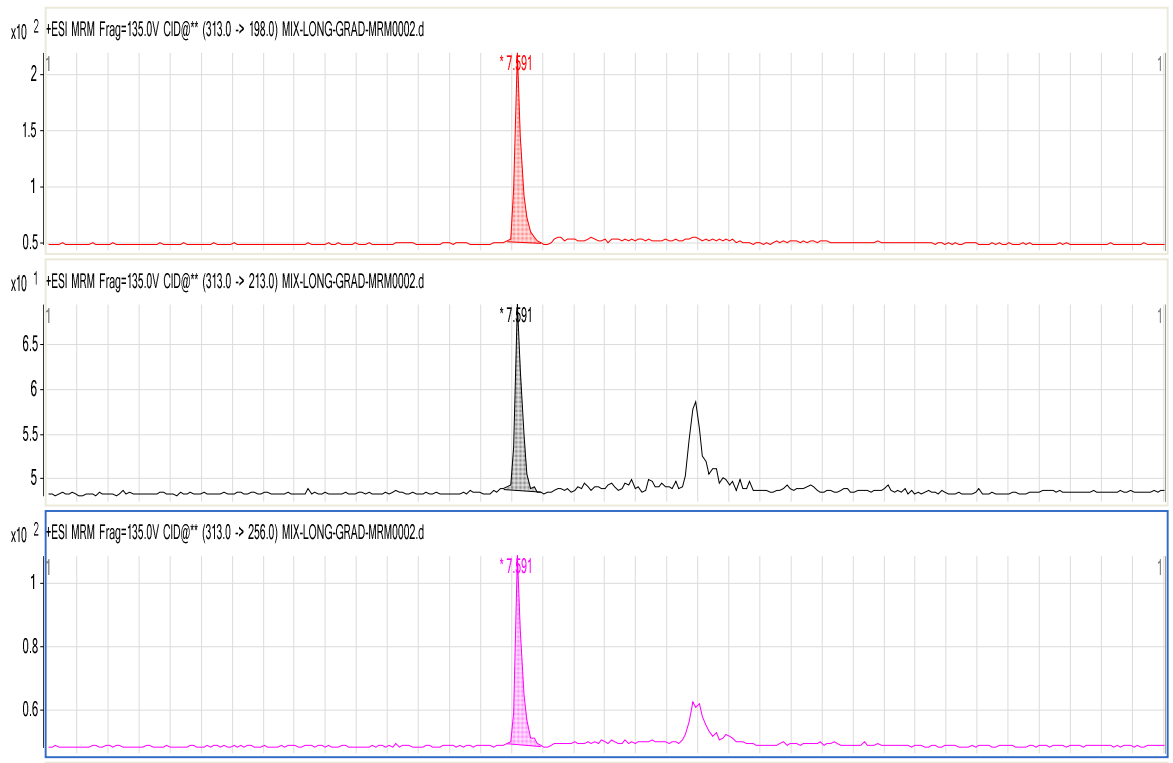
- ტესტი მინარევებზე, უზრუნველყოფს ყველა არსებული მინარევის შემცველობის დადგენას.
- რაოდენობრივი ანალიზი - უნდა დადასტურდეს რომ ანალიზის მეთოდის გამოყენებისას შედეგებზე გავლენას არ მოახდენს ობიექტში არსებული მინარევები, შემავსებლები ან სხვა კომპონენტები [87, 134].

სელექციურობის დასადგენად მოვამზადეთ საანალიზო სისხლის 6-6 ნიმუში. საანალიზო ობიექტების ერთი სერია არ შეიცავდა სამიზნე ნივთიერებებს, ხოლო მეორე სერია კი – შეიცავდა ოთხივე სამიზნე ნივთიერებას. მოვახდინეთ ექსტრაქცია და ქრომატოგრაფირება ანალიზის მეთოდში მითითებული პირობებით (ქვეთავი 4.7). შედეგები მოცემულია № 26 ცხრილში.

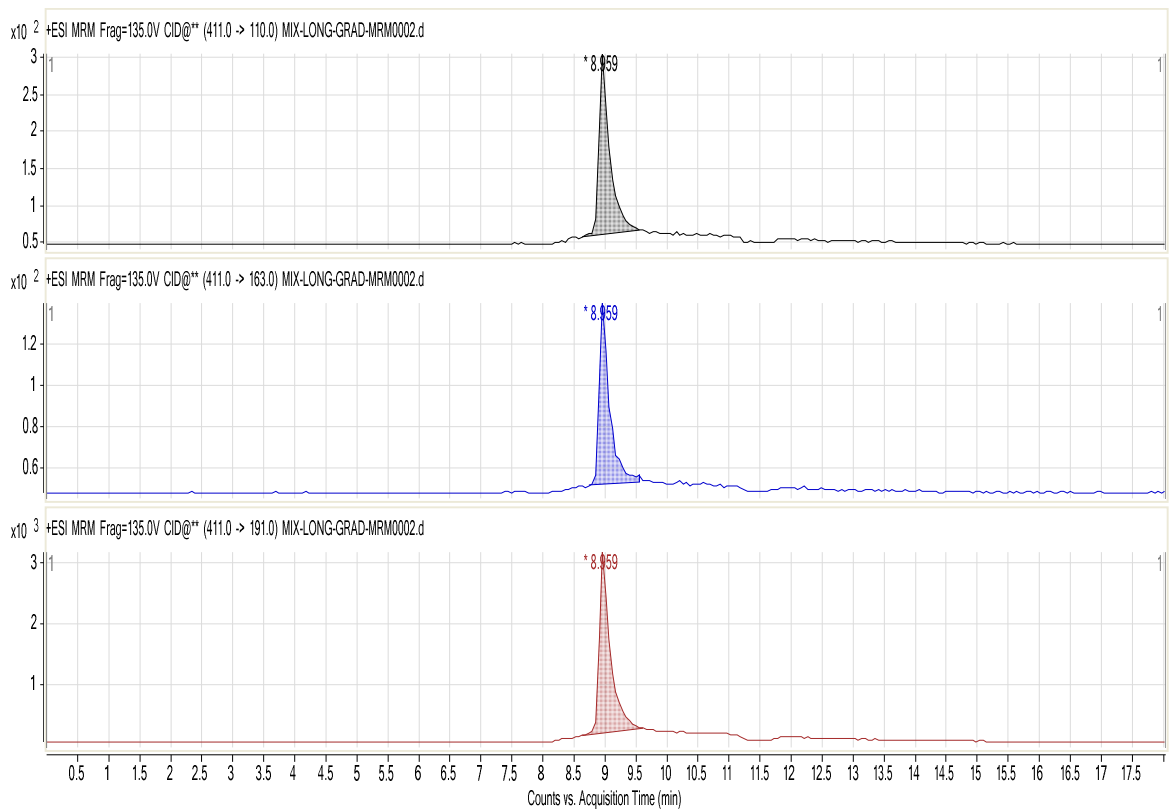
ცხრილი 26: სამიზნე ნივთიერებების და სუფთა ნიმუშის ქრომატოგრაფირების შედეგები

საკვლევი ობიექტი	ანალიზის რაოდენობა	შეკავების დრო/წთ
ოლანზაპინი	6	7.5
რისპერიდონი	6	8.9
ქვეტიაპინი	6	9.6
კლოზაპინი	6	9.1
ბიოლოგიური ობიექტის ნულოვანი ნიმუში	6	0

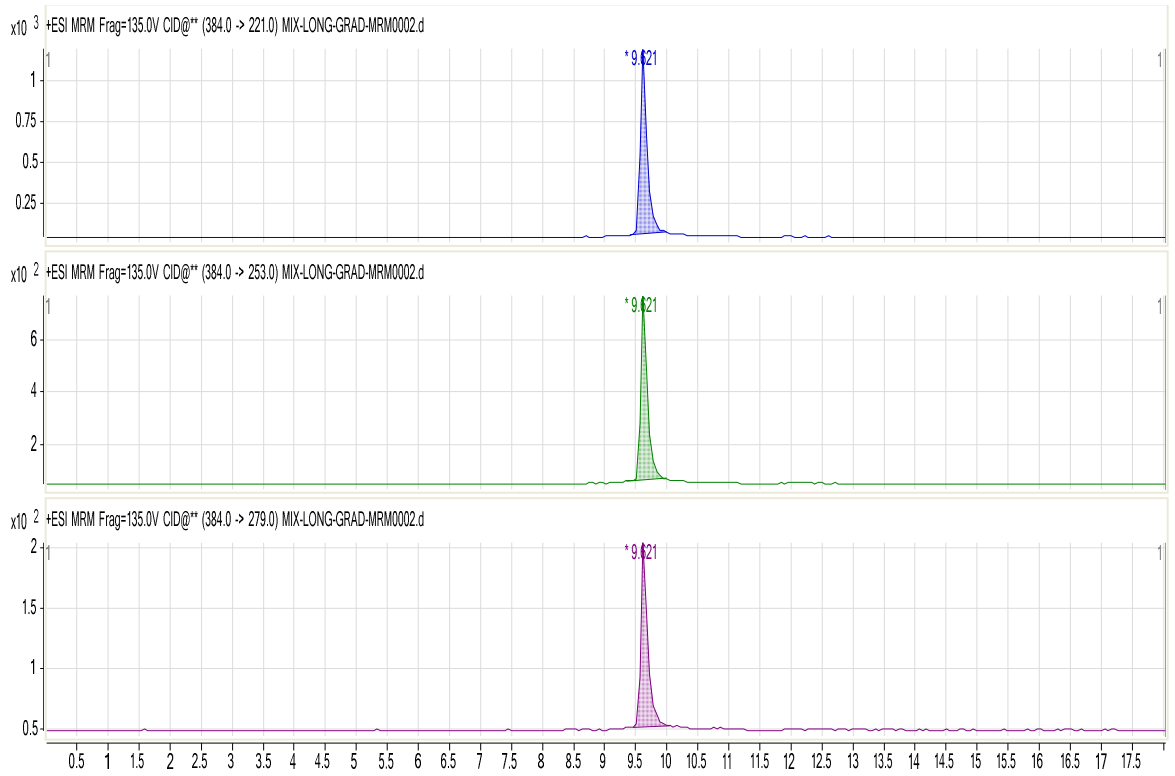
ქრომატოგრამების ანალიზით დავადგინეთ, რომ მეთოდი სელექციურია, რადგან ენდოგენურმა ნივთიერებებმა არ მოახდინეს გავლენა ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის, კლოზაპინის შეკავების დროზე და ნულოვანი სისხლის ნიმუშის ქრომატოგრამაზე არ აღინიშნება საკვლევი ნივთიერების პიკები. (სურათი 70-73).



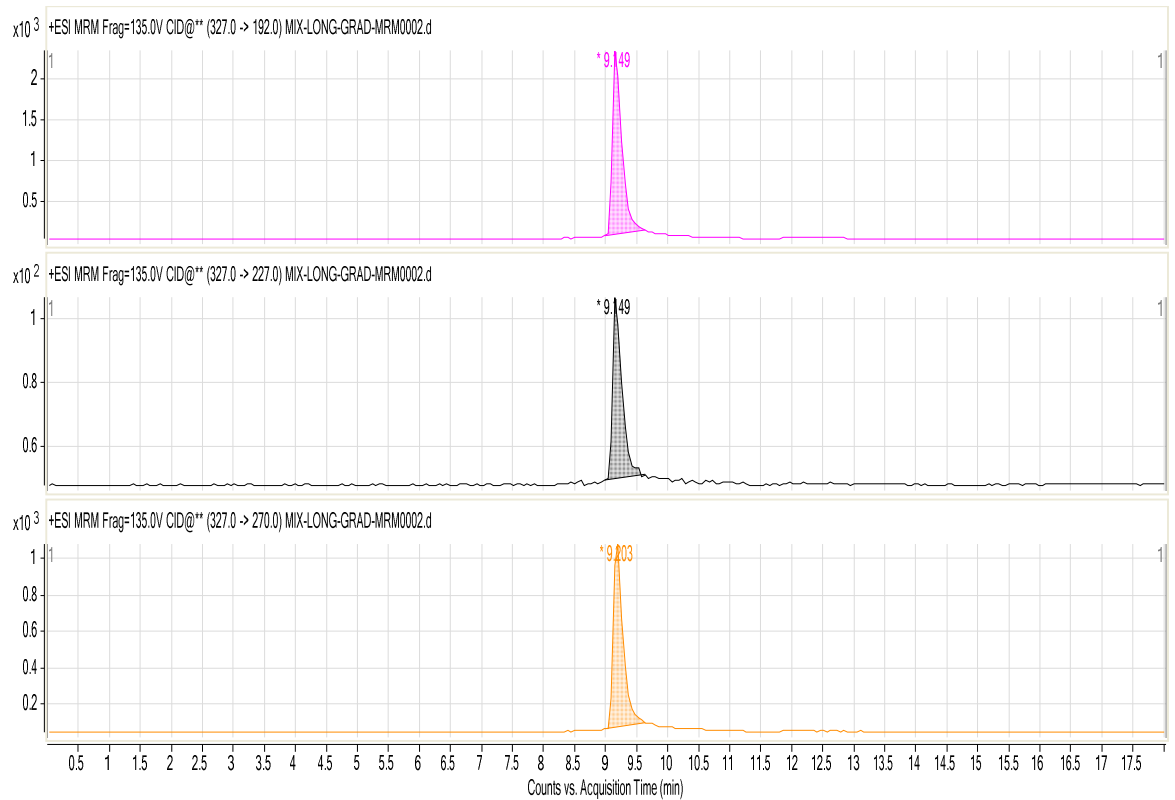
სურათი 70: ოლანზაპინის MRM ქრომატოგრამა



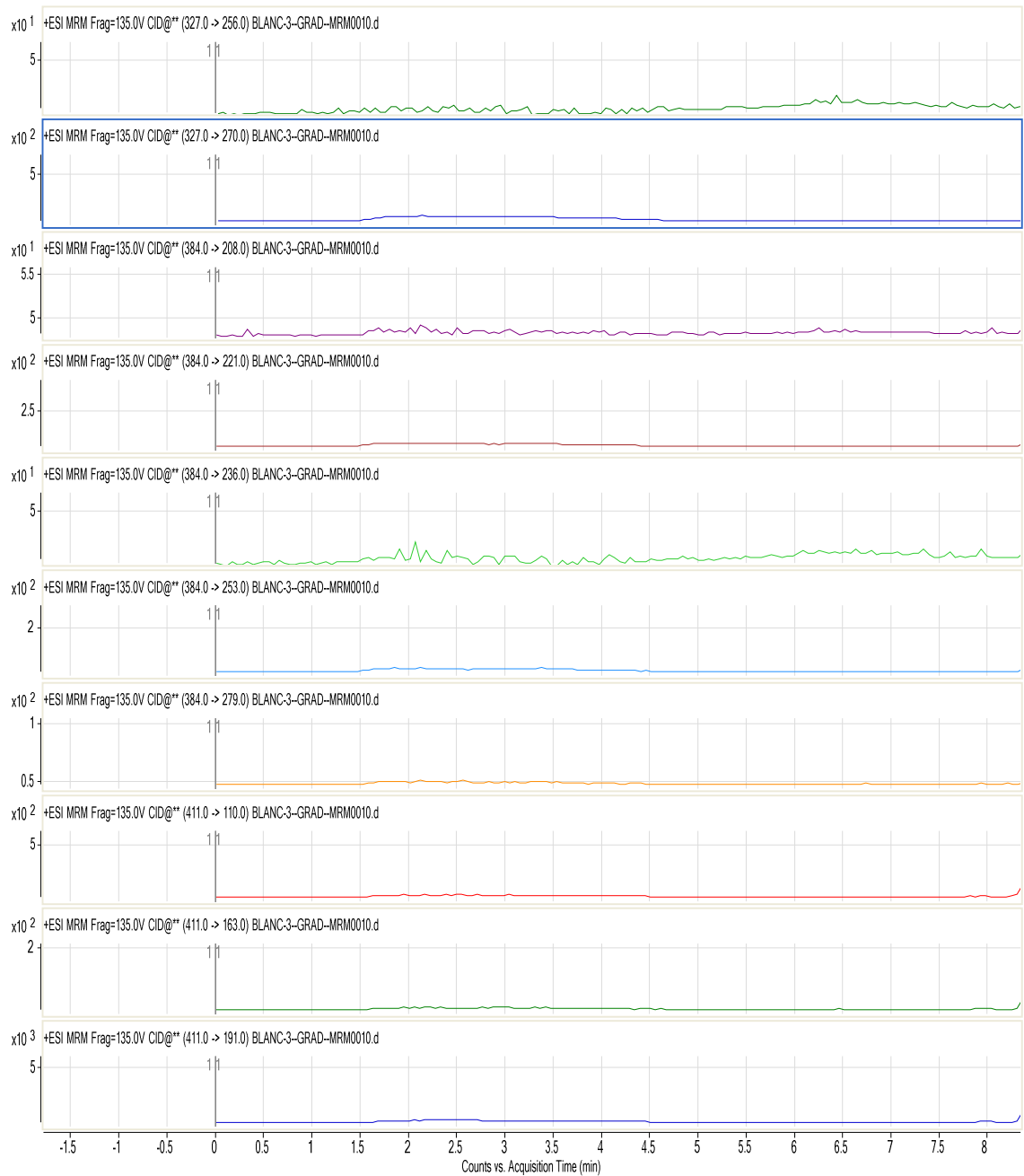
სურათი 71: რისპერიდონის MRM ქრომატოგრამა



სურათი 72: ქვეტიაპინის MRM ქრომატოგრამა



სურათი 73: კლზაპინის MRM ქრომატოგრამა



სურათი 73: ნულგანი სისხლის ნიმუშის MRM ქრომატოგრამა

ექსტრაქციის ხარისხი

ექსტრაქციის ხარისხი წარმოადგენს იზოლირების ეფექტურობას მოცემული ანალიზის მეთოდის პირობებში. ექსტრაქციის ხარისხი განისაზღვრება ექსტრაგირებული და არაექსტრაგირებული ნიმუშების ანალიზისას მიღებული სიგნალის შედარებით.

მოცემულ პარამეტრზე მნიშვნელოვან გავლენას ახდენს იზოლირების მეთოდის ეფექტურობა. არ არის სავალდებულო რომ ანალიზის მეთოდის ექსტრაქციის ხარისხი იყოს 100%. იზოლირების ხარისხი უნდა შემოწმდეს სამ კონცენტრაციაზე (დაბალი, საშუალო, მაღალი) არაექსტრაგირებულ ნიმუშთან შედარებით, რომელიც შეესაბამება 100% ექსტრაქციის ხარისხს [87, 79].

ექსტრაქციის ხარისხის დადგენის მიზნით მოვამზადეთ ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის სამი სხვადასხვა კონცენტრაციის სტანდარტული ხსნარი, რომლის ექსტრაქციის ხარისხი შეესაბამებოდა 100%. ასევე ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის საანალიზო ნიმუშები (10, 25, 50 ნგ/მლ), საანალიზო სისხლში განზავებით. საანალიზო ნიმუშები ექსტრაგირება მოვახდინეთ ანალიზის მეთოდში მითითებული მყარფაზური ექსტრაქციის პირობების შესაბამისად. მიღებული შედეგები მოცემულია ცხრილში 27.

ექსტრაქციის ხარისხი გამოვთვალეთ შემდეგი ფორმულით:

$$\text{ექსტრაქციის ხარისხი \%} = \frac{PA_{SM} \times 100}{PA_{ST}}$$

ცხრილი 27: ექსტრაქციის ხარისხის მნიშვნელობა

ნივთიერების დასახელება	N*	C** ნგ/მლ	PA _{ST} ***	PA _{SM} ****	ექსტრაქციის ხარისხი %
ოლანზაპინი	6	10	308952	281500	91.1
	6	25	986325	912656	92.5
	6	50	2436870	2232640	91.6
რისპერიდონი	6	10	175997	164832	93.7
	6	25	602453	565995	93.9
	6	50	1497820	1412294	94.3
ქვეტიაპინი	6	10	335680	305524	91.0
	6	25	1123540	1025654	91.3
	6	50	2765486	2535214	91.7
კლოზაპინი	6	10	358898	332970	92.8
	6	25	1468700	1366040	93.0
	6	50	3235470	3033840	93.8

N* - საანალიზო ნიმუშების რაოდენობა

C** - საანალიზო ხსნარის კონცენტრაცია

PA_{ST}*** - სტანდარტული ხსნარების ქრომატოგრამებზე ნივთიერების პიკის ფართობი

PA_{SM}**** - ექსტრაგირებული ნიმუშების ქრომატოგრამებზე ნივთიერების პიკის ფართობი

წარმოდგენილი ცხრილის მხედვით დავადგინეთ, რომ მოცემული ანალიზის მეთოდის პირობებში ექსტრაქციის ხარისხი აკმაყოფილებს დადგენილ ნორმებს, რომელიც უნდა იყოს >80%, შესაბამისად ყველა მიღებული შედეგი მეტია დადგენილ ნორმაზე.

მატრიცის ეფექტი

მატრიცის ეფექტი არის ანალიზის შედეგებზე პირდაპირი ან ირიბი გავლენა, რომელიც შესაძლოა გამოიწვიოს ნიმუშში არსებულმა სხვადასხვა ნივთიერებებმა.

მატრიცის ეფექტის დადგენა აუცილებელია მასსპექტრომეტრული დეტექტირების შემთხვევაში. სითხური ქრომატოგრაფი - ტანდემური მასსპექტრომეტრით წარმოდგენს მაღალი მგრძობელობის აპარატს, შესაბამისად მინიშვნელოვანია შედეგებზე ენდოგენური ნივთიერებების გავლენის გამორიცხვა. ენდოგენურმა კომპონენტებმა შესაძლოა გავლენა მოახდინონ საანალიზო ნივთიერებების იონიზაციაზე.

ელექტროგაფრქვევითი იონიზაციის დროს მატრიცის ეფექტს იწვევს მატრიცის კომპონენტების (არააქროლადი ხსნარები) და საანალიზო ნივთიერების მოლეკულებს შორის კონკურენტული ურთიერთქმედება წვეთის ზედაპირზე მოხვედრისას. მატრიცის ეფექტის დასადგენად მოწოდებულია სხვადასხვა მეთოდი, მათ შორის ხდება სისტემაში საანალიზო ნიმუშის და შემდეგ საკვლევი ნივთიერების ნულოვანი ექსტრაგირებული ნიმუშის შეყვანა. ნებისეირი ინტერფერენცია, რომელიც ელუირდება სვეტიდან შესაძლოა განვიხილოთ იონიზაციაზე ზემოქმედებად.

ასევე მატრიცის ეფექტის დასადგენად ბიოლოგიური ობიექტის საკალიბრო გრაფიკი უნდა შევადაროთ სუფთა მატრიცის ანალიზის შედეგად მიღებულ საკალიბრო გრაფიკებს.

ასევე შემოთავაზებულია ნიმუშების ნაკრების ტესტირების მეთოდი.

ნაკრებში წარმოდგენილია სხვადასხვა ტიპის ნიმუშები, 1 - სუფთა ხსნარი, რომელიც მომზადებულია მოძრავი ფაზისგან, 2 - ბიოლოგიური ობიექტის სუფთა ნიმუშიდან მიღებული ექსტრაქტი, რომელსაც საკვლევი ნივთიერება დამატებული აქვს ესტაქციის შემდეგ.

აბსოლტური მატრიცის ეფექტის დადგენა ხდება პიკის ფართობის შედარებით, რომელიც მიღებულია ორი სხვადასხვა ტიპის ნიმუშიდან:

1. სუფთა სტანდარტის ნიმუში
2. ნიმუში რომელსაც სამიზნე ნივთიერება დამატებული აქვს ექსტრაქციის შემდეგ.

აბსოლტური მატრიცის ეფექტი გამოითვლება ფორმულით:

$$ME \% = \frac{B \times 100}{A}$$

სადაც:

A -სუფთა ნიმუშში სტანდარტის პიკის ფართობი

B -საანალიზო ნიმუშში სტანდარტის პიკის ფართობი, რომელშიც სტანდარტი დამატებულია ესტრაქციის შემდეგ.

თუ მიღებულ შედეგებში მატრიცის ეფექტი 100%-ზე მეტია ეს მიუთითებს იონების მატებაზე, ხოლო თუ 100%-ზე ნაკლებია მიუთითებს იონების შემცირებაზე.

ფარდობითი მატრიცის ეფექტის მნიშვნელობა შესაძლებელია დადგინდეს რამოდენიმე სერიის ნიმუშების მატრიცის ეფექტის მაჩვენებლის განსაზღვრით და ვარიაციის კოეფიციენტის (CV%) დადგენით.

მატრიცის ეფექტი ზეგავლენა ანალიზის შედეგებზე არ მიიჩნევა მნიშვნელოვნად 85%-115% ფარგლებში და ვარიაციის კოეფიციენტი უნდა იყოს $\leq 15\%$.

მატრიცის ეფექტის პარამეტრის ვალიდაციისას უარყოფითი შედეგი მიუთითებს, რომ შესაძლებელია იზოლირების მეთოდი ან ქრომატოგრაფირების და იონიზაციის პირობები [81, 187].

მატრიცის ეფექტის დასადგენად ავიღეთ სისხლი რომელიც არ შეიცავდა საკვლევ ნივთიერებას და მოვახდინეთ ექსტრაგირება ანალიზის მეთოდში მითითებული პირობებით (ქვეთავი 4.7).

მიღებულ ექსტრაქტს დავამატეთ საკვლევი ნივთიერება, რომ მიგველო 6 საანალიზო ხსნარი კონცენტრაციით 10, 25, 50 ნგ/მლ. ასევე მოვამზადეთ მსგავსი კონცენტრაციის ხსნარი გამხსნელში – აცეტონტრილი/დეიონიზირებული წყლით (1:3).

ნიმუშების მომზადების შემდეგ მოვახდინეთ ქრომატოგრაფირება. მიღებული შედეგები მოცემულია №28-31 ცხრილში.

ცხრილი 28: აბსოლიტური მატრიცის ეფექტის მონაცემები ოლანზაპინის განსაზღვრისას (n=5)

საანალიზო ხსნარის კონცენტრაცია ნგ/მლ	აბსოლიტური მატრიცის ეფექტი %	ვარიაციის კოეფიციენტი % (CV)
10.00	97.60	1.00
25.00	97.30	0.80
50.00	98.20	0.90

ცხრილი 29: აბსოლიტური მატრიცის ეფექტის მონაცემები რისპერიდონის განსაზღვრისას (n=5)

საანალიზო ხსნარის კონცენტრაცია ნგ/მლ	აბსოლიტური მატრიცის ეფექტი %	ვარიაციის კოეფიციენტი % (CV)
10.00	92.98	1.20
25.00	94.40	1.10
50.00	94.76	0.40

ცხრილი 30: აბსოლიტური მატრიცის ეფექტის მონაცემები ქვეტიპინის განსაზღვრისას (n=5)

საანალიზო ხსნარის კონცენტრაცია ნგ/მლ	აბსოლიტური მატრიცის ეფექტი %	ვარიაციის კოეფიციენტი % (CV)
10.00	93.36	2.20
25.00	93.57	0.60
50.00	94.00	0.70

ცხრილი 31: აბსოლუტური მატრიცის ეფექტის მონაცემები კლოზაპინის განსაზღვრისას (n=5)

საანალიზო ხსნარის კონცენტრაცია ნგ/მლ	აბსოლუტური მატრიცის ეფექტი %	ვარიაციის კოეფიციენტი % (CV)
10.00	93.80	2.60
25.00	94.08	0.40
50.00	95.00	0.50

მიღებული შედეგების მიხედვით მატრიცის ეფექტი იყო 92%-97% ის ფარგლებში (ვარიაციის კოეფიციენტი $CV < 15\%$) რაც მიუთითებს, რომ მოცემული ანალიზის მეთოდის პირობებში არ გამოვლინდა მატრიცის ეფექტი.

სტაბილურობა

სტაბილურობა არის საანალიზო ნივთიერების მატრიცაში ქიმიური მდგრადობის შენარჩუნება განსაზღვრულ პირობებში და დროის ინტერვალში. სტაბილურობა მნიშვნელოვანი კომპონენტია, განსაკუთრებით სასამართლო ქიმიური ექსპერტიზის დროს, როდესაც არსებობს ბიოლოგიური ობიექტის ხანგრძლივი შენახვის საჭიროება. შესწავალამ უნდა უზრუნველყოს იმის დადგენა თუ რამდენად სტაბილურია საანალიზო ნიმუში მისი აღებისას, შენახვისას (გაყინულ მდგომარეობაში თუ შენახვის მითითებულ ტემპერატურაზე), ასევე მნიშვნელოვანია სტაბილურობის დადგენა ციკლური გაყინვის შემთხვევაში [134, 200].

სტაბილურობის დადგენის მიზნით ჩავატარეთ ექსპერიმენტი.

საკვლევი ნიმუშების მომზადება:

სტანდარტული ხსნარის მოსამზადებლად გამხსნელად გამოვიყენეთ მეთანოლი და ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის, კლოზაპინის სტანდარტები. მოვამზადეთ ხსნარი კონცენტრაციით 1 მგ/მლ და შევურიეთ ულტრაბგერით შემრევზე 20 წთ-ის განმავლობაში. შუალედურ სტანდარტული ხსნარის მოსამზადებლად (500მკგ/მლ) მიღებული ძირითად ხსნარი განვაზავეთ მეთანოლით.

ადამიანის სუფთა სისხლი მოგათავსეთ Eppendorf - ის სისხლის შესაგროვებელ ტუბში. მიღებული სისხლის ნიმუში გავყავი ოთხ ნაწილად, ერთი ნაწილი შევინახეთ სუფთა სახით, ხოლო დანარჩენი სამიდან შუალედური სტანდარტული ხსნარის გამოყენებით მოვამზადეთ ნიმუშები სტაბილურობაზე შესასწავლად კონცენტრაციით 15, 50, 100 ნგ/მლ სამიხნე ნივთიერებების შემცველობით. თითოეულ კონცენტრაციაზე მომზადებული იყო სამი სერიის ხსნარი.

მომზადებული ნიმუშები სტაბილურობის შესწავლისათვის შევინახეთ განსხვავებულ პირობებში:

1. ნიმუშები ინახებოდა ოთახის ტემპერატურაზე, სინათლისაგან დაცულ ადგილას. შემოწმება ხდებოდა 24 და 48 საათის შემდეგ.
 2. ნიმუშები ინახებოდა 4°C ტემპერატურაზე, სინათლისაგან დაცულ ადგილას. შემოწმება ხდებოდა 96 და 192 საათის შემდეგ.
 3. ნიმუშები ინახებოდა -15°C ტემპერატურაზე, სინათლისაგან დაცულ ადგილას. შემოწმება ხდებოდა 60 და 90 დღის შემდეგ.
 4. ციკლური გაყინვა - ნიმუშები ინახებოდა სინათლისაგან დაცულ ადგილას, -15°C ტემპერატურაზე 48 საათის განმავლობაში, შემდეგ გამოვიდეთ ოთახის ტემპერატურაზე და დავაყოვნეთ 24 საათის განმავლობაში და შემდეგ ისევ შევინახეთ -15°C ტემპერატურაზე. შემოწმება ხდებოდა 60 და 90 დღის შემდეგ.
- სტაბილურობის კვლევის შედეგები მოცემულია №32-35 ცხრილში.
 ნიმუშების სხვადასხვა პირობებში შენახვისას სამიხნე ნივთიერებების რაოდენობრივი შემცველობის ცვლილების დინამიკა (ნომინალურ კონცენტრაციაზე გადაანგარიშებით) გამოვთვალეთ შემდეგი ფორმულით

$$\text{ცვლილება \%} = \frac{C_{CS} - C_{SS} \times 100}{C_{CS}}$$

სადაც: *C_{SS} სტაბილურობის ნიმუშის დადგენილი კონცენტრაცია

**C_{CS} შესადარებელი ნიმუშის ნომინალური კონცენტრაცია

საკვლევი ობიექტები ითვლება სტაბილურად თუ რაოდენობრივი განსაზღვრის მაჩვენებელი იქნება ±15%-ის ფარგლებში (15% ≤ CV%)

ცხრილი 32: ოლანზაპინის სტაბილურობის მონაცემები

დროის ინტერვალი	*C _{cs} - ნგ/მლ	**C _{ss} - ნგ/მლ	ცვლილება %	CV %
ოთახის ტემპერატურა				
24 საათი	15	14.58	-2.8	1.2
	50	49.8	-0.5	3.2
	100	98.3	-1.7	2.5
48 საათი	15	14.61	-2.6	3.1
	50	49.75	-0.4	2.7
	100	99.30	-0.7	1.9
4°C ტემპერატურა				
96 საათი	15	14.65	-2.3	1.5
	50	49.1	-1.8	3.1
	100	98.6	-1.4	2.1
192 საათი	15	14.97	-0.2	3.8
	50	49.81	-0.4	2.9
	100	99.5	-0.5	1.3
-15°C ტემპერატურა				
60 დღე	15	14.98	-0.1	1.2
	50	49.94	-0.1	3.5
	100	100.03	0.1	1.1
90 დღე	15	14.65	-2.3	3.9
	50	49.88	-0.2	2.1
	100	99.3	-0.7	1.8
ციკლური გაყინვა				
60 დღე	15	14.97	-0.2	1.8
	50	49.92	-0.2	3.3
	100	99.40	-0.6	1.3
90 დღე	15	14.98	-0.1	3.7
	50	49.91	-0.2	2.5
	100	98.91	-1.1	1.2

CV % - ვარიაციის კოეფიციენტი

ცხრილი 33. რისპერიდონის სტაბილურობის მონაცემები

დროის ინტერვალი	C* cs - ნგ/მლ	C**ss - ნგ/მლ	ცვლილება %	CV %
თახის ტემპერატურა				
24 საათი	15	14.96	-0.3	1.9
	50	49.98	0.0	3.8
	100	98.23	-1.8	1.9
48 საათი	15	14.96	-0.3	3.8
	50	49.95	-0.1	2.9
	100	98.15	1.8	3.4
4°C ტემპერატურა				
96 საათი	15	14.98	-0.1	1.8
	50	49.9	-0.2	3.2
	100	98.93	-1.1	2.3
192 საათი	15	14.97	-0.2	3.9
	50	49.95	-0.1	2.8
	100	98.76	-1.2	2.2
-15°C ტემპერატურა				
60 დღე	15	14.98	-0.1	1.4
	50	49.94	-0.1	3.9
	100	98.88	-1.1	1.2
90 დღე	15	14.95	-0.3	3.8
	50	49.98	0.0	2.2
	100	99.34	-0.7	0.8
ციკლური გაყინვა				
60 დღე	15	14.96	-0.3	1.4
	50	49.95	-0.1	3.6
	100	99.21	-0.8	1.3
90 დღე	15	14.96	-0.3	3.7
	50	49.97	-0.1	2.4
	100	99.33	-0.7	0.8

CV % - ვარიაციის კოეფიციენტი

ცხრილი 34: ქვეტიპინის სტაბილურობის მონაცემები

დროის ინტერვალი	C _{cs} - ნგ/მლ	C _{ss} - ნგ/მლ	ცვლილება %	CV %
ოთახის ტემპერატურა				
24 საათი	15	14.79	-1.4	1.6
	50	49.78	-0.4	3.5
	100	97.96	-2.0	1.9
48 საათში	15	14.98	-0.1	3.6
	50	49.96	-0.1	2.9
	100	99.63	-0.4	1.5
4°C ტემპერატურა				
96 საათი	15	14.96	-0.3	1.9
	50	49.97	-0.1	3.3
	100	99.13	-0.9	1.3
192 საათი	15	14.98	-0.1	3.8
	50	49.98	0.0	2.5
	100	99.56	-0.4	0.7
-15°C ტემპერატურა				
60 დღე	15	14.96	-0.3	1.9
	50	49.97	-0.1	3.8
	100	99.69	-0.3	1.2
90 დღე	15	14.98	-0.1	3.7
	50	49.97	-0.1	2.5
	100	99.25	-0.8	1.3
ციკლური გაყინვა				
60 დღე	15	14.91	-0.6	1.8
	50	49.97	-0.1	3.9
	100	99.71	-0.3	1.9
90 დღე	15	14.96	-0.3	3.9
	50	49.98	0.0	3.1
	100	98.86	-1.1	2.3

CV % - ვარიაციის კოეფიციენტი

ცხრილი 35: კლოზაპინის სტაბილურობის მონაცემები

დროის ინტერვალი	C _{cs} - ნგ/მლ	C _{ss} - ნგ/მლ	ცვლილება %	CV %
ოთახის ტემპერატურა				
24 საათი	15	14.78	-1.5	1.6
	50	49.89	-0.2	3.5
	100	99.36	-0.6	1.6
48 საათი	15	14.87	-0.9	3.6
	50	49.99	0.0	2.9
	100	98.72	-1.3	3.4
4°C ტემპერატურა				
96 საათი	15	14.97	-0.2	1.9
	50	49.98	0.0	3.3
	100	98.31	-1.7	2.9
192 საათი	15	14.99	-0.1	3.8
	50	49.98	0.0	2.5
	100	99.73	-0.3	2.7
-15°C ტემპერატურა				
60 დღე	15	14.97	-0.2	1.9
	50	49.98	0.0	3.8
	100	99.86	-0.1	1.6
90 დღე	15	14.98	-0.1	3.7
	50	49.89	-0.2	2.5
	100	98.91	-1.1	3.4
ციკლური გაყინვა				
60 დღე	15	14.95	-0.3	1.8
	50	49.98	0.0	3.9
	100	99.84	-0.2	1.4
90 დღე	15	14.92	-0.5	3.9
	50	49.95	-0.1	3.1
	100	99.78	-0.2	2.1

CV % - ვარიაციის კოეფიციენტი

მიღებული მონაცემების საფუძველზე დავადგინეთ, რომ საანალიზო ბიოლოგიური ობიექტის საკვლევი ნიმუშები ოთახის ტემპერატურაზე შენახვისას

ინარჩუნებენ სტაბილურობას 48 საათის განმავლობაში, 4°C ტემპერატურაზე - 196 საათი, - 15°C ტემპერატურაზე - 90 დღის განმავლობაში. ასევე ნიმუშები ინარჩუნებს სტაბილურობას ციკლური გაყინვისას 90 დღის განმავლობაში. შესაბამისად ნიმუშების შენახვა შესაძლებელია ზემოთ მითითებული ტემპერატურული რეჟიმისა და შესაბამისი ხანგრძლივობის მიხედვით.

თავი V დასკვნები

1. შესწავლილია შარდიდან ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის იზოლირების ხარისხზე მოქმედი ფაქტორები. დადგენილია სითხე-სითხე ექსტრაქციის ოპტიმალური პირობები (გამხსნელთა სისტემა: ეთილაცეტატი – ჰეპტანი – დიქლორმეთანი – იზოპროპანოლი 60:20:15:5, pH-9.00, ორჯერადი ექსტრაქცია, ხანგრძლივობა 5 წთ), რომელიც უზრუნველყოფს ოთხივე სამიზნე ნივთიერების სწრაფ, ხარჯეფექტურ და ერთდროულ ექსტრაქციას (80-85% ფარგლებში).
2. შემუშავებულია მოდელური ბიოლოგიური ობიექტებიდან (სისხლი, პლაზმა) ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის, მყარფაზური ექსტრაქციის ოპტიმალური პირობები (სორბენტის კონდეცირება, ნიმუშის დამუშავება, სორბენტის გასუფთავება, ექსტრაგირება), რომლებიც უზრუნველყოფენ ოთხივე საკვლევი ნივთიერების მაქსიმალურ ექსტრაქციას (91-94%).
3. შემუშავებულია ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ერთდროული იდენტიფიცირების გაზურ ქრომატოგრაფიული მასსპექტრომეტრული მეთოდი, როგორც ბიოლოგიურ ობიექტებში, ასევე საგანმატარებლებში. შემუშავებული მეთოდი აპრობირებულია გარდაცვლილი ადამიანის შარდში კლოზაპინის იდენტიფიცირებისათვის.
4. შემუშავებულია ადამიანის სისხლში ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის თვისობრივ-რაოდენობრივი განსაზღვრის სითხურ ქრომატოგრაფიული – ტანდემური მასსპექტრომეტრული მეთოდი. მეთოდი გამოირჩევა სწორხაზოვნებით (საკალიბრო კონცენტრაცია 10-100ნგ/მლ, კორელაციის კოეფიციენტი – ოლანზაპინი $R^2=0.9991$, რისპერიდონი $R^2=0.9980$, ქვეტიაპინი $R^2=0.9989$ კლოზაპინი $R^2=0.9986$); სელექციურობით; დაბალი აღმოსაჩენი მინიმუმით (2.12 ნგ/მლ - 3.02 ნგ/მლ) და განსაზღვრის მინიმუმით (6.31 ნგ/მლ - 9.12 ნგ/მლ) სიზუსტით და სისწორით (90%-99). მეთოდი ხასიათდება მაღალი ექსტრაქციის ხარისხით, არ ავლენს მატრიცის ეფექტს და გამოირჩევა ექსპრესულობით (ანალიზის დრო - 10 წთ).
5. დადასტურებულია შემუშავებული სითხურ ქრომატოგრაფიული – ტანდემური მასსპექტრომეტრული მეთოდის ეფექტურობა ბიოლოგიური სითხეების (პლაზმა, შარდი) მოდელურ ნიმუშებში და გარდაცვლილი ადამიანის

- სისხლში ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის, კლოზაპინის, ერთდროული და ინდივიდუალური ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზისათვის.
6. მოწოდებული სითხური ქრომატოგრაფიული-ტანდემური მასსპექტრომეტრული მეთოდი აპრობირებულია ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის თვისობრივ-რაოდენობრივი ანალიზისათვის სხვადასხვა საგანმატარებლებში (ბლისტერი, ფლაკონი, არამარკირებული ტაბლეტები) და ფარმაცევტული პროდუქტის საწარმოო პროცესში გამოყენებულ აპარატურაზე ნარჩენი კონტამინაციის განსაზღვრისათვის.
 7. თეორიულად დასაბუთებულია, შესწავლილია და დადგენილია მოდელურ ნიმუშებში სამიზნე ნივთიერებების სტაბილურობის მაჩვენებლები: ოთახის ტემპერატურაზე - 48 საათი, 4°C ტემპერატურაზე - 196 საათი, - 15°C ტემპერატურაზე და ციკლური გაყინვისას - 90 დღე.
 8. ექსპერიმენტული კვლევის საფუძველზე თეორიულად დასაბუთებულია და მოწოდებულია ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის, კლოზაპინის ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზის სქემა.

კვლევის შემდგომი განვითარების პერსპექტივები

ოლანზაპინის, რისპერიდონის, ქვეტიაპინის და კლოზაპინის ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზი წარმოადგენს შემდგომი კვლევის ინტერესს, მათ შორის მნიშვნელოვანია:

- ტოქსიკოკინეტიკის შესწავლა შინაგან ორგანოებში და ბიოლოგიურ სითხეებში.
- მეტაბოლიტების აღმოჩენა და რაოდენობრივი განსაზღვრა.
- ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზი ანტიდებრესანტებთან და ფსიქოტროპიულ საშუალებებთან ერთდროული გამოყენების შემთხვევაში.

თავი VI
დისერტაციის თეზისი
Thesis of Disertation

TBILISI STATE MEDICAL UNIVERSITY

Koba Sivsivadze

**CHEMICAL-TOXICOLOGICAL ANALYSIS OF SOME
ANTIPSYCHOTIC DRUGS OF SECOND GENERATION**

Disertation

To Earn Doctoral Degree in Pharmacy

Tbilisi

2017

Scientific Study is completed in:

Tbilisi State Medical University, Department of Pharmaceutical and Toxicological chemistry.

LEMP Levan Samkharauli National Forensic Bureau, Department of Forensic Chemical-Narcology.

GM Pharmaceuticals LTD, Laboratory of the Pharmaceutical Production.

Scientific Supervisor of Research:

Tamaz Murtazashvili – PhD in Pharmacy, TSMU, Head of the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, Professor.

Malkhaz Jokhadze – PhD in Pharmacy, TSMU, Associate Professor of the Direction of Pharmacognosy and Botany.

Experts:

David Chinchradze – PhD in Pharmacy, TSMU, Head of the Direction of Pharmacognosy and Botany, Professor.

Tamaz Chumburidze – PhD in Biology, TSMU, Associate Professor of the Department of Social and clinical Pharmacy.

Malkhaz Getia – PhD in Pharmacy, TSMU, Iovel Qutateladze Institute of Pharmacology, Head of the Department of Pharmaceutical Analysis and Standardization, Chief Researcher.

The dissertation is available in the Tbilisi State Medical University library (29, Vazha-Pshavela ave.).

Maintain a dissertation will take place on 15 June 16.00 in Tbilisi State Medical University administrative building (#33, Vazha-Pshavela ave.).

CHEMICAL-TOXICOLOGICAL ANALYSIS OF SOME ANTIPSYCHOTIC DRUGS OF SECOND GENERATION

Actuality of the Research

Schizophrenia is a severe mental disorder affecting more than 21 million people worldwide. Schizophrenia is characterized by distortions in thinking, perception, emotions, language, sense of self and behaviour. Common experiences include hearing voices and delusions. Worldwide, schizophrenia is associated with considerable disability and may affect educational and occupational performance [178].

Since 1950 the "typical" (first generation) antipsychotic drugs have been used for treatment of schizophrenia, and since 1990 the "atypical"(second generation) antipsychotics have been introduced in medical practice to be equally effective for treatment of psychosis [26, 128].

In recent years, the use of second generation antipsychotic drugs for both medical and non-medical purposes have been sharply increased. In the case, when during the treatment with one of the antipsychotic drugs inadequate result is expressed, for the purpose of effective management of schizophrenia, acute phase and related psychosis, as well as long-term, maintenance treatment and relapse prevention, doctors often resort to antipsychotic polypharmacy, among which an important place hold in the second generation antipsychotics - risperidone, olanzapine, and quetiapine and clozapine [13, 46, 69, 117, 118].

The use of the combination of these drugs may be the cause of acute poisoning, sudden cardiac attack and lethal outcome, as the medications of this group are characterized by serious side effects. The cases of criminal poisoning with antipsychotic drugs also increased, in which several antipsychotic medications or combinations with other psychoactive agents are used simultaneously [16, 163].

Use of the medications with non-medical purposes is a major problem in the recent years. The attention should be paid to the administration of antipsychotic drugs with the purpose of so-called "pharmacy drug addiction", which is an important social problem. Reasoning from their pharmacological actions, it is possible to use them with other agents for the purpose of narcotic intoxication, which provoke the development of substance abuse. In such cases, the risk of acute poisoning and death is also high [23, 55].

Consequently, development of high sensitivity, specific express methods of analysis is very important for clinical laboratory analysis, selection of adequate treatment methods in medical institutions, increase of effectiveness of detoxification measures, in order to ensure safe pharmacotherapy, performing the effective forensic-medical examination, which is a topical issue and has important scientific and practical value.

At the same time, the analysis of literature data showed that there are no systematic, complex studies with respect of chemical-toxicological analysis of risperidone, olanzapine, quetiapine and clozapine. The available methods of isolation and analysis methods require to be improved, as they do not provide simultaneous isolation of several target substances and qualitative-quantitative analysis, determination of small amounts of examined substances and express analysis, which significantly condition the effectiveness of the treatment, selection of detoxification methods and performing the operational and comprehensive forensic-chemical examination.

In addition, the studies do not focus on development of methods for isolation and qualitative-quantitative determination of risperidone, olanzapine, quetiapine and clozapine for analyzing of a object-carriers. In many cases, performing of non-targeted analysis is required for expertise of material evidences. Therefore, the complex approach is necessary for forensic-chemical examination of biological and non-biological origin objects.

With considering the aforementioned, unification and improvement of existing methods of chemical-toxicological analysis of some second-generation antipsychotic drugs: risperidone, olanzapine, quetiapine and clozapine, development and validation of a new, complex, more efficient methods is important, with the purpose of determining them in biological fluids (urine, blood, plasma) and other objects, which is an actual problem in modern toxicology.

Goal of the study

The goal of the study was to improve and develop new the more effective methods , of chemical-toxicological analysis of some second-generation antipsychotic drugs - olanzapine, risperidone, quetiapine and clozapine in objects of biological and non biological origine.

Objectives of the study

The following objectives were set for achievement of the goal:

- Develop optimal conditions for liquid-liquid extraction risperidone, olanzapine, quetiapine and clozapine from the biological material.
- Selection of optimal conditions for solid-phase extraction of target substances from biological objects.
- Development of methods of quantitative analysis of chromat-mass spectrometry in the gaseous and liquid phases (GC-MS, LC-MS/MS)
- Validation of developed methods of analysis.
- Practical testing of validated method in postmortem fluids, in evidence material for forensic expertise and on object-carrier and industrial devices for determination of residual contamination of the target substances.

Scientific novelty of the study

- Were examined the factors, affecting the quality of extraction in simultaneous isolation of olanzapine, risperidone, and quetiapine and clozapine from the study matrix, on the basis of which the optimal conditions for liquid-liquid and solid-phase extraction were suggested, which will ensure the isolation of all the four of target substances from three different complex biological matrix.
- Based on the experiments were suggested the optimal, original, validated conditions for qualitative and quantitative analysis of olanzapine, risperidone, quetiapine and clozapine by the liquid chromatography tandem mass-spectrometry method, which provide simultaneous object-carriers (empty blister, vial, smear).
- Based on experiments were suggested the optimal conditions for qualitative and quantitative analysis of risperidone, olanzapine, quetiapine and clozapine in biological material by chromat-mass spectrometry method in the gaseous and liquid phases for both individual substances and their combinations. The suggested conditions are distinguished from the data, provided in the references, by their higher sensitivity, selectiveness and expressivity.

Practical importance of the study

- Based on experimental studies were suggested the optimal conditions of liquid-liquid extraction for olanzapine, risperidone, quetiapine and clozapine individual and simultaneous isolation in various biological matrix, which will provide the possibility of the target substance isolation by 80-85%.
- Based on the studies were determined the optimal conditions for solid-phase extraction of risperidone, olanzapine, and quetiapine and clozapine optimal conditions, which will provide the possibility of the target substance isolation by 91-94%.
- Was suggested the conditions for scientifically proven, validated express analysis of olanzapine, risperidone, quetiapine and clozapine, which may be used for:
 1. For the forensic examination of postmortem materials.
 2. Chemical-toxicological analysis, diagnosis of acute and chronic toxicity in living persons.
 3. Monitoring of the therapeutic dose in patients.
 4. For the forensic examination of the evidence material.
 5. For testing equipment for pharmaceutical production for determination of residual contamination of the target substances.

The methods, developed as a result of the study, can be used in the chemical-toxicological analysis for comprehensive teaching of modern methods to students.

Conclusions

1. Have been studied Factors affecting isolation quality of Olanzapine, Risperidone, Quetiapine and Clozapine from urine. Optimal conditions (Solvents system: Ethylacetate-heptane-dichloromethane-isopropanol 60:20:15:5, pH-9.00, double extraction, duration 5 minutes) of liquid-liquid extraction (LLE) have been established which provides fast, cost effective and simultaneous extraction (in the range of 80-85%) of the four target substances.
2. Optimal conditions (sorbent conditioning, sample processing, sorbent cleaning, extraction) of solid-phase extraction from biological samples (blood, plasma) for Olanzapine, Risperidone, Quetiapine and Clozapine have been developed which guarantees maximum extraction (91-94%) of the four target substances.
3. GC-MS method has been developed for simultaneous determination of Olanzapine, Risperidone, Quetiapine and Clozapine both in biological samples and evidance materials. Developed method was approved for determination of Clozapine in postmortem urine.
4. LC-MS/MS method has been developed for qualitative and quantitative determination of Olanzapine, Risperidone, Quetiapine and Clozapine in human blood. Method was validate on following parameters: Linearity (Calibration concentration 10-100 ng/ml, Coefficient of correlation – Olanzapine $R^2=0.9991$, Risperidone $R^2=0.9980$, Quetiapine $R^2=0.9989$, Clozapine $R^2=0.9986$), Selectivity, LOQ (6.31 ng/ml - 9.12 ng/ml), LOD (2.12 ng/ml - 3.02 ng/ml), Accuracy and Precision (90%-99), Recovery. Analysis time is short (10 minutes) and no Matrix effect was observed.
5. The developed liquid chromatography tandem mass spectrometry method has been approve to be effective for simultaneous and individual chemical-toxicological analysis of Olanzapine, Risperidone, Quetiapine and Clozapine in biological samples (plasma, urine) and postmortem blood samples.
6. The developed liquid chromatography tandem mass spectrometry method has been approved for qualitative and quantitative analysis of Olanzapine, Risperidone, Quetiapine and Clozapine in different evidance materials (blisper, vial, nonlabeled tablets), as well as for determination of residual contamination on equipment used in manufacturing process of pharmaceutical product.
7. Stability parameters of target substances in samples are theoretically proven, studied and established: at room temperature-48 hours, at 4°C - 196 hours, at 15°C and during cyclic freezing- 90 days.
8. The scheme of chemical-toxicological analysis of Olanzapine, Risperidone, Quetiapine and Clozapine are theoretically proven and provided on the basis of experimental studies.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. ადეიშვილი ლ., ნარკოტიკები, მ&ვ პოლიგრაფიული ცენტრი, თბილისი, 2007.
2. ადეიშვილი ლ., ნარკოტიკული და ფსიქოტროპული საშუალებების ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზი, მ&ვ პოლიგრაფიული ცენტრი, თბილისი, 2007.
3. ზოპინი, გამოყენების ინსტრუქცია, სამედიცინო საქმიანობის სახელმწიფო რეგულირების სააგენტოს უფროსის, №02-408/ო, თბილისი, 09.06.16.
4. კეტიპი, გამოყენების ინსტრუქცია, სამედიცინო საქმიანობის სახელმწიფო რეგულირების სააგენტოს, ბრძანება №02-1422/ო, თბილისი 19.08.2016.
5. კეტილეპტი პროლონგი 50მგ №28 ტაბლეტის გამოყენების ინსტრუქცია, სამედიცინო საქმიანობის სახელმწიფო რეგულირების სააგენტო, ბრძანება №02-690/ო, თბილისი, 26.04.2016.
6. ლეპონექსი 25მგ №50 ტაბლეტის გამოყენების ინსტრუქცია, სამედიცინო საქმიანობის სახელმწიფო რეგულირების სააგენტო, ბრძანება №02-1104/ო, თბილისი, 07.08.2014.
7. მახარაძე რ., მენაბდე ნ., ხოლოდოვი ლ., ფარმაკოკინეტიკის საფუძვლები, სსგ „მეცნიერება“, თბილისი, 2000.
8. ოლზაპის გამოყენების ინსტრუქცია, სამედიცინო საქმიანობის სახელმწიფო რეგულირების სააგენტო, ბრძანება №02-573/ო, თბილისი, 17.04.2015.
9. სედარექსი, გამოყენების ინსტრუქცია, სამედიცინო საქმიანობის სახელმწიფო რეგულირების სააგენტო, ბრძანება №02-557/ო, თბილისი, 31.03.2017.
10. ცნობარი ვიდალი, სამკურნალო პრეპარატები საქართველოში, ფარმინფორმი, თბილისი 2017.
11. ფარმაცევტული პროდუქტის უწყებრივი რეესტრი, საქართველოს შრომის, ჯანმრთელობის და სოციალური დაცვის სამინისტრო, rama.moh.gov.ge თბილისი, 2017.
12. ქვანექსი, გამოყენების ინსტრუქცია, სამედიცინო საქმიანობის სახელმწიფო რეგულირების სააგენტოს, ბრძანება №02-840/ო, თბილისი 20.05.2016.
13. შიზოფრენიის მკურნალობა და მართვა მოზრდილებში - კლინიკური პრაქტიკის ეროვნული რეკომენდაცია, საქართველოს შრომის,

ჯანმრთელობისა და სოციალური დაცვის სამინისტრო, ბრძანება №01-151/თ, 24.07.2013

14. ჭუმბურიძე ბ., ფარმაცევტული ქიმია, გამომცემლობა „განათლება“, თბილისი, 2009.
15. Бертрам Г. Катцунг. Базисная и клиническая фармакология - Практическое руководство, Бином, Москва, 2011.
16. Булатов Р.М, Малкова Т.Л., Химико-Токсикологический Анализ Рисперидона И 9-Гидроксирисперидона В Моче, Научного Вестнике Международного Гуманитарного Университета, 2013, 5 с. 34-37
17. Данилов Д.С., Тюльпин Ю.Г «Лечение шизофрении», ООО «МИА», Москва 2010.
18. Данилов Д.С. «Повторная оценка безопасности применения клозапина при лечении шизофрении. Российский психиатрический журнал». №1., 2010, с. 94-100.
19. Машковский М.Д., Лекарственные Средства, Новая Волна, Москва, 2007.
20. Мингазов А. А., Случай Смерти От Отравления Кветиапином, Проблемы экспертизы в медицине, № 27-3, том 07, 2007, с.62-63
21. П. Джонс Б., Питер Ф.Бакли. Под общей редакцией Мосолова С.Н., Клиническое руководство «Шизофрения», Москва, МЕДпресс-информ, 2008, с. 99-102.
22. Савчук, С.А. Хромато-масс-спектрометрический анализ в наркологической и токсикологической практике/ С.А. Савчук, А.М. Григорьев. - М.: Ленанд, 2013. с 224.
23. Слюндин Д.Г.,Ливанов А.С.,Анучин В.В.,Бобринская И.Г., Гугова Е.В., Криминальные Отравления Клозапином, Анестезиология и Реаниматология, 2007.-N 4, с.61-64.
24. Читая Н.Н. Нейролептический синдром при использовании типичных и атипичных нейролептиков. Диссертация кандидата медицинских наук. Москва, 2009.
25. Чучалина А.Г., Белоусова Ю.Б., Хабриева Р.У., Зиганшина Л.Е., Руководство по рациональному использованию лекарственных средств, 2007, с. 398 - 405.
26. Alicia B. Minns, Richard F. Clark, Toxicology And Overdose Of Atypical Antipsychotics. The Journal of Emergency Medicine, 2012, Vol. 43, No. 5, pp. 906–913.
27. Amirav A., Gordin A., Poliak M., Fialkov A.B., Gas chromatography-mass spectrometry with supersonic molecular beams. J Mass Spectrom 2008, 43, pp. 141-163.
28. Aldini G., Regazzoni L., Orioli., Rimoldi I., Facino R.M., Carini M., A tandem MS precursor-ion scan approach to identify variable covalent modification of albumin Cys34: a new tool for studying vascular carbonylation, J Mass Spectrom, 2008 Volume 43, Issue 11, pp.1470–1481.

29. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics, Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). New Hampshire , July 2015.
30. Aparasu R.R., Jano E, Johnson M.L., Chen H., Hospitalization risk associated with typical and atypical antipsychotic use in community-dwelling elderly patients. *Am J GeriatrPharmacother.* 2008 Oct;6(4), pp.198-204.
31. Aringhieri S., Kolachalam S., Gerace C., Carli M., et al..Clozapine as the most efficacious antipsychotic for activating ERK 1/2 kinases: Role of 5-HT_{2A} receptor agonism.*Eur Neuropsychopharmacol.* 2017 Apr;27(4), pp.383-398
32. Bakken G.V, Rudberg I., Christensen H., Molden E., Refsum H., Hermann M., Metabolism of Quetiapine by CYP3A4 and CYP3A5 in Presence or Absence of Cytochrome B5, *Drug Metabolism and Disposition* February 2009, 37 (2). pp.254-258
33. Bartolomeis A., Iasevoli F., Update on the Mechanism of Action of Aripiprazole: Translational Insights into Antipsychotic Strategies Beyond Dopamine Receptor Antagonism. *CNS Drugs.* 2015; 29, pp.773–799.
34. Bahn M.K., Wolever T.M., Arenovich T., Teo C., Giacca A., Powell V., Clarke L., Fletcher P., Cohn T., McIntyre RS., Gomes S., Chintoh A., Remington G.J., Acute effects of single-dose olanzapine on metabolic, endocrine, and inflammatory markers in healthy controls, *J Clin Psychopharmacol*, 2013 Dec, 33(6), pp.740-746.
35. Bhattacharjee J., El-Sayeh H.G.. Aripiprazole versus typical for schizophrenia. *PMD.* 2008 Jan 23;(1), pp. 31-34.
36. Bhattacharya K., Cognitive Function in Schizophrenia: A Review. *Journal of Psychiatry.* (2015) 18, pp.187
37. Bolu A., Akarsu S., Pan E., Aydemir E., Oznur T.. Low-dose Clozapine-induced Seizure: A Case Report. *lin Psychopharmacol Neurosci.* 2017 May 31;15(2), pp.190-193.
38. British Pharmacopoeia, BP Commission, Medicines & Healthcare products Regulatory Agency (MHRA), The Stationary Office, London, 2007.
39. Brown S.A., The environment and susceptibility to schizophrenia. *ProgNeurobiol.* 2011 Jan; 93(1), pp. 23–58.
40. Bui K., Earley W., Nyberg S., Pharmacokinetic profile of the extended-release formulation of quetiapine fumarate (quetiapine XR): clinical implications. *CMRO.*30 Apr 2013. pp.813-825

41. Bylda C., Thiele R., Kobold U., Dietrich A., Volmer b., Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS Analyst, 2014, 139, pp. 2265-2276.
42. C.Poole F., EXTRACTION | Solid-Phase Extraction. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, 23 January 2016.
43. Capllonch A. de Pablo S., de la Torre A., Morales I., Increase in white cell and neutrophil counts during the first eighteen weeks of treatment with clozapine in patients admitted to a long-term psychiatric care inpatient unit. *Rev Psiquiatr Salud Ment.*, 2016 May (3)., pp.248-256.
44. Carla M. Canuso , Bryan Dirks , Jennifer Carothers, at all. Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Paliperidone Extended-Release and Quetiapine in Inpatients With Recently Exacerbated Schizophrenia. *THE AMERICAN JOURNAL OF PSYCHIATRY*. Volume 166, Issue 6, June, 2009, pp. 691-701
45. Catherine G. Coughlin, Katherine A. Blackwell, Christine Bartley, Madeleine Hay, Kimberly A. Yonkers, and Michael H. Bloch. Obstetric and Neonatal Outcomes After Antipsychotic Medication Exposure in Pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2015 May; 125(5), pp.1224–1235.
46. Chromacademy, e.learning for analytical chemistry community. *Mass Spectrometry, Fundamental LC-MS Introduction*. Crawford Scientific, Duluth, 2017.
47. Chue P., K Lalonde J., Addressing the unmet needs of patients with persistent negative symptoms of schizophrenia: emerging pharmacological treatment options, *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2014; 10: 777–789.
48. Clozapine Safety Data Sheet, Sigma-Aldrich catalogue, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, 2015.
49. Concheiro M., Maria S., Simoes S., Quintela O., Castro A., Rodrigues M.J.D., Cruz A.; Lopez-Rivadulla M., Fast LC–MS/MS method for the determination of amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB and PMA in urine *Forensic Sci.Int.*, 2007, 171, pp. 44-51.
50. D. Law J., A. Todd T. Liquid–Liquid Extraction Equipment, Idaho National Laboratory , (12) December 2015; pp.7-14
51. Daniel C. Javitt, Robert Freedman. Sensory Processing Dysfunction in the Personal Experience and Neuronal Machinery of Schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2015 Jan; 172(1), pp.17–31.
52. Darrin L. Smith. *Mass Spectrometry Applications in Forensic Science*, Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley & Sons Ltd, New York City. 2010.

53. Davies SJ., Mulsant BH., Flint AJ, Meyers BS, Rothschild AJ, Whyte EM, Kirshner MM, Sorisio D, Pollock BG^{1,2,3}, Bies RR. SSRI-antipsychotic combination in psychotic depression: sertraline pharmacokinetics in the presence of olanzapine, a brief report from the STOP-PD study. *um Psychopharmacol.* 2016 May;31(3), pp.252-257
54. Dinis-Oliveira R., Carvalho F. F., Duarte J. A., Remião, F. F., Marques A. A., Santos A. A., Magalhães T. T., "Collection of biological samples in forensic toxicology". *Toxicology Mechanisms & Methods*, 2010, 20 (7): 363–414
55. Dokur M., Gülmez G., Kuzudişli S., Clinical Findings of Emergence After Olanzapine Overdosage: Pediatric Case Report and Review of Literature. *JAEMCR* 2014; 5: 100-106
56. DP-QUETIAPINE Data sheet. Douglas Pharmaceuticals, Auckland, November 2012.
57. Drug Information 2015, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda, 2015.
58. Drummer, O.H.; Gerostamoulos, D.; Chu, M.; Swann, P.; Boorman, M.; Cairns, I., Drugs in oral fluid in randomly selected drivers *Forensic Sci. Int.*, 2007, 170, 105-110.
59. Dudley K., Liu X., Haan S., Chlorpromazine dose for people with schizophrenia . *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 Apr 13;4, pp. 237-240.
60. E. Abel L., Benedict-Augustin Morel, *American Journal of Psychiatry.* January 24, 2015.s 161(12), p. 2185
61. Eli Lilly and company 2015 Integrated Report, Eli Lilly and company, Indianapolis, 2015.
62. European Pharmacopoeia 6th Edition, Council of Europe, European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), Strasbourg, 2008.
63. European Pharmacopoeia 7th Edition, Council of Europe, European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), Strasbourg, 2013.
64. European Pharmacopoeia 8th Edition, Council of Europe, European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), Strasbourg, 2014.
65. Every-Palmer S., Nowitz M., Stanley J., Grant E., Huthwaite M., Dunn H., Pete M., Clozapine-treated Patients Have Marked Gastrointestinal Hypomotility, the Probable Basis of Life-threatening Gastrointestinal Complications: A Cross Sectional Study. *EBioMedicine.* 2016 Mar; 5, pp.125–134.
66. Farinde A., et.al.. Mechanism of Action of Risperidone. *Psychopharmacology Institute Report.* November 2016 (5), pp.12-19.
67. Felicia L. Collins.One Year Post-Exclusivity Adverse Event Review:Risperidone . *Pediatric Advisory Committee Meeting.* November , 2008, pp.8-13.

68. Felmet K., Zisook S., Kasckow J.W., Elderly Patients with Schizophrenia and Depression: Diagnosis and Treatment. *ClinSchizophrRelat Psychoses*. 2011 Jan; 4(4), pp. 239–250.
69. Fisher M., Reilly K., Isenberg K., Kathleen F., Antipsychotic patterns of use in patients with schizophrenia: polypharmacy versus monotherapy. *BMC Psychiatry*. 2014; 14, pp.341.
70. Foroutan S.M., Zarghi A., Shafaati A., Khoddam A., Rapid High Performance Liquid Chromatographic Determination of Risperidone in Human Plasma, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* (2006) 1, pp.37-40
71. Franke B., L Stein J., Stephan et al. Genetic influences on schizophrenia and subcortical brain volumes: large-scale proof-of-concept and roadmap for future studies. *Nat Neurosci*. 2016 Mar; 19(3), pp. 420–431.
72. Fujimaki K., Takahashi T., Morinobu S., Association of Typical versus Atypical Antipsychotics with Symptoms and Quality of Life in Schizophrenia. *PLoS One*. 2012; 7(5), pp.122-138
73. Fusar-Poli P., Politis P., Paul Eugen Bleuler and the Birth of Schizophrenia (1908). *The American Journal of Psychiatry*. Volume 165, Issue 11, November, 2008, pp. 1407-1407
74. Gabriella L. Landy, Mukesh Kripalani. False positive phencyclidine result on urine drug testing: a little known cause. *BJPsych Bull*. 2015 Feb; 39(1), pp. 50.
75. Gaebel W, Riesbeck M, Wölwer W, Klimke A, Eickhoff M, von Wilmsdorff M, Jockers-Scherübl MC, Kühn KU, Lemke M, Bechdorf A, Bender S, Degner D, Schlösser R, Schmidt LG, Schmitt A, Jäger M, Buchkremer G, Falkai P, Klingberg S, Köpcke W, Maier W, Häfner H, Ohmann C, Salize HJ, Schneider F, Möller HJ; Maintenance treatment with risperidone or low-dose haloperidol in first-episode schizophrenia: 1-year results of a randomized controlled trial within the German Research Network on Schizophrenia. *J Clin Psychiatry*. 2007 Nov; 68(11), pp.1763-74.
76. Gardner D., Murphy A., O'Donnell H., Centorrino F., Baldessarini R., International Consensus Study of Antipsychotic Dosing. *American Journal of Psychiatry* 2010; 167(6), pp. 686–693
77. Gareri P., Segura-García C., Manfredi L., Bruni A., Ciambrone P., Cerminara G., Sarro G., Fazio P., Use of atypical antipsychotics in the elderly: a clinical review. *ClinInterv Aging*. 2014; 9, pp.1363–1373.
78. Goff D., Freudenreich O., C. Henderson D., Antipsychotic Drugs, *Massachusetts General Hospital Comprehensive Clinical Psychiatry*, 2nd Edition, Chapter 42, 2016, pp. 577-593

79. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens. A commitment to quality and continuous improvement, United Nations Office on Drugs and Crime, Laboratory and Scientific Section, Vienna 2009.
80. Ghulam - Shabir A., Step-by-Step Analytical Methods Validation and Protocol in the Quality System Compliance Industry , Analytical Methods Validation, Institute of Validation Technology, Burlington, 2008.
81. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). 2009, pp.1-23.
82. Guzman F., Pharmacokinetics of Risperidone: Clinical Summary. Psychopharmacology Institute Report. 2016 (1), pp.5-10.
83. Guzman F. Mechanism of Action of Risperidone. Psychopharmacology Institute Report. November 2016 (4). pp. 4-35.
84. Heffner C.L., Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM IV), fourth edition, American Psychiatric Association, 2013.
85. Heres S, Kraemer S, Bergstrom RF, Detke HC. Pharmacokinetics of olanzapine long-acting injection: the clinical perspective. *Int Clin Psychopharmacol.* 2014 Nov;29(6), pp.299-312
86. Hermes E., Sernyak M., Rosenheck R., Use of Second-Generation Antipsychotic Agents for Sleep and Sedation: A Provider Survey. *Sleep.* 2013 Apr 1; 36(4), pp. 597–600.
87. Hima-Bindu L., Parameswari S. A., Gopinath C., A Review on GC-MS and Method Development and Validation. *International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance*, 2013, 4, pp. 42-51.
88. Hima Bindu V., Batta N., Nageswara Rao Pilli R.N., Rajendra Prasad Yejella R., A novel LC-ESI-MS/MS assay method for the determination of anagrelide in human plasma by using a solid phase extraction technique and its application to a pharmacokinetic study, *Analytical Methods*, Issue 12, 2014, pp. 42-51.
89. Holm T., Pillemer D.B., Bliksted V., Thomsen DK..A decline in self-defining memories following a diagnosis of schizophrenia. *Comprehensive Psychiatry.* 017 Apr 3;76, pp.18-25.
90. Huang M., Shentu J, Chen J., Liu J., Zhou H., Determination of risperidone in human plasma by HPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study in Chinese volunteers, *J Zhejiang Univ Sci B.* 2008 February; 9(2),pp. 114–120.

91. Irina Vasilyeva, Robert G. Biscontri, Murray W. Enns, Colleen J. Metge, Silvia Alessi-Severini. Movement Disorders in Elderly Users of Risperidone and First Generation Antipsychotic Agents: A Canadian Population-Based Study. *PLoS One*. 2013; 8(5), pp.137-144.
92. Isbister G.K., Friberg L. E., Hackett L.P., Duffull S.B., Pharmacokinetics of Quetiapine in Overdose and the Effect of Activated Charcoal. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* (2007) 81, pp.821–827.
93. Ivaturi V., Gopalakrishnan M, Gobburu JV, Zhang W, Liu Y, Heidbreder C, Laffont CM. Exposure-response analysis after subcutaneous administration of RBP-7000, a once-a-month long-acting Atrigel formulation of risperidone. *Br J Clin Pharmacol*. 2017 Jan (30), pp. 206-213.
94. J. Pitt J., Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin Biochem Rev*. 2009 Feb; 30(1), pp. 19–34.
95. J. Rasimas J., Erica L. Liebelt, Adverse Effects and Toxicity of the Atypical Antipsychotics: What is Important for the Pediatric Emergency Medicine Practitioner. *Clin Pediatr Emerg Med*. 2012 Dec 1; 13(4), pp. 300–310.
96. Jakovljević M., New Generation Vs. First Generation, Antipsychotics Debate: Pragmatic Clinical Trials And Practice-Based Evidence, *Psychiatria Danubina*, 2009; Vol. 21, No. 4, pg. 446–452
97. Janicak, P G., Marder S R., and Pavuluri M N. Principles and Practice of Psychopharmacotherapy. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010.
98. Jašović-Gašić M., Vuković M., Pantović M., Cvetić T., Marić-Bojović N., Antipsychotics - History Of Development And Field Of Indication, *New Wine - Old Glasses*, *Psychiatria Danubina*, 2012; Vol. 24, Suppl. 3, pg.342–344
99. Javit D.C., Sweet A.R. Auditory dysfunction in schizophrenia: integrating clinical and basic features. *Nature Reviews Neuroscience* 16 (2015), pp. 535–550.
100. J. Kuperberg R., Language in schizophrenia Part 1: an Introduction. *Language and Linguistics Compass*. 2010 Aug; 4(8), pp. 576–589.
101. Jones C., Hacker D., Cormac I., Meaden A., Claire B Irving C., Cognitive behavioural therapy versus other psychosocial treatments for schizophrenia, *Cochrane Library*, Cochrane, London, 2012.
102. Josefsson M., Roman M., Skogh E., Dahl M; Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of olanzapine and N-desmethyloanzapine in human serum and cerebrospinal fluid; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53, 2010; pp.576–582

103. Joseph E, Reddi S, Rinwa V, Balwani G, Saha R.. Design and in vivo evaluation of solid lipid nanoparticulate systems of Olanzapine for acute phase schizophrenia treatment: Investigations on antipsychotic potential and adverse effects. *Eur J Pharm Sci.* 2017 Apr 11;104, pp.315-325
104. K.Naresh, N. Narender Kumar and G. Jeyabalan, Simultaneous estimation of risperidone, olanzapine and quetiapine and its degradation products by HPLC, *J. International Journal of Pharmacy & Life Sciences – 2010:1*, pp.23-25
105. Kahn R.S., Fleischhacker W.W., Boter H., Davidson M., Vergouwe Y., Keet I.P., Rybakowski J.K., Galderisi S., Libiger J., Hummer M., Dollfus S., López-Ibor J.J., Hranov L.G., Gaebel W., Peuskens J., Lindefors N., Riecher-Rössler A., Grobbee DE. Effectiveness of antipsychotic drugs in first-episode schizophrenia and schizophreniform disorder: an open randomised clinical trial.*Lancet.* 2008 Mar 29;371(9618), pp.1085-1097.
106. Kalakuntla R.R et al. Bioanalytical Method Validation: A Quality Assurance Auditor View Point. *J. Pharm. Sci. & Res.* Vol.1(3), 2009, 1-10.
107. Kang J., Principles and Applications of LC-MS/MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples, *Tandem Mass Spectrometry Applications and Principles*, InTech, 2012, pp.442-478
108. Katta N., Balla S., Aggarwal K., Clozapine-induced hypersensitivity myocarditis presenting as sudden cardiac death.*Autops Case Rep.* 2016 Dec 30;6(4), pp.9-13.
109. Karthik M. S., Warikoo N., Chakrabarti S., Grover S., Kulhara P., Attitudes Towards Antipsychotics Among Patients with Schizophrenia on First- or Second-Generation Medications, *Indian J Psychol Med.* 2014 Jul-Sep; 36(3), pp.288–293.
110. Kendler S.K., Engstrom J.E., Kahlbaum, Hecker, and Kraepelin and the Transition From Psychiatric Symptom Complexes to Empirical Disease Forms. *The American Journal of Psychiatry.* Volume 174, Issue 2, February 01, 2017, pp. 102-109
111. Kendler S.K., Engstrom J.E. Emil Kraepelin: Icon and Reality *Journal of Psychiatry.* he American Journal of Psychiatry. Volume 172, Issue 12, December 01, 2015, pp. 1190-1196
112. Khan A.A., Ashraf A, Baker D, Al-Omary MS, Savage L, Ekmejian A, Singh RS, Briennes S, Majeed T, Gordon T, Drinkwater V, Collins NJ. Clozapine and incidence of myocarditis and sudden death - Long term Australian experience.*Int J Cardiol.* 2017 Mar (6), pp.607-610.
113. Kirkpatrick B., Galderisi S.. Deficit schizophrenia: an update. *World Psychiatry.* 2008 Oct; 7(3): 143–147.

114. Koch J., Glenn Shiveler G., Design Principles for Liquid-Liquid Extraction, CEP Magazine, (11) November 2015, pp.3-8
115. Kristen M. Mackowick, Mera S. Barr, Victoria C. Wing, Rachel A. Rabin, Clairelaine Ouellet-Plamondon, Tony P. George. Neurocognitive Endophenotypes in Schizophrenia: Modulation by Nicotinic Receptor Systems. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2014 Jul 3;1, pp.79–85.
116. Kuwayama, K.; Inoue, H.; Kanamori, T.; Tsujikawa, K.; Miyaguchi, H.; Iwata, Y.; Kamo, N.; Kishi, T., Contribution of thermal desorption and liquid–liquid extraction for identification and profiling of impurities in methamphetamine by gas chromatography–mass spectrometry Forensic Sci. Int., 2007,171, pp. 9-15.
117. Latimer E., Naidu A., Moodie E, Clark E, Malla A., Tamblyn R., Willy Wynant. Variation in Long-Term Antipsychotic Polypharmacy and High-Dose Prescribing Across Physicians and Hospitals. Psychiatric Services. Volume 65, Issue 10, October 2014, pp. 1210-1217.
118. Leckman-Westin E., Kealey E., Gupta N., Chen Q., Gerhard T., Crystal S., Olfson M., Finnerty M., Validation of a claims-based antipsychotic polypharmacy measure. Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2014 Jun; 23(6), pp. 628–635.
119. Lee J., Park Y., Yang W., Chung H., Choi W., Inoue H., Kuwayama K., Park J. Cross-examination of liquid–liquid extraction (LLE) and solid-phase microextraction (SPME) methods for impurity profiling of methamphetamine. Forensic Science International, February 10, 2012 Volume 215, Issues 1-3, pp. 175–178.
120. Lee S. Cohen, Adele C. Viguera, Kathryn A. McInerney, et al. Reproductive Safety of Second-Generation Antipsychotics: Current Data From the Massachusetts General Hospital National Pregnancy Registry for Atypical Antipsychotics. American Journal of Psychiatry. Volume 173, Issue 3, March 01, 2016, pp. 263-270
121. Lee Y.F., Mao W.C., Tai Y.M., Chang H.A., Kao Y.C., Huang S.Y., Tzeng N.S., Delayed-onset rhabdomyolysis related to olanzapine: a case report. Singapore Med J. 2016 May; 57(5), pg.279
122. Leito I. Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) - the primary tool for trace contaminant analysis. University of Tartu, Tartu, 2013.
123. Li P., Snyder G., Vanover K., Dopamine Targeting Drugs for the Treatment of Schizophrenia: Past, Present and Future. Curr Top Med Chem. 2016 Dec; 16(29), pp. 3385–3403.
124. Liquid-liquid extraction (LLE), introduction to this sample preparation technique. Interchim news, (04) April 2016, pp.11-12

125. Lladó-Pelfort L., Troyano-Rodriguez E., van den Munkhof H.E., Cervera-Ferri A., Jurado N., Núñez-Calvet M., Artigas F., Celada P., Phencyclidine-induced disruption of oscillatory activity in prefrontal cortex: Effects of antipsychotic drugs and receptor ligands. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2016 Mar;26(3), pp.614-25.
126. Lobos C., Komossa K., Rummel-Kluge C., Hunger H., Schmid F., Schwarz S., Leucht S., Clozapine versus other atypical antipsychotics for schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010; (11), pp.223-237.
127. M.Kondo A., Tajinda K., Colantuoni C., Hiyama H., Seshadri S., Huang B., Pou ., Furukori K., Hookway C., Jaaro-Peled H., Kano S., Matsuoka N., Harada K., Ni K., Pevsner J., Sawa A, Unique pharmacological actions of atypical neuroleptic quetiapine: possible role in cell cycle/fate control. *Translational Psychiatry* (2013) 3. pp.55-61.
128. Mackin P., Simon Thomas S.H.L., *The BMJ*, Atypical antipsychotic drugs, 19 March 2011, Volume 342, pp. 650-671
129. Maglione M, Ruelaz Maher A, Hu J, Wang Z, Shanman R, Shekelle PG, Roth B, Hilton L, Suttorp MJ, Ewing BA, Motala A, Perry T. Off-Label Use of Atypical Antipsychotics: An Update. *Comparative Effectiveness Review* November 2016. No. 43, pp.111-114.
130. Mailman R., Murthy V., Third generation antipsychotic drugs: partial agonism or receptor functional selectivity. *Curr Pharm Des.* 2010; 16(5), pp. 488–501.
131. Martin S., Constantine G. Lyketsos. A Typical Antipsychotic Use In Patients With Dementia: Managing Safety Concerns. *Am J Psychiatry.* 2012 Sep; 169(9), pp.900–906.
132. Mathews M., Muzina DJ. Atypical antipsychotics: new drugs, new challenges. *Cleve Clin J Med.* 2007 Aug;74(8), pp. 597-606.
133. Matthew A. Gannon, Clifford J. Brown, Rachel M. Stevens, Molly S. Griffith, Cecile A. Marczinski, and Mark E. Bardgett. Early-Life Risperidone Administration Alters Maternal-Offspring Interactions and Juvenile Play Fighting. *Pharmacol Biochem Behav.* 2015 Mar; 130, pp. 90–96.
134. Mcpolin O., *Validation of Analytical Methods for Pharmaceutical Analysis*, Mourn Training Services, Warrenpoint, 2009.
135. Meeks TW, Jeste DV. Beyond the Black Box: What is The Role for Antipsychotics in Dementia? *Current psychiatry.* 2008;7(6), pp.50-65.
136. Meulder M., Bart M.M. Remmerie B.M.M, Vries R., Sips L.L.A, Boom S., Hooijschuur E., Van de Merbe N., Timmerman P.; Validated LC–MS/MS methods for the determination of risperidone and the enantiomers of 9-hydroxyrisperidone in human plasma and urine; *Journal of Chromatography B*, 870, 2008, pg. 8–16

137. Michael J., Gandal J., Edgar C., Klook K., Steven J., Siegela S.J., Gamma synchrony: towards a translational biomarker for the treatment resistant symptoms of schizophrenia. *Neuropharmacology*. 2012 Mar; 62(3): 1504–1518.
138. Miereles A., Angela A. *Extracting Bioactive Compounds for Food Products*. CRC Press. 2009. pp.219-269
139. Montgomery W., Treuer T., Karagianis J., Ascher-Svanum A., Harrison G., Orally disintegrating olanzapine review: effectiveness, patient preference, adherence, and other properties. *Patient Prefer Adherence*. 2012; 6, pp.109–125.
140. Morrens M., Hulstijn W., Sabbe B., Psychomotor slowing in schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2007 Jul;33(4), pp. 1038-1053.
141. Mousavi S.Y., Khezri R, Karkhaneh-Yousefi MA, et al. A Randomized, Double-Blind Placebo-Controlled Trial on Effectiveness and Safety of Celecoxib Adjunctive Therapy in Adolescents with Acute Bipolar Mania. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2017 Apr, 14, pp.193-198.
142. Muench J., M. Hamer A., Adverse Effects of Antipsychotic Medications *Am Fam Physician*. 2010 Mar 1;81(5), pp.617-622.
143. Muller E., Rosemarie Berger R., Sluyts D., Bayer Ag, Andreas Pfennig A. Liquid–Liquid Extraction, *Ullmann's Encyclopedia Of Industrial Chemistry*, Jan 2008, pp.29-32
144. Munoz L., Francisco; Alamo, Cecilio (2009). "The Consolidation of Neuroleptic Therapy: Janssen, the Discovery of Haloperidol and Its Introduction into Clinical Practice". *Brain Research Bulletin*. 79, pp.130 - 141.
145. Narasimhan M., Bruce T., Masand P., Review of olanzapine in the management of bipolar disorders. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2007 Oct; 3(5), pp. 579–587.
146. Newcomer JW. Metabolic considerations in the use of antipsychotic medications: a review of recent evidence. *J Clin Psychiatry*. 2007;68 Suppl 1, pp.20-27.
147. Nielsen M.K.K, Sys Stybe Johansen S.S., Determination of Olanzapine in Whole Blood Using Simple Protein Precipitation and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry; *Journal of Analytical Toxicology*, Vol. 33, May 2009, pg. 212-217
148. Niznikiewicz M.A., Kubicki M., Mulert C., Condray R., Schizophrenia as a Disorder of Communication. *Schizophrenia Research and Treatment*. Volume 2013 (2013), pp.16-17.
149. Ovais M., Lian L., Setting Cleaning Validation Acceptance Limits for Topical Formulations. *Pharmaceutical Technology*, Jan. 2 2008, Volume 32, Issue 1, pp.19-26
150. Ozbek N., Baysal A., Akman S., Dogan M. Chapter 7 Solid-Phase Extraction. *Analytical Separation Science*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., Weinheim 2015.

151. Papazisis G., Mastrogianni O., Chatzinikolaou F., MD, Vasiliadis N., Nikolaos Raikos N., Sudden cardiac death due to quetiapine overdose. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 2012; 66, pp. 533–539
152. Parnell K., A Gold Standard in Forensics: A GC/MS Case Study, *ForensicMag.* 04.2015, pp.18-19
153. Paulzen M, Haen E, Hiemke C, Stegmann B, Lammertz SE, Gründer G, Schoretsanitis G. Cytochrome P450-mediated interaction between perazine and risperidone: implications for antipsychotic polypharmacy. *Br J Clin Pharmacol.* 2017;2), pp.82-93.
154. Peralta V., Cuesta M. J., De Leon D., Positive and negative symptoms/syndromes in schizophrenia: reliability and validity of different diagnostic systems, *Psychological Medicine.* Volume 25, Issue 1 January 1995, pp. 43-50
155. Pharoah F., Mari J., Rathbone J., Wong W.. Family intervention for schizophrenia, *Cochrane Database Syst Rev.* 2010; (12),. pp. 45-49
156. Pilla N., Sreedhar C., T Rao S., Reddy S.; Original Article Development and validation of liquid chromatography - tandem mass spectrometry for determination of olanzapine in rabbit plasma; *International Journal Of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 5(1), 2014; pp. 91-92
157. Pons A., Undurraga J., Batalla A., Bernardo M., Clozapine and agranulocytosis in Spain: do we have a safer population? A 5-year hematologic follow-up. *Rev Psiquiatr Salud Ment.* 2012 Jan-Mar;5(1), pp.37-42.
158. Potkin S.G., Cohen M, Panagides J. Efficacy and tolerability of asenapine in acute schizophrenia: a placebo and risperidone-controlled trial. *Clin Psychiatry.* 2007;68(10), pp.1492
159. Pozzi M., Cattaneo D., Baldelli S., Fucile S., Capuano A., Bravaccio C., Sportiello L., Bertella S., Auricchio F., Bernardini R., Ferrajolo C., Guastella G., Mani E., Carnovale C., Pisano S., Rafaniello C., Riccio M.P., Rizzo R., Scuderi M.G., Sperandeo S., Villa L., Pascotto A, Molteni M, Rossi F, Radice S, Clementi E. Therapeutic drug monitoring of second-generation antipsychotics in pediatric patients: an observational study in real-life settings. *Eur J Clin Pharmacol.* 2016 Mar;72(3), pp.285-93.
160. Prescribing Information of Quetiapine Fumarate Tablets, Apotex Inc., Toronto, 12.2011
161. Prescribing Information of Risperidon Tablets USP, Torrent Pharmaceuticals Ltd, Ahmedabad, 06.2014.
162. Prescribing Information of Zyprexa, Eli Lilly and Company, Indianapolis 26.10.2016.
163. Quetiapine Tablets. Material Safety Data Sheet. Pfizer Pharmaceuticals Group, New York., 2012.

164. Raikos N., Spagou K., Vlachou M., Pouliopoulos A., Thessalonikeos E., Tsoukali H., Development of a Liquid-Liquid Extraction Procedure for the Analysis of Amphetamine in Biological Specimens by GC-FID. *The Open Forensic Science Journal*, 2009, 2, pp. 12-15.
165. Randall C. Baselt, *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*, 9th Edition, Chemical Toxicology Institute Foster City, Foster City, 2011.
166. Raper J, Morrison RD, Daniels JS, Howell L, Bachevalier J, Wichmann T, Galvan A. Metabolism and Distribution of Clozapine-N-oxide: Implications for Nonhuman Primate Chemogenetics. *ACS Chem Neurosci*, Mar 2017 (03), pp.25-34.
167. Rasimas J., Liebelt E., Adverse Effects and Toxicity of the Atypical Antipsychotics: What is Important for the Pediatric Emergency Medicine Practitioner, *Clin Pediatr Emerg Med.* 2012 Dec 1; 13(4), pp. 300–310.
168. Ravinder S., T.Bapuji A., Mukkanti K., Nagesh M., V.Ravikiran H.L.; A Rapid and Selective LC-MS/MS Method for Quantification of Quetiapine in Human Plasma and its Application to Pharmacokinetic Study on Indian Schizophrenia Patients. *E-Journal of Chemistry*, 2011, 8(4); pp. 1802-1814
169. Remington G., Antipsychotic Dosing: Still a Work in Progress. *American Journal of Psychiatry*. Volume 167, Issue 6, June 2010, pp. 622-624.
170. Risperdal, Janssen Data Sheet, Janssen-Cilag Ltd, Auckland, 11 July 2014.
171. Risperidone 0.5mg Film-coated Tablets. PIL. Actavis, Libertyville, 2015.
172. Risperidone, Annotation of U.S. Food and Drug Administration (FDA) label information for risperidone 2013.
173. Spina E., D'Arrigo C., Migliardi G., Santoro V., Determination of olanzapine in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Ther Drug Monit.* 2006 Jun;28(3), pp.388-393.
174. Safety Data Sheet Of Risperidone. Cayman Chemicals. Ann Arbor, 2013.
175. Sahil K., Prashant B., Akanksha M., Premjeet S., Devashish R., GC-MS: Applications. *International Journal Pharma & Biological Archives* 2011, 2, pp. 1544-1560.
176. Sahlberg M., Holm E., H Gislason G., Køber L., Torp-Pedersen C., Andersson C., Association of Selected Antipsychotic Agents With Major Adverse Cardiovascular Events and Noncardiovascular Mortality in Elderly Persons. *J Am Heart Assoc.* 2015 Sep; 4(9), pp.106-123.
177. Santos-Neto A., Bergquist J., Lanças F., Sjöberg P. (2008). Simultaneous analysis of five antidepressant drugs using direct injection of biofluids in a capillary restricted access

- media-liquid chromatography-tandem mass spectrometry system. *Journal of Chromatography A*, Vol.1189, No.1-2, (May 2008), pp. 514-522.
178. Schizophrenia-Fact sheet Review, World Health Organization, Geneva, April 2016.
 179. Schwebach A., Ball J, Fine Drug Screening: Minimizing False-Positives and False-Negatives to Optimize Patient Care. *US Pharm.* 2016;41(8), pp.26-30.
 180. Seo N., Song I., Park H., Ha D., Shin JY., Trends in the prescribing of atypical antipsychotics in elderly patients with dementia in Korea. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2017 Apr 4.(2), pp.88-92.
 181. Seroquel Tablets Prescribing Information, AstraZeneca, Cambridge, 06.2016, pg.1-19
 182. Sharma P., Schmucker K., Parmar A., Vats D., Aligeti M., Role of Orally Disintegrating Olanzapine in Case of Bipolar Disorder with Comorbid Intestinal Inflammation and Status Post Colectomy. *Primary Psychiatry.* August 2015. pp. 73-77.
 183. Shirzadi A., Ghaemi SN.Side effects of atypical antipsychotics: extrapyramidal symptoms and the metabolic syndrome.*Harv Rev Psychiatry.* 2006 May-Jun;14(3), pp.152-64.
 184. Sikich L, Frazier JA, McClellan J, Findling RL, Vitiello B, Ritz L, et al. Double-blind comparison of first- and second-generation antipsychotics in early-onset schizophrenia and schizo-affective disorder: findings from the treatment of early-onset schizophrenia spectrum disorders (TEOSS) study. *Am J Psychiatry.* 2008 Nov;165(11), pp. 1420-1431.
 185. Siris S.G., Treating 'depression' in patients with schizophrenia. *Current Psychiatry.* 2012 August;11(8):35-39.
 186. Smolders DM, Smolders WA. Case Report and Review of the Literature: Cardiomyopathy in a Young Woman on High-Dose Quetiapine. *Cardiovasc Toxicol.* 2016 Nov (11), pp.103-113.
 187. SOFT / AAFS Forensic Laboratory Guidelines – 2006, pp.1-24.
 188. Soldin S.J., Soldin O.P., Steroid hormone analysis by tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, Vol.55, No.6, (July 2009), pp. 1061-1066.
 189. Sonawane et al. Bioanalytical Method Validation and Its Pharmaceutical Application- A Review. *Pharm Anal Acta* 2014, 5, pp.3
 190. SPE Cartridges (Tubes) - Phase Selection Guide, Sigma Aldrich Catalogue, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, 2017.
 191. Stahl S M. *The Prescriber's Guide.* 4th ed. New York: Cambridge University Press; 2011.

192. Sushil T.A., Dheeraj K., Pavithra Mannam P., and Ramya Iyyadurai R., Risperidone Induced Benign Intracranial Hypertension Leading to Visual Loss Indian J Psychol Med. 2016 May-Jun; 38(3), pp. 249–251.
193. Stefanidis A, Watt MJ, Cowley MA, Oldfield BJ. Prevention of the adverse effects of olanzapine on lipid metabolism with the antiepileptic zonisamide. Neuropharmacology. 2017 Apr (8), pp.163-171.
194. Sweileh W, Odeh J., Zyoud S., Sawalha A., Ihbeasheh M., Conformance to schizophrenia treatment guidelines in North West-Bank, Palestine: focus on antipsychotic dosing and polytherapy. BMC Psychiatry. 2013; 13, pp.179.
195. Taylor T., Optimizing LC–MS and LC–MS-MS Methods. LCGC North America. Jan 14, 2014, Volume 32, Issue 1, pp. 74.
196. Taylor T., The Most Common Mistakes in Solid-Phase Extraction. LCGC North America, Oct 01 2015, Volume 33, Issue 10, pp. 802.
197. Thentu JB., Nirogi R., Bhyrapuneni G, Ajjala DR., Aleti RR., Palacharla RC. Simultaneous in-vivo receptor occupancy assays for serotonin 1A, 2A, and dopamine 2 receptors with the use of non-radiolabelled tracers: Proposed method in screening antipsychotics. J Pharmacol Toxicol Methods. 2017 Jan 4; 85, pp.22-28.
198. Thevis M., Schänzer W., Current role of LC-MS (/MS) in doping control. Analytical Bioanalytical Chemistry, Vol.388, No.7. (August 2007), pp. 1351–1358.
199. Thornton, J.D., Extraction, Liquid-Liquid. Thermopedia. Begell House, Danbury February 2011.
200. Tiwari G., Tiwari R. Bioanalytical method validation: An updated review. Pharm Methods. 2010 Oct-Dec; 1(1): 25–38.
201. Trifirò G, Verhamme KM, Ziere G, Caputi AP, ChStricker BH, Sturkenboom MC. All-cause mortality associated with atypical and typical antipsychotics in demented outpatients. Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2007 May;16(5), pp. 538-544.
202. Üçok A., Gaebel W., Side effects of atypical antipsychotics: a brief overview. World Psychiatry. 2008 Feb; 7(1), pp. 58–62.
203. Uřinová R., Brozmanová H, Šiřtík P, Silhán P, Kacířová I, Lemr K, Grundmann M., Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2012 Oct 15;907, pp.101-8.
204. USP 32–NF 27, The United States Pharmacopea Convention Inc., Rockville, 2009.
205. Validation Of Compendial Procedures, USP34–NF29, The United States Pharmacopea Convention Inc., Rockville, 2011.

206. Vardakou I., Dona A., Pistos C., Alevisopoulos G., Athanaselis S., Maravelias C., Spiliopoulou C.; Validated GC/MS method for the simultaneous determination of clozapine and norclozapine in human plasma. Application in psychiatric patients under clozapine treatment; *Journal of Chromatography B*, 878; 2010; pg.2327–2332
207. Velligan I., Alpha L.. Negative Symptoms in Schizophrenia: The Importance of Identification and Treatment. *Psychiatric Time*, March 01, 2008. pp. 1-5
208. Ventura R., Roig M., Montfort N., Saez P., Berges R., Segura J., High-throughput and sensitive screening by ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry of diuretics and other doping agents. *European Journal of Mass Spectrometry*, 2008, Vol.14, No.3, pp.191–200.
209. Vogeser M., Seger C., A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory: goals for further developments. *Clinical Biochemistry*, Vol.41, No.9, June 2008, pp. 649-662.
210. Vuckovic, D., Zhang, X., Cudjoe, E., Pawliszyn J. (2010). Solid-phase microextraction in bioanalysis: New devices and directions. *Journal of Chromatography A*. Vol.1217, No.25, June 2010, pp. 4041–4060.
211. Wahidi N., Johnson K., Brenzel A., Jose de Leon. Two Sudden and Unexpected Deaths of Patients with Schizophrenia Associated with Intramuscular Injections of Antipsychotics and Practice Guidelines to Limit the Use of High Doses of Intramuscular Antipsychotics. *Case Reports in Psychiatry*. Volume 2016. pp.1-14.
212. Walther S., Strik W., Motor Symptoms and Schizophrenia. *Neuropsychobiology* 2012;66, pp.77–92
213. Wang S., Cyronak M., Yang E., Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response? A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol.43, No.2, January 2007, pp. 701-707.
214. Wang R., Zhanga L., Zhanga Z., Tiana Y., Comparison of ESI– and APCI–LC–MS/MS methods: A case study of levonorgestrel in human plasma. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Volume 6, Issue 6, December 2016, pp. 356–362
215. Watson D., E. Raynie D., Understanding and Improving Solid-Phase Extraction. *LCGC North America*, Dec 01, 2014, Volume 32, Issue 12, pp. 908–915
216. W.Jinya D., Iwamura T., Kadokami K., Kusuda T., Development of Comprehensive Analytical Method for Semi-volatile Organic Compounds in water samples by a combination of solid-phase extraction and GC-MS Database System, *Journal of Environmental Chemistry*, 2011, 1, pp.35–48.

217. Whitworth R., LC-MS Versus GC-MS. *Analytical scientist*, November 2015, #34, pp.10-11
218. William E. Hall, "Validation and Verification of Cleaning Processes" Hall & Pharmaceutical Associates, Inc., Kure Beach, 2003.
219. Wohlfarth A., Toepfner N., Hermanns-Clausen M., Auwärter V.; Sensitive quantification of clozapine and its main metabolites norclozapine and clozapine-N-oxide in serum and urine using LC-MS/MS after simple liquid-liquid extraction work-up, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, pg.737-746
220. Xia J., Merinder L.B, Belgamwar M.R.. Psychoeducation for schizophrenia. *PMC*. 2011 Jun 15 (10),pp.31-34.
221. Xu R.N., Fan L., Rieser M.J., El-Shourbagy T.A., Recent advances in high throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol.44, No.2, June 2007, pp. 342-355.
222. Yang, Z., Wang S., Recent development in application of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in therapeutic drug monitoring of immunosuppressants, *Journal of Immunological Methods*, Vol.331, No.2, July 2008, pp. 98-100.
223. Zhang J.P., Malhotra A., Pharmacogenetics and Antipsychotics: Therapeutic Efficacy and Side Effects Prediction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2011 Jan; 7(1), pp. 9-37.
224. Zhang M., Jia J., Lu C., Liu G., Yu C., Gui Y., Liu Y, Wang W., Li S., Yu C.; Development and validation of a liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry for determination of olanzapine in human plasma and its application to bioavailability study; *Acta Pharmaceutica Sinica* 2010, 45 (6): 767-777

დანართი №1
ტერმინთა განმარტებები

კვ – კილოვოლტი

მაო – მონოამინოქსიდაზა

მკლ – მიკროლიტრი

მმ. ვწყ. სგ. – მილიმეტრი ვერცხლისწყლის სვეტი

ნგ – ნანოგრამი

სე – საერთაშორისო ერთეული

ვ – ვოლტი

CV – ვარიაციის კოეფიციენტი

Da - დალტონი

m/z – მასა/მუხტის თანაფარდობა

MRM - მრავალჯერადი რეაქციის მონიტორინგი

s/n – სიგნალი/ხმაურის თანაფარდობა

SD – სტანდარტული გადახრა

TIC - ჯამური იონური ნაკადი

დანართი №2
გამოქვეყნებული შრომები

GEORGIAN MEDICAL NEWS

ISSN 1512-0112

№ 2 (263) Февраль 2017

ТБИЛИСИ - NEW YORK



ЕЖЕМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Медицинские новости Грузии
საქართველოს სამედიცინო სახელეწიფო

РЕЗЮМЕ

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ ДИСТРЕСС ПРИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЕ В СОЧЕТАНИИ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Корла М.М., Мерещкий В.Н., Мерещкая И.В.

Тернопольский государственный медицинский университет им. И.Я. Горбачевского, Украина

Исследован иммунный статус крыс после экспериментальной черепно-мозговой травмы в сочетании со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом. Показано, что у крыс с индуцированным диабетом и моделированной черепно-мозговой травмой отмечается более глубокое повреждение иммунной системы, состояние которой до исходного уровня не восстановилось даже спустя 14 дней после травмы. Концентрация провоспалительных цитокинов увеличилась, в то время как в течение исследуемого периода количество противовоспалительных цитокинов снижалось, увеличивая риск развития синдрома системного воспалительного ответа и полиорганной недостаточности. Показатели факторов, ответственных за гуморальный и клеточно-опосредованный иммунитет были существенно ниже на протяжении всего исследования, что предрасполагало лабораторных животных с черепно-мозговой травмой на фоне сахарного диабета к инфекции в сравнении с травмированными нормогликемическими крысами.

რეზიუმე

იმუნოლოგიური დისტრესი ქალა-ტვინის ტრავმის და თანხვედრილი შაქრის დიაბეტის დროს (ექსპერიმენტული გამოკვლევა)

მ. კორლა, ვ. მერეცკი, ი. მერეცკაია

ტერნოპოლის ი. გარბაჩევსკის სახ. სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, უკრაინა

გამოკვლეულია ვირთავების იმუნური სტატუსი ექსპერიმენტული ქალა-ტვინის ტრავმის და სტრეპტოზოტოცინ-ინდუცირებული შაქრის დიაბეტის პირობებში. ნაჩვენებია, რომ ვირთავებში მოდელირებული ქალა-ტვინის ტრავმით და ინდუცირებული დიაბეტით აღინიშნა იმუნური სისტემის ძლიერი დაზიანება, რომლის მდგომარეობა საწყისამდე ვერ აღსდგა ტრავმიდან მე-14 დღესაც კი. ანთების გამომწვევი ციტოკინების კონცენტრაცია გაიზარდა, მაშინ როდესაც საკვლევი პერიოდში ანთების საწინააღმდეგო ციტოკინების რაოდენობა დაქვეითდა, რამაც გამოიწვია სისტემური ანთებითი პასუხის სინდრომის და პოლიორგანული უკმარისობის რისკის განვითარების საშიშროება. ჰუმორალური და უჯრედებით-გამოწვეული იმუნიტეტი პასუხისმგებელი ფაქტორების მანევრები კვლევის მანძილზე არსებითად დაბალი იყო, რამაც განაპირობა ქალა-ტვინის დაზიანებითა და შაქრიანი დიაბეტით ვირთავების ინფექციისადმი მომატებული მგრძობელობა ტრავმირებული, ნორმოგლიკემიურ ცხოველებთან შედარებით.

DEVELOPMENT OF LC-MS/MS METHOD FOR DETERMINATION OF THE OLANZAPINE IN HUMAN PLASMA

¹Sivivadze K., ²Jokhadze M., ²Tushurashvili P., ¹Murtazashvili T., ¹Imnadze N.

¹Tbilisi State Medical University, Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry;

²Levan Samkharauli National Forensics Bureau, Tbilisi, Georgia

Schizophrenia is a debilitating mental illness that impairs mental and social functioning which affects one percent of the population all over the world. For effective pharmacologic treatment of schizophrenia is used pharmaceutical products from group Second-generation Antipsychotics, the same „atypical antipsychotic, which member are olanzapine and quetiapine, closapine, risperidone and other drug products[2].

Olanzapine (OLZ) is an atypical antipsychotic that belongs to the thienobenzodiazepine class, chemically is 2-methyl - 4 - (4-methyl-1-piperazinyl) - 10H-thieno [2,3-b] [1,5] benzodiazepine. The molecular formula is C₁₇H₂₀N₄S, which corresponds to a molecular weight of 312.44. Structural formula of OLZ is on Fig. 1. OLZ is a yellow crystalline solid, which is practically insoluble in water [2].

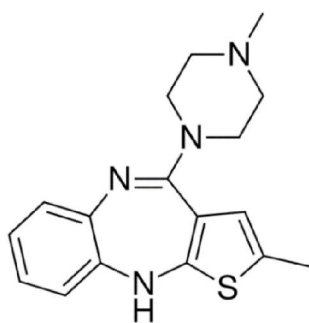


Fig. 1. Structure of Olanzapine

OLZ was developed and marketed by the pharmaceutical company Eli Lilly and Company, with the brand name Zyprexa; Lilly introduces OLZ for the treatment of schizophrenia in 1996. The drug went generic in 2011. Sales of Zyprexa in 2008 were \$2.2B in the US, and \$4.7B worldwide [1].

The mechanism of action of OLZ, as with other drugs having efficacy in schizophrenia, is unknown. However, it has been proposed that this drug's efficacy in schizophrenia is mediated through a combination of dopamine and serotonin type 2 (5HT₂) antagonism. The mechanism of action of OLZ in the treatment of acute manic or mixed episodes associated with bipolar I disorder is unknown.

OLZ binds with high affinity to the following receptors: serotonin 5HT_{2A/2C}, 5HT₆ (K_i=4, 11, and 5 nM, respectively), dopamine D₁₋₄ (K_i=11-31 nM), histamine H₁ (K_i=7 nM), and adrenergic α₁ receptors (K_i=19 nM). OLZ is an antagonist with moderate affinity binding for serotonin 5HT₃ (K_i=57 nM) and muscarinic M₁₋₅ (K_i=73, 96, 132, 32, and 48 nM, respectively). OLZ binds weakly to GABA_A, BZD, and β-adrenergic receptors (K_i>10 μM). Antagonism at receptors other than dopamine and 5HT₂ may explain some of the other therapeutic and side effects of OLZ. OLZ's antagonism of muscarinic M₁₋₅ receptors may explain its anticholinergic-like effects. OLZ's antagonism of histamine H₁ receptors may explain the somnolence observed with this drug. OLZ's antagonism of adrenergic α₁ receptors may explain the orthostatic hypotension observed with this drug. Oral Administration, Monotherapy — OLZ is well absorbed and reaches peak concentrations in approximately 6 hours following an oral dose. It is eliminated extensively by first pass metabolism, with approximately 40% of the dose metabolized before reaching the systemic circulation. Food does not affect the rate or extent of OLZ absorption. OLZ displays linear kinetics over the clinical dosing range. Its half-life ranges from 21 to 54 hours (5th to 95th percentile; mean of 30 hr), and apparent plasma clearance ranges from 12 to 47 L/hr (5th to 95th percentile; mean of 25 L/hr). Administration of OLZ once daily leads to steady-state concentrations in about 1 week that are approximately twice the concentrations after single doses.

© GMN

Plasma concentrations, half-life, and clearance of OLZ may vary between individuals on the basis of smoking status, gender, and age.

OLZ is extensively distributed throughout the body, with a volume of distribution of approximately 1000 L. It is 93% bound to plasma proteins over the concentration range of 7 to 1100 ng/mL, binding primarily to albumin and α-acid glycoprotein. Metabolism and Elimination — Following a single oral dose of labeled OLZ, 7% of the dose of OLZ was recovered in the urine as unchanged drug, indicating that OLZ is highly metabolized. Approximately 57% and 30% of the dose was recovered in the urine and feces, respectively. In the plasma, OLZ accounted for only 12% of the AUC for total radioactivity, indicating significant exposure to metabolites. After multiple dosing, the major circulating metabolites were the 10-N-glucuronide, present at steady state at 44% of the concentration of OLZ, and 4'-N-desmethyl OLZ, present at steady state at 31% of the concentration of OLZ. Both metabolites lack pharmacological activity at the concentrations observed.

Direct glucuronidation and cytochrome P450 (CYP) mediated oxidation are the primary metabolic pathways for OLZ. In vitro studies suggest that CYPs 1A2 and 2D6, and the flavin-containing monooxygenase system are involved in OLZ oxidation. CYP2D6 mediated oxidation appears to be a minor metabolic pathway in vivo, because the clearance of OLZ is not reduced in subjects who are deficient in this enzyme. OLZ is indicated for the treatment of schizophrenia, acute treatment of manic or mixed episodes associated with bipolar I disorder and maintenance treatment of bipolar I disorder. Medication therapy for pediatric patients with schizophrenia or bipolar I disorder should be undertaken only after a thorough diagnostic evaluation and with careful consideration of the potential risks. Adjunct to valproate or lithium in the treatment of manic or mixed episodes associated with bipolar I disorder. Treatment of acute agitation associated with schizophrenia and bipolar I mania. Treatment of depressive episodes associated with bipolar I disorder. Treatment of treatment resistant depression. OLZ orally dosage is 2.5 – 5mg once daily, depend on progress of disease [5].

Toxicity - adverse reactions associated with OLZ therapy include dizziness, akathisia, postural hypotension, somnolence and agitation. Overdosage with 300 mg of the drug in an adult massed only drowsiness and slurred speech. A 2.5 year old child who ingested 15 mg of OLZ approximately 10 hours earlier was observed to be hypersalivating, drowsy, irritable, hostile and had constricted pupils; his serum OLZ concentration was 11 μg/L at that time and his symptoms resolved over the next 14 hours. A 55 year old woman survived the ingestion of over 100 mg of the drug, but remained comatose for 5 days; her initial serum OLZ level exceeded 250 μg/L. A 43 year old man who intentionally ingested as much as 600 mg of OLZ was found to have postmortem blood and urine OLZ concentrations of 1238 and 6987 μg/L, respectively [8].

119

171

Several analytical methods for the determination of OLZ in biological matrices have been published. In these reports, the use of gas chromatography coupled to nitrogen-phosphorus detection (GC-NPD) has been described [3]. However, in most reports high-performance liquid chromatography has been used in conjunction with UV, fluorescence, or electrochemical detection with use of derivatization step to increase fluorescence capacity[8]. Recently, liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) has proven to be a powerful tool for determining drug concentrations in biological matrices and several LC-tandem MS methods for the determination of OLZ in plasma, serum, or brain tissues have previously been published [3,9,10]. OLZ has been measured in biological specimens by high performance liquid chromatography. A single oral dose of olanzapine (7 mg/kg) was given to overnight fasted rats (n = 6). Plasma samples containing the drug were extracted by liquid-liquid extraction using a combination of dichloromethane: n-hexane (80:20). A reverse phase chromatographic column C18 hypersil-BDS was used for chromatographic separation with a mobile phase consisting of 50 mM phosphate buffer pH 5.5, acetonitrile and methanol (50:30:20, v/v/v), flow rate of 1.2 ml/min. Olanzapine was measured using ultraviolet (UV) detection at 214 nm. [4].

Although chromatographic methods offer high degree of specificity, yet, sample clean up, sample pre treatment and the instrumental limitations preclude their use in routine analysis. The above mentioned methods are having some advantages and some disadvantages in terms of sensitivity, sample preparation either time consuming and/or require complex pretreatment or long run time, sample volume, instrumental advantages, and extraction techniques. The main goal of our work was to develop and validate HPLC-MS/MS method for determination of OLZ in plasma and to use the method. It was therefore necessary to develop a simple and selective analytical method, with a low sample volume for extraction and a short run time for quantification of OLZ in plasma.

The study aim was to develop validated a selective, reproducible and sensitive LC-MS/MS method for quality and quantity determination of OLZ in human plasma using risperidone as IS.

Material and methods. OLZ European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard (CAS number 132539-06-1, catalogue number Y0001370) and the internal standard (IS) risperidone European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard (CAS number 106266-06-2, catalogue number R1000600) was obtained from SIGMA-ALDRICH. Organic solvents of HPLC grade from Fluka and Merck (Germany). Methanol of analytical-reagent grades were purchased from Merck. Water passed through a Millipore system was used for sample dilution and in the mobile phases.

120

Blank human plasma was kindly supplied by Blood Institute, Georgia and kept on -20°C. All samples were negative for substances of abuse like THC, cocaine, methadone, amphetamines, methamphetamines, opiates, buprenorphine, benzodiazepines, barbiturates and tricyclic antidepressants with ELISA.

Preparation of stock and working standard solution

Stock solutions of OLZ having concentration 1mg/mL and IS (risperidone) having concentration 1mg/mL were prepared in methanol. Stock solutions were stored at -20 °C. Working standard solution of OLZ was diluted with methanol. All standard solutions were stored at -20 °C. Calibration standards with concentration 5, 10, 15, 20, 30, and 50 ng/mL, were prepared by spiking the working standard solutions of OLZ into human plasma. Dilutions were used to prepare three levels of Quality Control sample (QCs), 50, 500, and 900 ng/mL in human plasma. QCs were stored at -20°C. To prevent degradation of OLZ all samples including extracted standards were protected from light under the entire sample preparation by wrapping the samples in foil.

Prepare of the plasma in vitro samples

The plasma samples were weighted prior to analysis as a standard procedure in the laboratory. 10µL of OLZ is added to 10µL of IS and 190 µL of blank plasma and were stored at -20 °C temperature.

Solid phase extraction

Was used The Gilson GX-271 ASPEC Solid phase extraction system with the cartridge Supelclean LC-18 SPE 500 mg.

Extraction procedure

Sample pretreatment - to 1mL of sample preparation add 4mL DI water and 2mL of 100mM phosphate buffer (pH 6.0). Mix/vortex on Stuart rotator and ultrasonic bath for homogenization. Centrifuge for 10 minutes at 5000 rpm and discard pellet. Received samples pH should be 6.0±0.5. Adjust pH accordingly with 100mM monobasic sodium phosphate.

Tube Conditioning - Rinse with 1 x 3mL Methanol and aspirate. Rinse with 1 x 3mL DI water and aspirate. Rinse with 1 x 1mL 100mM phosphate buffer (pH 6.0) and aspirate. To prevent packing bed from drying should be aspirated at ≤3 inches Hg.

Loading of the sample - Load at 1mL/minute.

Tube Wash - Rinse with 1 x 3mL DI water and aspirate. Rinse with 1 x 1mL 100mM acetic acid and aspirate. Rinse with 1 x 3mL Methanol and aspirate. Dry tube during 5 minutes at ≥ 10 inches Hg.

Elution - Elute 1 x 3mL with the mixture methylene chloride (CH₂Cl₂) / Isopropyl alcohol (IPA) / Ammonium hydroxide (NH₄OH) with proportion 78:20:2. Collect eluate at 1-2mL/

minute. Elution solvent should be prepared fresh daily. To 40mL of isopropanol, add 4mL of concentrated ammonium hydroxide mix and add 156mL of methylene chloride and mix. Evaporate to dryness at 40°C.

Preparing for Analysis - evaporate reconstitute with 200 μL acetonitrile/DI water (1:3). Mix/vortex vigorously for 30 seconds and Inject 10 μL into chromatograph.

Apparatus

The LC system was consisted AGILENT TECHNOLOGIES 1290 Infinity AGILENT TECHNOLOGIES 6460 Triple quad LC-MS/MS. Separation was performed by isocratic elution on Zorbax Eclipse plus C18 (100 \times 4.5 mm, 3.8 μm) column, equipped with pre-column: UHPLC GUARD Zorbax Eclipse plus C18 (5 \times 2.1 mm, 3.8 μm); column temperature was - 35 $^{\circ}\text{C}$. Ionization was performed by using electrospray in the positive mode (ESI+). Acquisition was made in multiple reactions monitoring (MRM) mode.

The mobile phases consisting of 0.1 % water solution of formic acid HCOOH (H₂O):0.1 % acetonitrile solution of formic acid HCOOH (CH₃CN) - 70 : 30 (v/v).The flow rate was 0.4 mL/min, and the column temperature was 35 $^{\circ}\text{C}$. Duration of analysis was 5 minutes.

The stability of the ionization and the intensity of the responses of precursor and fragment ions were optimized by continuous infusion of a standard solution through the syringe pump into a T-piece mixing it with mobile phase (0.4 mL/min). The optimized MRM transitions for OLZ were m/z 313 @ 256, m/z 313 @ 213 and m/z 313 \rightarrow 198as for the quantitative and quality determination, respectively. The optimized cone voltage was 35 V, and the collision energy was 42, 49 and 56eV for transitions. For risperidone the

MRM transition was m/z 411 \rightarrow 191with a cone voltage of 30 V and a collision energy of 33eV. The other main parameters were capillary voltage 1.0 kV, source temperature 120 $^{\circ}\text{C}$, desolvation temperature 300 $^{\circ}\text{C}$.

Method validation

The method was validated for specificity, linearity, lower limit of quantification (LLOQ), accuracy, matrix effect, recovery and stability.

The method specificity was evaluated by screening one batch of blank human plasma prior to the main validation batch. This batch was spiked with known concentration of OLZ at 10ng/mL, extracted and analyzed along with a calibration curve.

The linearity for OLZ was evaluated over the range of 5 - 50 ng/mL.

QCs at three concentration levels (50, 500, and 900 ng/mL) were analyzed to evaluate intra and interassay precision and accuracy of the method. Precision was expressed as RSD% for replicate measurements and accuracy (%) by the percentage of deviation between nominal and calculated concentrations.

The matrix effect was assessed by comparing the peak areas of analytes from the standards spiked after extraction and the pure QCs at the same concentration levels. The recovery was assessed by comparing the standards spiked before and after extraction at three concentration levels (50, 500, and 900 ng/mL).

Results and their discussion. Received mass spectrum and LC-MS/MS chromatograms are given on Figs. 2-4.

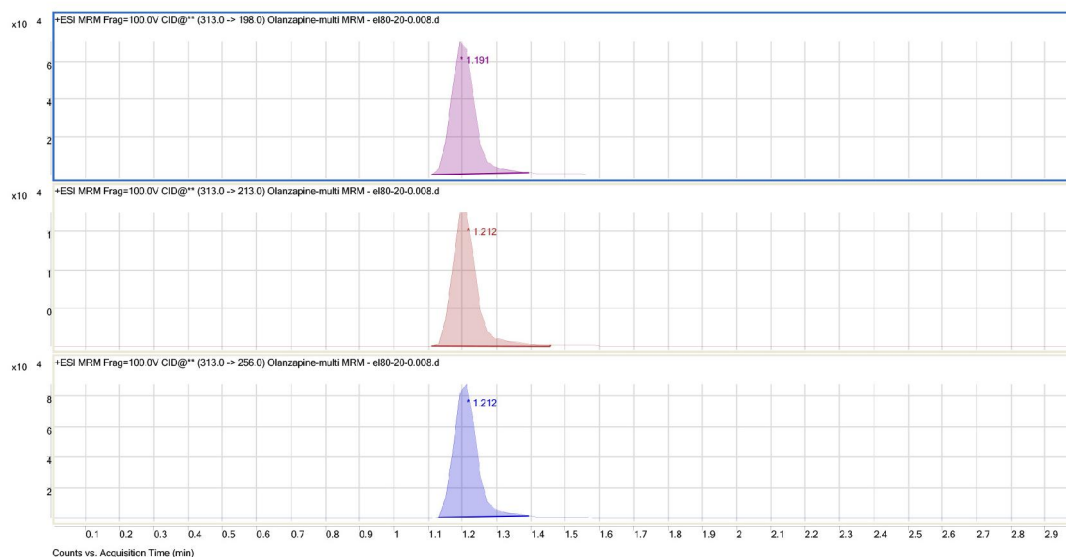


Fig. 2. OLZ transition m/z 313 @ 256, m/z 313 @ 213, m/z 313 @ 198

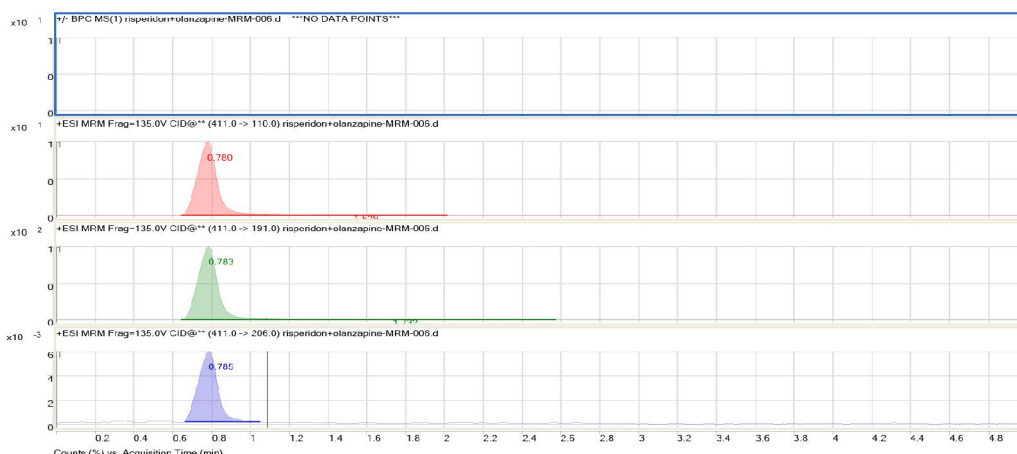


Fig. 3. Risperidone transition m/z 411@ 206; m/z 411 @ 191; m/z 411 @ 110

Method validation

The method was validated according to the recommendation for the bioanalytical method validation by FDA (2001).

Mass spectrometry:

To obtain optimum sensitivity and selectivity, ESI technique operated in the positive ion mode was used for the LC-MS/MS multiple reaction monitoring (MRM) analysis. protonated form of analyte and IS $[M + H]^+$ ions was the parent ion in the Q_1 spectrum and was used as the precursor ion to obtain Q_3 product ion spectra. The product ion mass spectrum of positively charged ion of OLZ shows the formation of characteristic product ions at m/z 256, 213 and 198. The most sensitive mass transition was monitored from m/z 13 @ 256 (Fig. 2).

Specificity:

Blank plasma was tested for endogenous interferences. The OLZ retention time region was free from interferences. The back-calculated values spiked at concentrations of 5, 100, and 400 ng/mL for OLZ, the RSD was less than 15% and the accuracy was 80%-120%, respectively, indicating no significant batch-to-batch variation.

Linearity and LLOQ:

Linear regression analysis for OLZ was performed by using internal standard method. A linear calibration curves showed a R^2 value of 0.9971 for OLZ (Fig. 4). Based on the standard data presented here, it was concluded that the calibration curves used in this method were accurate for the determination of OLZ. The assay is linear in the range 5-50ng/mL for OLZ. The LLOQ was 0.15ng/mL for OLZ. Though LLOQ is adequately low for OLZ quantification, the sensitivity is achieved using a limited sample volume of 500 μ L plasma.

Accuracy and precision:

A summary of the individual QC data is obtained in the three runs for the validation. The inter-batch precision RSD

of the assay was no more than 3% at four concentration levels of the QC samples, the RSD for intra-batch precision was less than 3%. The inter- and intra-batch accuracy of the assay ranged from 85% to 115%. The assay for OLZ was accurate and precise between runs and within individual run for each level.

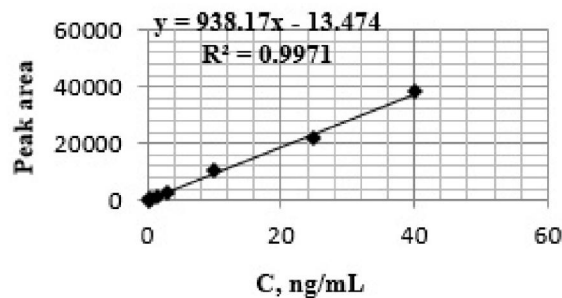


Fig. 4. Calibration standards curves for OLZ

Recovery, matrix effect and stability:

Relative recoveries were estimated from mean values of five replicates at high and low QC level. Recoveries of 107% (7 ng/ml) and 85% (70 ng/ml) were found in plasma and 75% (1.5 ng/ml) and 81% (15 ng/ml), respectively.

No matrix effects were observed when drug-free reference samples, plasma were injected during constant infusion of OLZ.

Previous studies have shown that OLZ is stable in human plasma samples, without any added preservatives, for at least 12 months at -20 °C. In the present study samples were stored at -20°C before analysis and no severe degradation has been observed in samples that have been re-analysed.

Conclusion. Was developed and validated a selective, reproducible and sensitive LC-MS/MS method for quality and quantity determination of OLZ in human plasma using risperidone as IS. To the best of knowledge, the

cost-effectiveness, simplicity of the assay using Solid phase extraction. From the results of the validation parameters, we can conclude that the developed method can be useful for determination of OLZ of forensic investigation of the intoxication or postmortem cases.

Acknowledgment. The authors gratefully acknowledge to LEPL Levan Samkharauli National Forensics Bureau, Chemical toxicological laboratory, Tbilisi, Georgia for providing necessary facilities to carry out this work.

REFERENCES

1. Eli Lilly and company 2015 Integrated Report: 2015; 10.
2. European Pharmacopoeia 8th Edition: 2014; 01/2012:2258; 2896-2897.
3. Nirogi R.V.S., Kandikere V.N., Shukla M., Mudigonda K., Maurya S., Boosi R., and Yeffamilli A.. Development and validation of a sensitive liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry assay for the quantification of olanzapine in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006; 41: 935-942.
4. Pervaiz F., Ahmad M., Minhas M.U, Sohail M.; Development and Validation of Reverse Phase High Performance Chromatography Method for Determination of Olanzapine in Microsample Rat Plasma: Application to Preclinical Pharmacokinetic Study; *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* January 2015; 14 (1): 141-147.
5. Prescribing Information of Zyprexa, Eli Lilly and Company, 26.10.2016, ZYP-0004-USPI-20161026; 1-35.
6. Randall C. Baselt, Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man, 9th Edition, Chemical Toxicology Institute Foster City, California Chemical Toxicology Institute Foster City, California: 2011.
7. Sachse J., Koller J., and Hiemke C. Automated analysis of quetiapine and other antipsychotic drugs in human blood by high performance-liquid chromatography with column-switching and spectrophotometric detection. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2006; 830: 342-348.
8. Saracino M.A., Gandolfi O., Dall'Olio R., Albers L., Kennedler E., and Raggi M.A. Determination of Olanzapine in rat brain using liquid chromatography with coulometric detection and a rapid solid-phase extraction procedure. *J. Chromatogr. A* 2006; 11(22): 21-27.
9. Sistika P., Turjapb M., Iordachea A.M, Saldanha H., Lemra K., Bednara P.; Quantification of selected antidepressants and antipsychotics in clinical samples using chromatographic methods combined with mass spectrometry: A review (2006-2015). *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2016; 160(1):39-53.
10. Zhang G., Terry A.V., and Bartlett M.G.. Sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of olanzapine, risperidone, 9-hydroxy-risperidone, clozapine, haloperidol and ziprasidone in rat brain tissue. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007; 858: 276-281.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF LC-MS/MS METHOD FOR DETERMINATION OF THE OLANZAPINE IN HUMAN PLASMA

¹Sivsvadze K., ²Jokhadze M., ²Tushurashvili P., ¹Murtazashvili T., ¹Imnadze N.

¹Tbilisi State Medical University, Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry; ²Levan Samkharauli National Forensics Bureau, Tbilisi, Georgia

The study aim was to develop a validated selective, reproducible and sensitive Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) method for qualitative and quantitative determination of olanzapine (OLZ) in human plasma. For isolation was used solid phase extraction with the Gilson GX-271 ASPEC Solid phase extraction system, cartridge Supelclean LC-18 SPE 500mg. Elution solvent contained 40mL of isopropanol, 4mL of concentrated ammonium hydroxide and 156mL of freshly prepared methylene chloride.

Samples containing OLZ and IS were chromatographed on AGILENT TECHNOLOGIES 1290 Infinity AGILENT TECHNOLOGIES 6460 Triple quad LC-MS/MS system. Separation was performed by isocratic elution on Zorbax Eclipse plus C18 (100'4.5 mm, 3.8 μm) column, equipped with pre-column: UHPLC GUARD Zorbax Eclipse plus C18 (5x2.1 mm, 3.8 μm); column temperature was 35°C. The mobile phases consisted of 0.1 % water solution of formic acid HCOOH (H₂O):0.1 % acetonitrile solution of formic acid HCOOH (CH₃CN) in 70 :30 (v/v) proportion. The flow rate was 0.4 mL/min.

Determination was performed on a triple-quadrupole mass spectrometer employing electrospray ionization technique (ESI+), operating in multiple reaction monitoring (MRM) and positive ion mode. Total chromatographic run time was 5 min. The optimized MRM transitions for OLZ were m/z 313 @ 256, m/z 313 →213 and m/z 313→198 as the quantitative and confirmative traces, respectively. Method was validated on following parameters: specificity, linearity, LLOQ, accuracy and precision, recovery, matrix effect and stability.

The method was subsequently applied to in vitro plasma samples for determination of OLZ. The obtained data allows the opportunity for forensic investigation of the intoxication in postmortem cases.

Keywords: LC-MS/MS, solid phase extraction, method validation.

РЕЗЮМЕ

РАЗРАБОТКА ЖИДКОСТНОГО ХРОМАТО- МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА (LC/MS/MS) ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОЛАНЗАПИНА В ПЛАЗМЕ ЧЕЛОВЕКА

¹Сивсivadze К.Г., ²Джохадзе М.С.,
²Тущурашвили П.Р., ¹Мурташвили Т.Ж.,
¹Имнадзе Н.Е.

¹Тбилисский государственный медицинский университет, департамент фармацевтической и токсикологической химии; ²Национальное бюро Судебной экспертизы им. Левана Самхараули, Тбилиси, Грузия

Целью исследования явилась разработка воспроизводимого валидированного, селекционного, чувствительного метода жидкостной хромато-масс-спектрометрии (LC/MS/MS) для определения оланзапина в плазме человека.

Для изолирования поэтапной экстракцией использовалась система Gilson GX-271 ASPEC, картридж Supelclean LC-18 SPE 500 мг. Растворитель для элюирования содержал 40 мл изопропанола, 4 мл концентрированного гидроксида аммония и 156 мл метилсн хлорида. Для хроматографирования образцов, содержащих оланзапин и внутренний стандарт, использовался жидкостный хроматограф - в тандеме со спектрометром (LC-MS-MS) - AGILENT TECHNOLOGIES 1290 Infinity AGILENT TECHNOLOGIES 6460 Triple quad LC/MS. Разделение происходило в следующей колонке - Zorbax Eclipse, стационарная фаза - C18(100*4.5мм, 3.8μm). Прибор также оснащен передней колонкой - UHPLC GUARD Zorbax Eclipse, стационарная фаза - C18(5*2.1мм,3.8μm). Температура колонки была 35°C. В качестве подвижной фазы была выбрана следующая система: 0.1% водный раствор муравьиной кислоты HCOOH (H2O); ацетонитрил 0.1% муравьиной кислоты HCOOH (CH3CN) в пропорции 70:30 (v/v). Продолжительность тестирования составляла 5 минут в изократном режиме со скоростью течения подвижной фазы 0.4мл/мин. Определение происходило при использовании масс-спектрометра с тройным квадрулем, ионизация достигалась положительным электрораспылением (ESI+), сканирование протекало с мониторингом многократных реакций (MRM). Время хроматографии составляло 6 минут. Оптимальные MRM переходы оланзапина - m/z 313 @ 256, m/z 313 →213 и m/z 313 →198, дают возможность провести как качественный, так и количественный анализ указанных веществ. Валидация метода осуществлена по следующим параметрам: специфичность, линейность, обнаруживаемый минимум, точность, восстанавливаемость, матричный эффект и стабильность.

Разработанный метод был с успехом использован в in vitro образцах плазмы для подтверждения наличия оланзапина. Полученные данные дают возможность использовать метод при проведении судебной химической экспертизы в случаях отравлений.

რეზიუმე

ადამიანის პლაზმაში ოლანზაპინის ანალიზის სითხურ ქრომატოგრაფიული – მას-სპექტრომეტრული (LC/MS/MS) მეთოდის შემუშავება

¹კ. სივსივადე, ²მ. ჯოხადე, ²პ. თუშურაშვილი,
¹თ. მურთაშაშვილი, ¹ნ. იმნადე

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, ფარმაცევტული და ტოქსიკოლოგიური ქიმიის დეპარტამენტი; ²ლეკან სამხარაულის სახ. სასამართლო ექსპერტიზის ეროვნული ბიურო, თბილისი, საქართველო

შემუშავებულია ადამიანის პლაზმაში ოლანზაპინის თვისობრივ-რაოდენობრივი განსაზღვრის ვალიდირებული, სელექციური, მგრძობიარე, განმეორებადი, სითხურ ქრომატოგრაფიული – მას-სპექტრომეტრული (LC/MS/MS) მეთოდი. იზოლირებისათვის გამოიყენებოდა მყარფაზური ექსტრაქცია. იზოლირება ხდებოდა Gilson GX-271 ASPEC მყარფაზური ექსტრაქციის სისტემით, კარტრიჯი Supelclean LC-18 SPE 500mg. გამსხვავებული ელუირებისათვის შეიცავდა 40 მლ იზოპროპანოლს, 4 მლ კონცენტრირებულ ამონიუმის ჰიდროქსიდს და 156 მლ მეთილენქლორიდს.

ქრომატოგრაფირებისათვის ვიყენებდით სითხურ ქრომატოგრაფს – მას-სპექტრომეტრთან ტანდემში (LC-MS-MS) - AGILENT TECHNOLOGIES 1290 Infinity AGILENT TECHNOLOGIES 6460 Triple quad LC/MS. დაყოფა ხდებოდა სვეტზე - Zorbax Eclipse, სტაციონარული ფაზა - C18(100*3.8 mm, 3.8 μm). სელსაწყო აღჭურვილი იყო წინახვეტი - UHPLC GUARD Zorbax Eclipse, სტაციონარული ფაზა - C18(5*2.1mm,3.8μm). სვეტის ტემპერატურა 35°C. მოძრავ ფაზად შერჩეული იქნა სისტემა: 0.1% ტიანტეველმეკას წყალხსარი HCOOH (H2O)-0.1 % ტიანტეველმეკას აცეტონიტრილი HCOOH (CH3CN) =70 : 30 (v/v). ანალიზის ხანგრძლივობა 5 წთ. რეჟიმი იზოკრატული, მოძრავი ფაზის დინების სიჩქარე 0.4 მლ/წთ. განსაზღვრა ხდებოდა სამმაგი კვადროპოლის მას-სპექტრომეტრზე, იონიზაცია მიიღწეულა ელექტროგაფრქვევით (ESI+), სკანირება მიმდინარეობდა მრავალჯერადი რეაქციების მონიტორინგით (MRM). ქრომატოგრაფირების დრო 5 წთ. ოლანზაპინის ოპტიმალური MRM გადასვლები არის m/z 313 @ 256, m/z 313 →213 და m/z 313 →198, რაც შესაძლებელს ხდის მოვხდინოთ

აღნიშნული ნივთიერების, როგორც თვისობრივი ასევე რაოდენობრივი ანალიზი. მეთოდის ვალიდაცია განხორციელდა შემდეგ პარამეტრებზე: სპეციფიურობა, სწორხაზოვნება, აღმოსაჩენი მინიმუმი, სისწორე, სიზუსტე, ადღგენადობა, მატრიცის ეფექტი და სტაბილურობა.

შემუშავებული მეთოდი წარმატებით იქნა გამოყენებული პლაზმის *in vitro* ნიმუშებში ოლანზაპინის არსებობის დასადასტურებლად. მიღებული მონაცემები საშუალებას იძლევა მეთოდი გამოყენებული იყოს სასამართლო ქიმიური ექსპერტიზისათვის ოლანზაპინით მოწამვლის შემთხვევაში.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ОТДАЛЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ЭКСПОЗИЦИИ СВИНЦА

Пагараиа Г.К., Багашвили Т.И., Андроникашвили Г.Т.,
Гурашвили Т.Т., Гогешвили К.Ш., Авалишвили М.Г.

*Тбилисский государственный университет им. И. Джавахишвили, департамент патологии;
Центр биомедицины им. И. Бериташвили, лаборатория экспериментальной неврологии, Грузия*

Профилактика вредного влияния свинца, связанного с профессиональными факторами и загрязнением окружающей среды, является актуальной проблемой медицины.

Несмотря на доказанную опасность экспозиции свинца на организм человека, он по сей день имеет широкое применение в производстве. Добыча и использование свинца – одного из мощнейших факторов загрязнения окружающей среды – уходят корнями в самый ранний период становления человечества. Случаи производственного отравления свинцом были известны еще Галлену (131-201 гг.), но их подробное описание появилось гораздо позднее [8,18].

Свинец представляет собой мягкий, блекло-серого цвета металл. Соединения свинца трудно растворимые, однако, поскольку свинец обладает достаточно высоким ионным потенциалом (7,4 единицы), в кислой среде он частично сохраняет ионное состояние [7]. В природе свинец представлен смесью 204, 206, 207 и 208 стабильных изотопов, в которой всегда присутствует также радиоактивный изотоп Pb^{210} [4].

Свинец применяется для защиты электрических кабелей, при изготовлении свинцового сурика и других красителей [16], его органическое соединение – тетраэтилсвинец $Pb(C_2H_5)_4$ добавляется в бензин для повышения октанового числа [7]. 25-75% содержащегося в антидетонаторе свинца (80 мг/л) вместе с выхлопными газами выбрасывается в окружающую среду. Концентрация свинца в атмосфере городов с интенсивным движением, например, в Лос-Анжелесе, в 80-е годы

прошлого столетия составляла 5 мкг/см³, и этот показатель ежегодно возрастал на 5% [3]. Благодаря разработанной и проведенной США и другими развитыми странами экологической политике, рассеивание свинца в окружающей среде значительно снизилось. Однако, несмотря на достигнутые результаты, свинец по сей день остается наиболее распространенным экологическим ядом в США и на большей части земного шара [12]. По данным ВОЗ, во многих странах риск экспозиции свинца так же высок, как в прошлые десятилетия. Глобализация – межнациональное перемещение капитала, возросший товарооборот и перемещение большого числа людей на большие расстояния, помимо положительных результатов, создает также предпосылки импорта экологической опасности [15].

Ионы свинца проникают в организм при дыхании, в виде взвешенных в воздухе аэрозолей, при использовании загрязненной питьевой воды и продуктов питания [10,17]. Кумулированный в дспо-органах (костная ткань, костный мозг, паренхиматозные органы) свинец долгое время остается в организме [13,9], иногда на протяжении всей жизни, и является постоянным источником интоксикации [8,5]. До достижения критической концентрации и при отсутствии благоприятствующих условий он клинически не проявляет свои активные свойства. Однако, как только, по каким-либо причинам, в организме происходит нарушение кислотно-щелочного баланса или, тсм болсс, при развитии ведущей к ацидозу хронической гипоксии, ионы свинца в полной мере проявляют свои агрессивные свойства. Они входят в кровь и обостряют имеющуюся хроническую интоксикацию [2].

**G
M
N**

***GEORGIAN
MEDICAL
NEWS***

ISSN 1512-0112

No 3 (264) May 2017



TBILISI-NEW YORK

საქართველოს სამედიცინო სიახლენი
МЕДИЦИНСКИЕ НОВОСТИ ГРУЗИИ

биологическое воздействие на микрофлору кишечника в течение длительного периода времени в сравнении с внешним излучением.

რეზიუმე

შიდა და გარე დასხივების ქვეშ მყოფი ვირთაგვების ნაწლაგების მიკროფლორა

1.ი. კაიხანიშვილი, 1.ნ. ჩაიჭუნუხოვა, 1.მ. ურაზალინი, 2.ვ. სტეპანენკო, 3.მ. ხოში

1.სემის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, ეახ-ხეთი; 2. ციბას სახ. სამედიცინო რადიოლოგიური სამეცნიერო ცენტრი - რუსეთის ჯანდაცვის ფედერალური სახელმწიფო საბიუჯეტო დაწესებულება "ეროვნული სამედიცინო რადიოლოგიური სამეცნიერო ცენტრის" ფილიალი, ობინსკი, რუსეთი; 3. ხიროსიმის უნივერსიტეტი, იაპონია

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ვირთაგვების მსხვილი ნაწლაგის მიკროფლორის ხარისხობრივი და რაოდენობრივი შეფასება შიდა და გარე დასხივების პირობებში.

ექსპერიმენტი ჩატარდა 10 კვირის ახაკის ვისტარის ჯიშის 40 ვირთაგვაზე. ვირთაგვები დაიყო 4 ჯგუფად:

I ჯგუფი - ვირთაგვები, რომლებიც შიდა დასხივებას რადიონუკლიდით ^{56}Mn იღებდნენ საკმაოდ მაღალი დოზით; II ჯგუფი - 12 ვირთაგვა, ასევე, შიდა დასხივებით რადიონუკლიდით ^{56}Mn შედარებით დაბალი დოზით; III ჯგუფის 9 ვირთაგვა იღებდა გარე დასხივებას ^{60}Co სხივებით. 3 ვირთაგვა თითოეული ჯგუფიდან დეკაპიტრებული იყო დასხივებიდან 6 საათის, 3, 14 და 60 დღე-ღამის შემდეგ. ^{56}Mn შიდა დასხივების შემდეგ 0,69 გრ და 1,90 გრ ოდენობით გამოვლინდა მსხვილი ნაწლაგის მიკროფლორის შესამწივე ცვლილება. ^{56}Mn დასხივებიდან 6 საათის და 3 დღე-ღამის შემდეგ მსხვილი ნაწლაგის მიკროფლორის ძირითადი წარმომადგენლების - ბიფიდო- და ლაქტობაქტერიების მანვერებლები, დასხივების დოზისგან დამოკიდებულებით, დაქვეითდა, პირობითადად ვერც ერთი ბაქტერიების რაოდენობამ კი მოიმატა. ეს ცვლილებები შენარჩუნებული იყო 14 დღემდე. გარე გამა-დასხივებამ ^{60}Co 2 გრ ოდენობით, ასევე, შეცვალა ნაწლაგების მიკროფლორა, იმ განსხვავებით, რომ ცვლილებები არ შენარჩუნდა და მე-14 დღეს დაუბრუნდა საწყის მანვერებლებს.

საგარეოდ, გარე დასხივებისგან განსხვავებით, ^{56}Mn -ით შიდა დასხივება დაბალი დოზის პირობებშიც კი საკმაოდ ხანგრძლივი დროის განმავლობაში ახდენს მნიშვნელოვან ბიოლოგიურ ზემოქმედებას ნაწლაგის მიკროფლორაზე.

DEVELOPMENT OF THE GC-MS/MS METHOD FOR QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF CLOZAPINE IN HUMAN BLOOD

¹Sivivadze K., ²Jokhadze M., ²Tushurashvili P., ¹Murtazashvili T., ¹Imnadze N.

¹Tbilisi State Medical University, Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry;
²Levan Samkharauli National Forensics Bureau, Tbilisi, Georgia

Clozapine is an atypical antipsychotic medication, sold under the different brand name. Pharmaceutical products, contains Clozapine are available in tablets of 25 mg, 50 mg and 100 mg for oral administration, in Georgia are registered under following brand names: Leponex, Clozapine, Zopin, Azaleptine. Clozapine is indicated for the treatment of severely ill patients with schizophrenia who fail to respond adequately to standard antipsychotic treatment and for reducing the risk of recurrent suicidal behavior in patients with schizophrenia or schizoaffective disorder who are judged to be at chronic risk for re-experiencing suicidal behavior, based on history and recent clinical state [8].

Clozapine is a tricyclic dibenzodiazepine derivative, chemically is 8-Chloro-11-(4-methylpiperazin-1-yl)-5H-dibenzo[b,e] [1,4] diazepine, the structural formula is on Figure 1. The molecular formula is $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{ClN}_4$, which corresponds to a molecular weight M_r 326.8, yellow, crystalline powder, practically insoluble in water, freely soluble in methylene chloride, soluble in ethanol (96 per cent), it dissolves in dilute acetic acid [3].

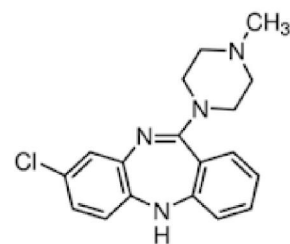


Fig. 1. Structural formula of Clozapine

Mechanism of Action: the mechanism of action of clozapine is unknown. However, it has been proposed that the therapeutic efficacy of clozapine in schizophrenia is mediated through antagonism of the dopamine type 2 (D_2) and the serotonin type 2A (5-HT_{2A}) receptors. Clozapine tablets also act as an antagonist at adrenergic, cholinergic, histaminergic and other dopaminergic and serotonergic receptors.

Pharmacodynamics: Clozapine demonstrated binding affinity to the following receptors: histamine H₁ (K_i 1.1 nM), adrenergic α_{1A} (K_i 1.6 nM), serotonin 5-HT₆ (K_i 4 nM), serotonin 5-HT_{2A} (K_i 5.4 nM), muscarinic M₁ (K_i 6.2 nM), serotonin 5-HT₇ (K_i 6.3 nM), serotonin 5-HT_{2C} (K_i 9.4 nM), dopamine D₄ (K_i 24 nM), adrenergic α_{2A} (K_i 90 nM), serotonin 5-HT₃ (K_i 95 nM), serotonin 5-HT_{1A} (K_i 120 nM), dopamine D₂ (K_i 160 nM), dopamine D₁ (K_i 270 nM), dopamine D₅ (K_i 454 nM), and dopamine D₃ (K_i 555 nM). Clozapine causes little or no prolactin elevation. Clinical electroencephalogram (EEG) studies demonstrated that clozapine increases delta and theta activity and slows dominant alpha frequencies. Enhanced synchronization occurs.

Pharmacokinetics: Absorption - In humans, clozapine tablets (25 mg and 100 mg) are equally bioavailable relative to a clozapine solution. Following oral administration of clozapine tablets 100 mg twice daily, the average steady-state peak plasma concentration was 319 ng/mL (range: 102 to 771 ng/mL), occurring at the average of 2.5 hours (range: 1 to 6 hours) after dosing. The average minimum concentration at steady state was 122 ng/mL (range: 41 to 343 ng/mL), after 100 mg twice daily dosing. Food does not appear to affect the systemic bioavailability of clozapine tablets. Thus, clozapine tablets may be administered with or without food.

Distribution - Clozapine is approximately 97% bound to serum proteins. **Metabolism and Excretion** - Clozapine is almost completely metabolized prior to excretion, and only trace amounts of unchanged drug are detected in the urine and feces. CLZ is a substrate for many cytochrome P450 isozymes, in particular CYP1A2, CYP2D6, and CYP3A4. Approximately 50% of the administered dose is excreted in the urine and 30% in the feces. The demethylated, hydroxylated, and N-oxide derivatives are components in both urine and feces. Pharmacological testing has shown the desmethyl metabolite (norclozapine) to have only limited activity, while the hydroxylated and N-oxide derivatives were inactive. The mean elimination half-life of clozapine after a single 75 mg dose was 8 hours (range: 4 to 12 hours), compared to a mean elimination half-life of 12 hours (range: 4 to 66 hours), after achieving steady state with 100 mg twice daily dosing. A comparison of single-dose and multiple-dose administration of clozapine demonstrated that the elimination half-life increased significantly after multiple dosing relative to that after single-dose administration, suggesting the possibility of concentration-dependent pharmacokinetics. However, at steady state, approximately dose-proportional changes with respect to AUC (area under the curve), peak, and minimum clozapine plasma concentrations were observed after administration of 37.5, 75, and 150 mg twice daily.

Indications and usage: Clozapine are indicated for the treatment of severely ill patients with schizophrenia who fail to respond adequately to standard antipsychotic treatment. Because of the risks of severe neutropenia and of seizure associated with its use, clozapine tablets should be used only in patients who have failed to respond adequately to standard antipsychotic treatment. Reduction in the Risk of Recurrent Suicidal Behavior in Schizophrenia or Schizoaffective Disorder. Suicidal behavior refers to actions by a patient that put him/herself at risk for death. The effectiveness of clozapine in reducing the risk of recurrent suicidal behavior was demonstrated over a two-year treatment period.

Dosage and administration: required laboratory testing prior to initiation and during therapy prior to initiating treatment with clozapine, a baseline the absolute neutrophil count (ANC), must

be obtained. The baseline ANC must be at least 1500/μL for the general population, and at least 1000/μL for patients with documented Benign Ethnic Neutropenia (BEN). **Dosing Information:** The starting dose is 12.5 mg once daily or twice daily. The total daily dose can be increased in increments of 25 mg to 50 mg per day, if well-tolerated, to achieve a target dose of 300 mg to 450 mg per day (administered in divided doses) by the end of 2 weeks. Subsequently, the dose can be increased once weekly or twice weekly, in increments of up to 100 mg. The maximum dose is 900 mg per day. **Over dosage Experience:** the most commonly reported signs and symptoms associated with clozapine overdose are: sedation, delirium, coma, tachycardia, hypotension, respiratory depression or failure. Fatal overdoses have been reported with clozapine, generally at doses above 2500 mg. There have also been reports of patients recovering from overdoses well in excess of 4 g [7].

Toxicity - The most serious cardiac complications caused by clozapine, such as cardiomyopathy, myocarditis and pericarditis, are characterized by shortness of breath, heart palpitations/pains and thoracic pain. In most cases, electrocardiographic changes, pericardial effusion, and nonspecific signs of inflammation are observed. However, only a few cases of pericarditis and pericardial effusion induced by clozapine, even when used at low dosage, are reported in the literature. Was reported 65 cases of myocarditis, 52 cases of cardiomyopathy and only six cases of pericarditis occurring during clozapine treatment. The dose used is a poor predictor of clinical response, and there is little correlation between dose and plasma level, due to individual differences in metabolism, pharmacokinetic differences, gender, age, drug interactions and the smoking of tobacco products [1].

Case reports toxicity: in literature review was discussed several cases, among them is the deaths of two patients with treatment-refractory schizophrenia treated with clozapine. A 29-year-old male had received gradually increasing doses of clozapine over two years due to ongoing treatment resistance. Plasma clozapine levels in the three months prior to his death ranged from 750 to 1200 μg/L. His final clozapine level taken 3 days before he died was 1180 μg/L. His post-mortem clozapine level was 2800 μg/L. In the second case, a 56-year-old female had been treated with clozapine for 6 years, including a consistent 500 mg daily dose for the 4 years preceding her death. Her CLZ levels varied between 290 and 1370 μg/L over her 6 years of CLZ treatment, although there were no levels greater than 1000 μg/L in the 2 years preceding her death. Her final clozapine level, taken 1 month before she died, was 770 μg/L. Her post-mortem clozapine level was in the range consistent with toxicity [9].

Although there is no simple relationship among clozapine levels, therapeutic efficacy, and toxicity, was compared 3 non-overlapping ranges and found: "medium" range (200 to 300 ng/mL) is a good initial target; low range (50 to 150 ng/mL) is not as effective as medium or high levels; high range (350 to 450 ng/mL) can be tried if clinical response is insufficient, although the high range was no more effective than the medium range. Over high levels (ie >1,000 ng/mL combined clozapine and norclozapine levels) have no proven benefit and increase seizure risk [4].

In this scenario, therapeutic drug monitoring (TDM) of psychotropic drugs is essential: it can help to enhance the therapeutic response, design optimal dosing regimens, avoid the build-up of excessively high and potentially toxic drug concentrations and

monitor patient's adherence to treatment. Also important clozapine determination for forensic purpose.

Over the last years, researchers have developed several methods to determine clozapine in biological fluids.

For quantification of clozapine and norclozapine in the sera of schizophrenic patients, treated with clozapine was developed ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MS) for simultaneous determination of clozapine and its major metabolite norclozapine in human serum. The compounds were extracted from serum by a single step protein precipitation and analyzed using a UPLC-triple-quadrupole detection (TQD) system. Separation of compounds was achieved on a BEH C18 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) analytical column using methanol and water (both containing 0.2% ammonium hydroxide) as the mobile phase at a flow rate of 0.40 mL/min. The compounds were ionized in the electrospray ionization ion source of the TQD and were detected in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. The MRM transitions m/z 327 → 270 and m/z 313 → 192 for clozapine and norclozapine, respectively, were used for the quantification ions. Clozapine transition 327 → 192 and norclozapine transition 313 → 270 were used as confirmation ions. Method was applied for TDM [6].

Was described development of high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) to determine antipsychotics (olanzapine, quetiapine, clozapine and etc.) along with antidepressants, anticonvulsants and anxiolytics (diazepam and clonazepam) in plasma samples obtained from schizophrenic patients. The samples were prepared by protein precipitation. The target drugs were separated on an X Select SCH C18 column (100 mm × 2.1 mm × 2.5 μm) within 8.0 min by means of gradient elution. The drugs were then detected on a quadrupole tandem mass spectrometer equipped with an electrospray ionization source, operating in the multiple reactions monitoring mode and in the positive ionization mode [2].

An ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method was developed and validated for the quantification of 25 common pharmaceuticals in whole blood. The selected pharmaceuticals represent the most frequently detected drugs in forensic laboratory, among them was antipsychotic clozapine. Whole blood samples were extracted with butyl acetate after adjusting pH with 2M NaOH. The target analytes were separated on a 100 × 2.1 mm ACQUITY BEH 1.7 μm C18 column by a formic acid/acetonitrile gradient elution using a Waters ACQUITY Ultra-Performance Liquid Chromatography system. Quantification was performed on a Waters tandem quadrupole ACQUITY TQD using multiple reaction monitoring in positive mode. The analytes were eluted within 11 min. The limit of quantification (LOQ) ranged from 0.002 to 0.01 mg/kg depending on the analyte [5].

High quality exact analytical data are necessary in clinical and forensic toxicology, because unreliable data could lead to wrong or fatal treatment of the patient or to unjustified legal consequences for the defendant in court.

Therefore, sensitive and reliable analytical methods are required to for the detection and quantification of clozapine at these low concentration levels in biological matrices.

The aim of this study was to optimize workflow, minimize costs

and develop a simple, fast, sensitive validated GC-MS/MS method for detection and quantification of clozapine in blood based on solid phase extraction.

Material and methods. Clozapine (CLZ) European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard (CAS number 5786-21-0, catalogue number C2460000) was obtained from SIGMA-ALDRICH. Organic solvents of HPLC grade from Fluka and Merck (Germany). Methanol of analytical-reagent grades were purchased from Merck. Water passed through a Millipore system was used for sample dilution and in the mobile phases.

Blank human plasma was kindly supplied by Blood Institute, Georgia and kept on -20°C. All samples were negative for substances of abuse like THC, cocaine, methadone, amphetamines, methamphetamines, opiates, buprenorphine, benzodiazepines, barbiturates and tricyclic antidepressants with ELISA.

Preparation of stock and working standard solution

For preparing of the working standard solutions, stock standard solutions (200 μg/mL⁻¹ in methanol) were diluted in an appropriate volume of methanol. The calibration standards and quality control samples (QCs) were prepared by spiking the blank human blood samples with known concentrations of working standard solutions. The concentrations of the calibration standards range was 5, 50, 250, 750, 1000, 1500ng/mL for. Dilutions were used for preparing three levels of QCs, 50, 500, and 900 ng/mL in human blood. Stock standard solution QCs were stored at -20°C. Working standard solutions were stored at +5°C for one month. To prevent degradation of all samples including extracted standards were protected from light under the entire sample preparation by wrapping the samples in foil.

Prepare of the blood sample

The blood samples were weighted prior to analysis as a standard procedure in the laboratory. 20μL of QCs were added to 190 μL of human blood and was stored at -20 °C temperature.

Solid phase extraction

Was used The Gilson GX-271 ASPEC Solid phase extraction system with the cartridge Supelclean LC-18 SPE 500 mg.

Extraction procedure

Sample pretreatment - to 1mL of sample preparation add 4mL DI water and 2mL of 100mM phosphate buffer (pH 6.0). Mix/vortex on Stuart rotator and ultrasonic bath for homogenization. Centrifuge for 10 minutes at 5000 rpm and discard pellet. Received samples pH should be 6.0±0.5. Adjust pH accordingly with 100mM monobasic sodium phosphate.

Tube Conditioning - Rinse with 1 x 3mL Methanol and aspirate. Rinse with 1 x 3mL DI water and aspirate. Rinse with 1 x 1mL 100mM phosphate buffer (pH 6.0) and aspirate. To prevent packing bed from drying should be as pirated at ≤3 inches Hg.

Loading of the sample - Load at 1mL/minute.

Tube Wash - Rinse with 1 x 3mL DI water and as pirate. Rinse with 1 x 1mL 100mM acetic acid and aspirate. Rinse with 1 x 3mL Methanol and as pirate. Dry tube during 5 minutes at ≥ 10 inches Hg.

Elution - Elute 1 x 3mL with the mixture methylene chloride

(CH₂Cl₂)/Isopropyl alcohol (IPA)/Ammonium hydroxide(NH₄OH) with proportion 78:20:2. Collect eluate at 1-2mL/minute. Elution solvent should be prepared fresh daily. To 40mL of isopropanol, add 4mL of concentrated ammonium hydroxide mix and add 156mL of methylene chloride and mix. Evaporate to dryness at <40°C.

Preparing for Analysis - evaporate reconstitute with 100μL ethyl acetate. Mix/vortex vigorously for 30 seconds and Inject 10 μL into chromatograph.

Apparatus GC-MS/MS Analysis

Analysis was carried out on a gas chromatograph Agilent 7000A Quadrupole GC-MS/MS (Agilent,USA) equipped with Gerstel automatic Sampler. GC run conditions - was used the capillary column HP-5MS, 30m × 0.25mm I.D., coated with a 0.25μm film. Ionization was performed in the positive mode (EI+). Acquisition was made in total ion current (TIC) and multiple reactions monitoring (MRM) mode.

The GC conditions were as follows: the column temperature was programmed from 50°C to 305°C with an increase of 10°C/min;

the injection port and the transfer line temperature were 310°C; helium was used as carrier gas at flow rate of 1.0mL/min; split ratio was 5:1. MS conditions - the mass analyzer operated by electron impact (70eV) in TIC and MRM. Quadrupole temperature 150°C. Quantitative analysis was carried out recording ions m/z 326 □ 256, m/z 326 □ 243 and m/z 326 □ 192 for clozapine.

Results and their discussion. Received GC-MS chromatograms and mass spectrum are given on Figs. 2,3.

Method validation

Analytical validation of this method was based on current international EMA (European Medicines Agency) and FDA (Food and Drug Administration) guidelines.

Mass spectrometry: to obtain optimum sensitivity and selectivity, ESI technique operated in the positive ion mode was used for the GC-MS total ion current (TIC) and multiple reaction monitoring (MRM) analysis. For CLZ the most sensitive mass transition was monitored from ions m/z 326 □ 256, m/z 326 □ 243 and m/z 326 □ 192.

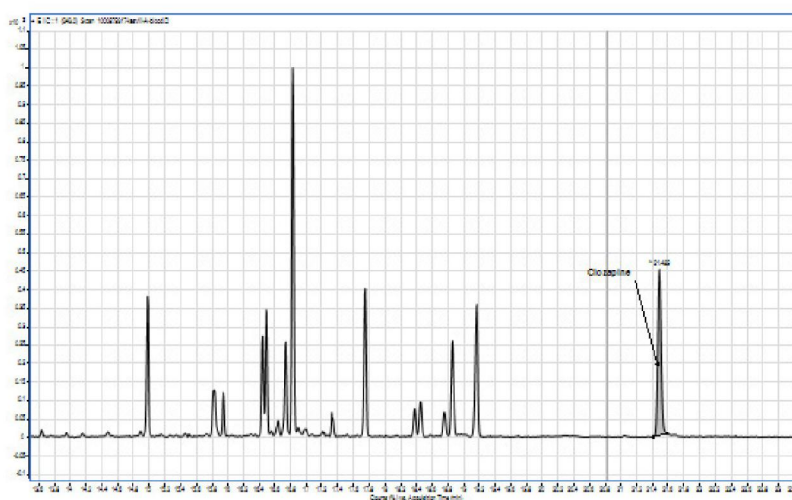


Fig. 2. GC-MS chromatogram of clozapine in blood sample

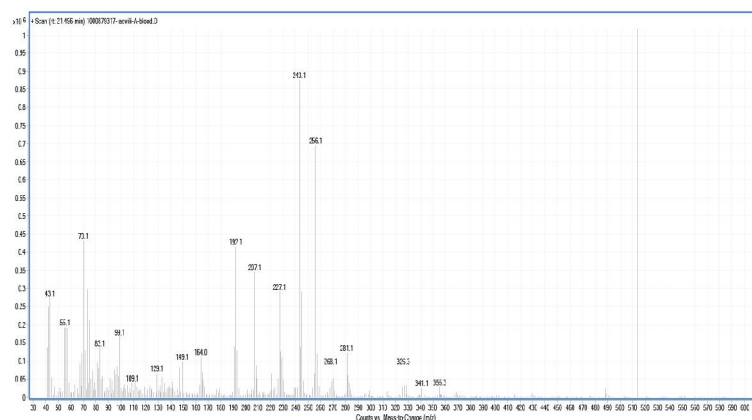


Fig. 3. Mass spectrum of clozapine in blood sample

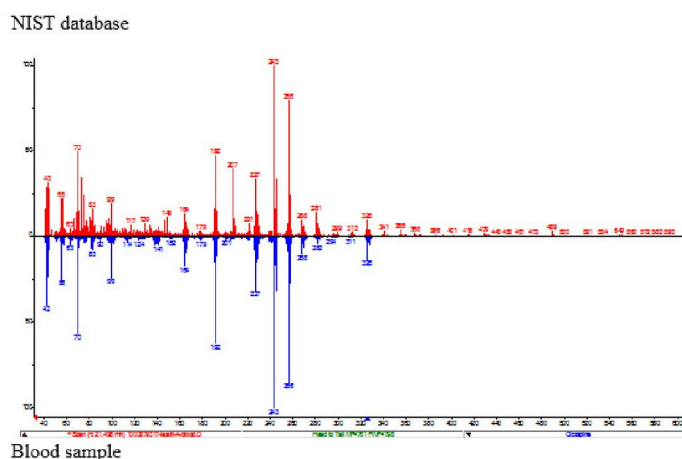


Fig. 4. Comparison of the mass spectrums of clozapine between database (NIST) and in blood sample

Table. Method validation parameters and results

Selectivity	Linearity (R ²)	Accuracy (bias %)		Precision (RSD %)		LOD	LLOQ	Recovery (%)	
		Low	High	Low	High			Low	High
No interference signals	0.9974	-17	-0.3	18	4	5.2ng/mL	8.3ng/mL	94	97

Selectivity was proven by analysis of six sources of blank human blood, processed with one zero sample (blank matrix with internal standard), verifying the absence of signal interferences.

Linearity was selected by analyzing 6 concentration levels, from 5 ng/mL to 1500ng/mL (5, 50, 250, 750, 1000, 1500ng/mL) and each level was evaluated in triplicate according to a linear model. Based on the data it was concluded that the calibration curves used in this method were accurate for the determination of CLZ.

Accuracy and precision were estimated from the analysis of quality control (QC) samples at low (close to lower limit of quantification (LLOQ) and high concentration (1500ng/mL), in six replicates for each level. The acceptance criterion for accuracy (statistical bias) was within $\pm 15\%$ of nominal value ($\pm 20\%$ close to LLOQ), for precision was within $\pm 15\%$ relative standard deviation (RSD) (20% close to LLOQ).

The LOD (Limit of Detection) was determined by analysis of spiked samples with decreasing level of concentration of the analyte.

For LOD a value of signal-to-noise ratio equal to or greater than three was chosen. The LLOQ was determined by analysis of fortified samples with decreasing level of concentration of the analyte. For LLOQ a value of signal-to-noise ratio equal to or greater than ten was chosen. Recovery was calculated by analyzing extracted spiked samples at high and low concentration in relationship with the curve calibration, compared with the control samples.

Validation Results.

The method was validated by investigating the following parameters: selectivity, linearity, accuracy, precision, identification of

LOD and LLOQ and recovery. The results are shown in Table.

Conclusion.

A simple, rapid, selective, sensitive analytical method was developed and validated for the determination of clozapine in human blood, using a solid-phase extraction and quantification by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS/MS).

From the results of the validation parameters given in this paper, we can conclude that the developed method can be useful for determination of clozapine: 1) for forensic investigations such as postmortem cases, violence cases and intoxication, 2) for TDM of schizophrenic patients, for the schizophrenia effective treatment, to improve therapeutic efficacy and minimize drug toxicity.

Acknowledgment. The authors gratefully acknowledge to LEPL Levan Samkharauli National Forensics Bureau, Chemical toxicological laboratory, Tbilisi, Georgia for providing necessary facilities to carry out this work.

REFERENCES

1. Cadeddu G., Deidda A., Stochino M.E., Velluti N, Burrai C., Del Zompo M., Clozapine toxicity due to a multiple drug interaction: a case report // Journal of Medical Case Reports. 2015; 9: 77.
2. Domingues D.S, Pinto M.A.L, de Souza I.D., Hallak J.E.C., de Souza Crippa J.A., Queiroz M.E.C., Determination of Drugs in Plasma Samples by High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for Therapeutic Drug Monitoring of Schizophrenic Patients // Journal Analytical Toxicology 2016; 40(1): 28-36.
3. European Pharmacopoeia 8th Edition. 01/2008:1191, 2014; 1934-1935.

- Freudenreich O., Clozapine drug levels guide dosing // Current Psychiatry 2009; 8(3): 78-79.
- Johansen S, Nielsen M., Simultaneous Determination of 25 Common Pharmaceuticals in Whole Blood Using Ultra-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry // Journal Analytical Toxicology 2012; 36(7): 497-506.
- Ming D.S., Heathcote J., Therapeutic Drug Monitoring of Clozapine and Norclozapine in Human Serum Using Ultra-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry // Journal Analytical Toxicology 2009; 33(4): 198-203.
- Prescribing Information of Clozapine Tablets USP, Sun Pharmaceutical Industries, Inc, 01/2017; 1-41.
- Register of pharmaceutical product. www.pharmacy.moh.gov.ge, 20.07.2017.
- Stark A., Scott J., A review of the use of clozapine levels to guide treatment and determine cause of death // Australian and New Zealand Journal of Psychiatry 2012; 46(9): 816-25, 817-825.

SUMMARY

DEVELOPMENT OF THE GC-MS/MS METHOD FOR QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF CLOZAPINE IN HUMAN BLOOD

¹Sivivadze K., ²Jokhadze M., ²Tushurashvili P.,
¹Murtazashvili T., ¹Imnadze N.

¹Tbilisi State Medical University, Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry;
²Levan Samkharauli National Forensics Bureau, Tbilisi, Georgia

A simple, rapid, selective, sensitive gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS/MS) method was developed and validated for the determination of clozapine in human blood. For isolation was used solid phase extraction. The calibration standards range was 5-1500ng/mL.

Analysis was carried out on a gas chromatograph Agilent 7000A Quadrupole GC-MS/MS. GC run conditions - capillary column HP-5MS, 30m × 0.25mm, coated with a 0.25µm film, column temperature from 50°C to 305°C with an increase of 10°C/min; the injection port and the transfer line temperature were 310°C; carrier gas - helium at flow rate of 1.0 mL/min; Ionization was performed in the positive mode (EI+). Acquisition was made in TIC and MRM mode, electron impact 70Ev. Quantitative analysis

was carried out by recording ions m/z 326□ 256, m/z 326□ 243 and m/z 326□ 192 for clozapine.

The method was validated by investigating the following parameters: selectivity, linearity, accuracy, precision, identification of LOD and LLOQ and recovery.

Method, given in this paper can be useful for determination of clozapine in forensic investigations and for TDM of schizophrenic patients to improve therapeutic efficacy during clozapine treatment.

Keywords: GC-MS/MS, Solid Phase Extraction, Method validation.

РЕЗЮМЕ

РАЗРАБОТКА ГАЗОВОГО ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО (GC-MS/MS) МЕТОДА АНАЛИЗА ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛОЗАПИНА В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

¹Сививадзе К.Г., ²Джохадзе М.С., ²Тушурашвили П.Р., ¹Муртазашвили Т.Ж., ¹Имнадзе Н.Е.

¹Тбилисский государственный медицинский университет, департамент фармацевтической и токсикологической химии;
²Национальное бюро судебной экспертизы им. Л. Самхараули, Тбилиси, Грузия

Разработан и валидирован быстрый, простой, селективный, чувствительный метод газовой хроматографии-масс-спектрометрии (GC-MS/MS) для определения клоzapина в крови человека. Для изолирования использована твердофазная экстракция. Диапазон калибровочных стандартов составил 5-1500 пг/мл.

Анализ проводился газовым хроматографом Agilent 7000A Quadrupole GC-MS/MS. Рабочие условия: капиллярная колонка HP-5MS, 30м x 0,25мм, покрытая оболочкой 0,25 мкм, температура колонки 50°C-305°C, которая увеличивалась на 10°C в минуту, температура инжектора и передатчика 310°C, газовый носитель - гелий, скорость потока 1.0 мл/мин. Ионизация достигалась в положительном режиме (EI +). Сканирование протекло с полного ионного потока и с

мониторингом многоуровневых реакций (MRM), электронный удар 70эВ. Для клоzapина количественный анализ проведен посредством регистрации ионов m/z 326□ 256, m/z 326□ 243 and m/z 326□ 192.

Метод валидирован по следующим параметрам: селективность, повторяемость, линейность, точность, правильность, предел количественного определения (LLOQ), предел обнаружения (LOD).

Метод, описанный в представленной статье, может быть использован для определения клоzapина в крови человека для судебно-медицинских экспертиз и контроля терапевтической дозы у пациентов с шизофренией, лечившихся клоzapином.

რეზიუმე

ადამიანის სისხლში კლოზაპინის თვისობრივი და რაოდენობრივი განსაზღვრის გაზურ ქრომატოგრაფიული – მასსპექტრომეტრული (GC-MS/MS) მეთოდის შემუშავება

¹კ. სივსივაძე, ²მ. ჯოხაძე, ³პ. თუშურაშვილი, ¹თ. მურთაზაშვილი, ¹ნ. იმნაძე

¹თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, ფარმაცევტული და ტოქსიკოლოგიური ქიმიის დეპარტამენტი; ²ლევეან სამხარაულის სახელობის სასამართლო ექსპერტიზის ეროვნული ბიურო, თბილისი, საქართველო

შემუშავებულია და ვალიდირებულია ადამიანის სისხლში კლოზაპინის განსაზღვრის მარტივი, სწრაფი, სელექციური, მგრძობიარე გაზურ ქრომატოგრაფიული - მასსპექტრომეტრული (GC-MS/MS) მეთოდი. იზოლირებისათვის გამოყენებულა მყარფაზური ექსტრაქცია. საკალიბრო სტანდარტების კონცენტრაცია მერყეობდა 5-1500 ნგ/მლ-ს შორის.

ანალიზი ჩატარდა გაზურ ქრომატოგრაფზე Agilent

7000A Quadrupole GC-MS/MS შემდეგი პირობებით: კაპილარული სვეტი HP-5MS, 30მ x 0.25მმ, რომელიც დაფარული იყო 0.25 მკმ გარსით, სვეტის ტემპერატურა - 50 - 305°C, რომელიც იზრდებოდა წუთში 10°C-ით, ინექტორის და გადამცემის ტემპერატურა - 310°C, ჰელიუმის ნაკადის სიჩქარე - 1.0 მლ/წთ. იონიზაცია მიიღწეოდა დადებითი რეჟიმით (EI+). სკანირება მიმდინარეობდა ჯამური იონური ნაკადით (TIC) და მრავალჯერადი რეაქციების მონიტორინგით (MRM), ელექტრონის იმპულსის 70 ევ. კლოზაპინის შემთხვევაში რაოდენობრივი ანალიზი ჩატარდა იონების აღრიცხვის გზით m/z 326 \square 256, m/z 326 \square 243, m/z 326 \square 192.

მეთოდის ვალიდაცია მოხდა შემდეგ პარამეტრებზე: სელექციურობა, განმეორებადობა, სწორხაზოვნება, სიზუსტე, სისწორე, განსაზღვრის მინიმუმი (LOD) და აღმოსაჩენი მინიმუმი (LLOQ).

სტატიაში შემუშავებული მეთოდის გამოყენება შესაძლებელია ადამიანის სისხლში კლოზაპინის განსაზღვრისათვის სასამართლო ექსპერტიზის დროს, ასევე, შიზოფრენიით დაავადებულ პაციენტებში თერაპიული დოზის კონტროლისათვის კლოზაპინით მკურნალობის დროს.

INFLUENCE OF OZONE THERAPY ON ORAL TISSUE IN MODELING OF CHRONIC RECURRENT APHTHOUS STOMATITIS

Kovach I., Kravchenko L., Khotimska Yu., *Nazaryan R., *Gargin V.

State Establishment "Dnipropetrovsk Medical Academy", *Kharkiv National Medical University, Ukraine

The diagnosis and management of the patient with recurrent oral ulceration requires a systematic approach based on the principles of taking an adequate history, clinical examination, investigations as appropriate, institution of management and, finally, review to allow for any necessary modifications of that management [12,16] and creation of new method of treatment. Chronic recurrent aphthous stomatitis (CRAS) belongs to the group of chronic, inflammatory, ulcerative diseases of the oral mucosa. Up to now, the etiopathogenesis of this condition remains unclear; it is, however, considered to be multifactorial [12,14,15].

For today, CRAS is one of the most common types of the inflammatory process in the oral mucosa, with a prevalence of 2% to 10% in Caucasian populations. To treat them properly, physicians should know their clinical appearance and course, conditioning factors, underlying causes, and differential diagnosis [1].

The underlying etiology is not clear, although a number of factors are known to predispose to the occurrence of oral aphthae, including genetic factors, food allergies, local trauma, endocrine disorders, stress, anxiety, smoking cessation, certain chemical products, microbial agents [4,16].

Till now many aspects of chronic recurrent aphthous stomatitis are unexplored and there is a necessity for further experimental investigation to clarify the pathogenesis of this disease for the creation of primary prevention and pathogenetically based treatment of patients with CRAS including their clinical manifestations in the oral cavity [5,9,14].

Various treatment options have been used for healing of the oral tissue in CRAS and other disorders. A range of mouthwash options are used because of the anti-inflammatory, anesthetic, analgesic, antipyretic, and antimicrobial properties. In addition, systemically administered pharmacological agents, such as pentoxifylline, thalidomide, and simvastatin, have been shown to correlate with the development and severity of all the complications reported [3]. Clinical trials have reported that these drugs reduce the frequency and severity of major complications. Despite these treatment options, there is still a need for other cost-effective modalities to prevent disorders of oral cavity [3].

Medical ozone is described as three atom molecules of oxygen known as O₃ and ozone therapy has been proven safe to use in medical treatment because of antimicrobial, disinfectant, and healing properties [7]. In addition, small doses of ozone can ac-

UDC(უკ)61+57(051.2)

ე-92
ფ-413
E-97

ISSN 1512-0392

აკადემიკოს ნინო ჯავახიშვილის სახელობის
სამეცნიერო-პრაქტიკული ჟურნალი

ექსპერიმენტული და კლინიკური მედიცინა

№1

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტის მედიცინის,
სტომატოლოგიის, სოფთაბუღალურ-ფანჯარებისა და ფარმაციის
ფაკულტეტების სადისერტაციო საბჭოების მიერ, ჟურნალი ჩართულია
სამეცნიერო გამოცემების ნუსხაში, სადაც რეკომენდირებულია
სადისერტაციო ნაშრომის ფრაგმენტების გამოქვეყნება

გამოქვეყნებული სტატიების რეფერატები იბეჭდება საქართველოს
ტექნიკური «ქართულ რეფერატულ ჟურნალში»

თბილისი 2017

**კ. სივსივაძე, მ. ჯოხაძე, პ. თუშურაშვილი,
 თ. მურთაზაშვილი, ნ. იმნაძე**
**აღმნიშნის უარდში რისპერიდონის ანალიზის სითხურ
 ქრომატოგრაფიული – მასსპექტრომეტრიული (LC-MS/MS)
 მეთოდის შემუშავება**

¹თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, ფარმაცევტული და ტოქსიკოლოგიური ქიმიის დეპარტამენტი;
²ლ. სამხარაულის სახ. სასამართლო ექსპერტიზის ეროვნული ბიურო, ქიმიურ-ნარკოლოგიური ექსპერტიზის დეპარტამენტი, თბილისი, საქართველო

¹K. SIVSIVADZE, ²M. JOKHADZE, ²P. TUSHURASHVILI, ¹T. MURTAZASHVILI, ¹N. IMNADZE
DEVELOPMENT LC-MS/MS METHODE FOR QUALITATIVE AND
QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE RISPERIDONE IN HUMAN URINE
¹Tbilisi State Medical University, Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry;
²L. Samkharauli National Forensics Bureau, Tbilisi, Georgia

SUMMARY

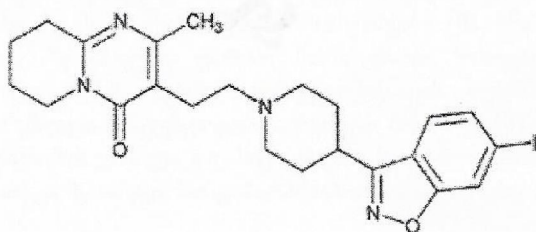
Was developed rapid, selective and effective Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) method for determination of risperidone in human urine, quetiapine fumarate was used as internal standard. For isolation was used solid phase extraction with the cartridge Supelclean LC-18 SPE 500mg. In vitro urine samples were chromatographed on AGILENT TECHNOLOGIES 1290 Infinity AGILENT TECHNOLOGIES 6460 Triple quad LC-MS/MS system. Separation was performed by isocratic elution on Zorbax Eclipse plus C18 (100x4.5 mm, 3.8 μm) column. Determination was performed on a triple-quadrupole mass spectrometer employing electrospray ionization technique (ESI⁺) operating in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The optimized MRM transitions for risperidone were m/z 410 → 191, m/z 410 → 163 and m/z 410 → 110. Calibration curve show a linear relationship in the range of 0.5 to 100 ng/ml.

რისპერიდონი მეორე თაობის (ატიპიური) ანტიფსიქოზური საშუალებებია, მიეკუთვნება ბენზისოქსაზოლის წარმოებულების ქიმიურ ჯგუფს. ატიპიური ანტიფსიქოზური საშუალებები წარმოადგენს პირველი რიგის სამკურნალო საშუალებებს შიზოფრენიის მკურნალობისათვის, რომელთა გამოყენებამ საშუალება მისცა ექიმებს ჰქონოდათ ფართო სპექტრი დააგადების მართვისათვის [5,6].

ღისპერიდონის ქიმიური დასახელება არის 4H-პირიდო [1,2-ა]პირიმიდინ-4-ეროი, 3-[2-[4-(6-ფტორ-1,2-ბენზისოქსაზოლ-3-yl)-1-პიპერიდინილ]ეთილ]-6,7,8,9-ტეტრაჰიდრო-2-მეთილ-4H-პირიდო[1,2-ა]პირიმიდინ-4-ეროი. მისი მოლეკულური ფორმულაა C₂₃H₂₇FN₄O₂, მოლეკულური მასა 410.48. სტრუქტურული ფორმულა მოცემულია სურათზე 1 [9].

რისპერიდონი აშშ-ს საკვებისა და მედიკამენტების ადმინისტრაციამ 1994 წელს დაამტკიცა შიზოფრენიის, ხოლო მოგვიანებით კი ბიპოლარული მანიის სამკურნალოდ [1].

სურათი 1. რისპერიდონის სტრუქტურული ფორმულა



რისპერიდონს ახასიათებს ძალიან მაღალი აფინურობა 5-HT_{2a} რეცეპტორის მიმართ და ზომიერი აფინურობა D₂, H₁ და α₁- და α₂- ადრენერგული რეცეპტორების მიმართ. არსებობს ვარაუდი, რომ პრეპარატის თერაპიული მოქმედება შინოფრენინის დროს შესაძლოა მიღწეულ იქნეს ტიპი 2 დოფამინის (D₂) და ტიპი 2 სეროტონინის (5HT₂) რეცეპტორების ანტაგონიზმით. რისპერიდონის კლინიკური ეფექტი განპირობებულია რისპერიდონისა და მისი მთავარი მეტაბოლიტის, 9-ჰიდროქსირისპერიდონის კომბინირებული კონცენტრაციებით. რისპერიდონი კარგად შეიწოვება. პერორალურად მიღების შემდეგ რისპერიდონის აბსოლუტური ბიოშეღწევადობა შეადგენს 70% - ს (CV=25%). რისპერიდონი სწრაფად ნაწილდება. განაწილების მოცულობა შეადგენს 1-2ლ/კგ-ს. პლაზმაში რისპერიდონი უკავშირდება ცილას და 1-მყოფა გლიკოპროტეინს. რისპერიდონი აქტიურად მეტაბოლიზდება ღვიძლში. მთავარ მეტაბოლურ გზას წარმოადგენს რისპერიდონის 9-ჰიდროქსირისპერიდონად 3-ჰიდროქსილაცია ფერმენტის CYP2D6 მეშვეობით. მეორე ხარისხოვანი მეტაბოლური გზა არის -დეალკილირება. რისპერიდონი და მისი მეტაბოლიტები გამოიყოფიან შარდით და შედარებით ნაკლები მოცულობით ფეკალიებით. მასის ბალანსის კვლევების მიხედვით პერორალური დოზის ხსნარის სახით მიღებისას პირველ კვირას საერთო რადიოაქტიურობა შეადგენდა 84% -ს, აქედან 70% შარდში და 14% ფეკალიებში. რეკომენდირებული დღიური დოზები: მოზრდილები 2მგ-16მგ, მოზარდები 0.5მგ-6მგ [7]. რისპერიდონის ტოქსიური ზემოქმედებასთან დაკავშირებით არსებული ლიტერატურული მონაცემების მიხედვით პაციენტებს განუვითარდათ გონების არევა, ლეტარგია და ნერწყვდენა. სხვა კვლევების მიხედვით აღინიშნა ტაქიკარდია, ცვლილებები ეკგ-ზე, ძლიანობა და ექსტრაპირამიდული სიმპტომები. ინტოქსიკაციით გამოწვეული ჰოსპიტალიზაციის დროს პაციენტების შრატში რისპერიდონის კონცენტრაცია შეადგენდა 1070 მკგ/ლ-ს, ხოლო 48 საათის შემდეგ 74მკგ/ლ [8].

ზემოთ აღნიშნული ფაქტორებიდან გამომდინარე, ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური თვალსაზრისით რისპერიდონი წარმოადგენს საინტერესო თემს, შესაბამისად გამოქვეყნებულია სტატიები სხვადასხვა ბიოლოგიურ მატრიცებში რისპერიდონის თვისობრივი და რაოდენობრივი ანალიზის მეთოდების შემუშავებაზე.

M. De Meulder და თანაავტორების მიერ გამოქვეყნებულია სისხლში და შარდში რისპერიდონის განსაზღვრა სითხური ქრომატოგრაფია-მასსპექტრომეტრიით. იზოლირებისათვის გამოიყენებოდა მყარფაზური ექსტრაქცია, დაყოფა ხდებოდა სითხური ქრომატოგრაფის სეგმენტზე, მოძრავი ფაზის ჰექსანი, იზოპროპანოლი და ეთანოლი გრადიენტული მოწოდებით. დეტექტირება იონ-გაფრქვევითი ტანდემური მასსპექტრომეტრია, დადებითი იონის რეჟიმით [3].

G. Zhang და თანაავტორები განიხილეს პლაზმაში რისპერიდონის სითხე-სითხური ექსტრაქციის მეთოდს, ხოლო ანალიზისათვის გამოიყენებოდა სითხური ქრომატოგრაფია-მასსპექტრომეტრიით (LC/ESI-MS/MS), მოძრავი ფაზა აცეტონიტრილი/ ამონიუმის ფორმატი, სკანირება მიმდინარეობდა მრავალჯერადი რეაქციების მონიტორინგით (MRM) [10].F

S. Foroutana და თანაავტორების მიერ მოწოდებულია პლაზმაში რისპერიდონის განსაზღვრის მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიური მეთოდი, სისტემა აღჭურვილი იყო Nucleosil C8 სვეტით და ულტრაიისფერი დეტექტირებით, მოძრავი ფაზა ნატრიუმის დიჰიდროფოსფატის ბუფერი-აცეტონიტრილი, მიწოდების სინქრე 1.5მლ/წთ, ცილების დალექვა ხდებოდა აცეტონიტრილის ხსნარით, რომელიც შეიცავდა დილითაზემს როგორც შიდა სტანდარტს [4].

შემუშავებული იყო შარდში რისპერიდონის განსაზღვრის მეთოდი; რომელიც წარმოადგენდა სითხვიან ფაზური მიკროექსტრაქციის და მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის კომბინაციას (HF-LPME). რისპერიდონის თვისობრივ-რაოდენობრივი განსაზღვრა ხდებოდა ულტრაიისფერი დეტექტირებით [2].

მიუხედავად რისპერიდონის თვისობრივ-რაოდენობრივი განსაზღვრის მეთოდების ბიბლიოგრაფიული მონაცემების მრავალფეროვნებისა, ინტერესი ამ ნივთიერების მიმართ დღესაც

აქტუალურია; განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია მეთოდების შემუშავება თანამედროვე აპარატურის და გამსწნელთა სისტემების გამოყენებით.

აღნიშნულიდან გამომდინარე მოცემული კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ადამიანის შარდში რისპერიდონის თვისობრივ-რაოდენობრივი განსაზღვრის სწრაფი, ეფექტური, სელექციური სითხურ ქრომატოგრაფიული მასსპექტრომეტრიული (LC-MS/MS) მეთოდის შემუშავება.

მასპერიდონის უფილი. მასალა და მეთოდები. გამოყენებული იყო შემდეგი მასალები და მეთოდები: რეფერენს სტანდარტები რომელიც შექმნილი იყო SIGMA-ALDRICH-ის კატალოგიდან რისპერიდონი (EP), კატალოგის ნომერი R1000600, CAS #106266-06-2; შიდა სტანდარტი (IS) – ქვეტიამინის ფუმარატი, კატალოგის ნომერი Y0001657, CAS #111974-72-2. მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიის თვის განკუ თვ ნი ლი სისუფთავის ორგანული გამსწნელები მოწოდებული იყო Flukada Merck-გან (გერმანია). ანალიზის პროცესში გამოიყენებოდა მილიბორის სისტემაში გაფილტრული წყალი. ადამიანის შარდის ნიმუში აღებული იყო ჯანმრთელი მოხალისესაგან, რომელიც ინახებოდა -20°C ტემპერატურაზე. საანალიზო შარდის მატრიცა ნიმუშების მომზადებაში შემოწმებული იყო იმუნოფერმენტული ანალიზის მეთოდით (ELISA, HumaReader) და მოგვცა უარყოფითი შედეგი ნარკოტიკულ და ფსიქოტროპულ ნივთიერებებზე, როგორც არის ტეტრაჰიდროკანაბინოლი (THC), კოკაინი, მეტადონი, ამფეტამინები, მეტამფეტამინები, ოპიატები, ბუპროპროფინი, ბენზოდიაცეპინები, ბარბიტურატები და ტრიციკლურ ანტიდეპრესანტები.

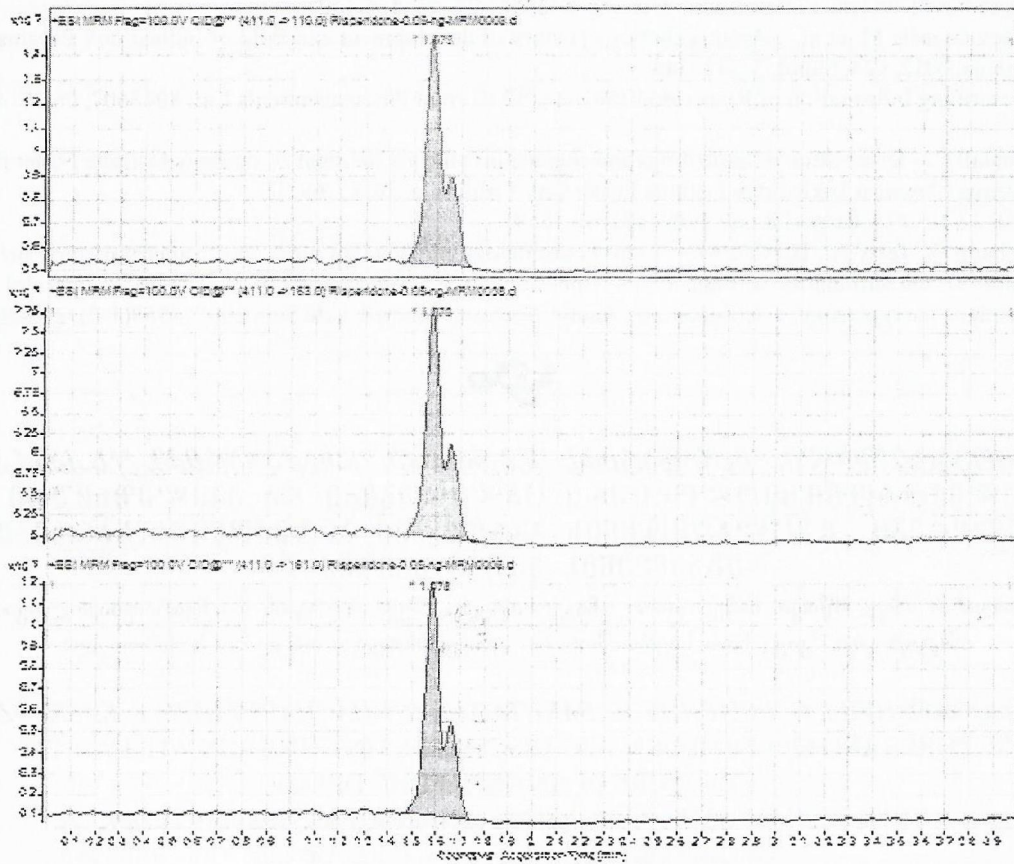
კვლევის მიზნით მომზადებული იყო 100 მგ/მლ კონცენტრაციის დედა ხსნარი მეთა ნოლ ში. ამ ხსნარის განზავებით ხდებოდა სტან დარ ტული ხსნარების მომზადება. საკალიბრო სტანდარტული ხსნარები მზადებოდა შემდეგი კონცენტრაციით: 0.5, 5, 15, 20, 50, 100 ნგ/მლ. შიდა სტანდარტი მზადდებოდა კონცენტრაციით 10ნგ/მლ. ყველა ხსნარი ინახებოდა 4°C ტემპერატურაზე.

შარდის *in vitro* ნიმუშების მოსამზადებლად ობიექტში შეგვყავდა ცნობილი კონცენტრაციის სტანდარტული ხსნარი (1 მგ/ლ). იზოლირებას ვახდენდით მყარფაზური ექსტრაქციის გამოყენებით, კარტრიჯი Supelclean LC-18 SPE 500მგ. ნიმუშის წინასწარი დამუშავება ხდებოდა დეიონიზირებული წყალით და ფოსფატური ბუფერით (pH 6.0). საანალიზო ობიექტის ჰომოგენიზაციის შემდეგ ხდებოდა ცენტრიფუგირება 10 წუთის განმავლობაში სიჩქარით 5000 ბრ/წთ. კარტრიჯის ჩარეცხვა ხდებოდა მეთანოლით, დეიონიზირებული წყლით და ფოსფატური ბუფერით (pH=6.0). საანალიზო ნიმუშის მიწოდება 1მლ/წთ. ელუაციისათვის ვიყენებდით: Dმეთილენ ქლორიდი/იზოპროპილის სპირტი/ამონიუმის ჰიდროქსიდი თანაფარდობით 78:20:2. აორთქლება ხდებოდა არა უმეტეს 40°C ტემპერატურაზე გამომშრალ მდგომარეობაში. ნაშთი გავგხსნით 200მკლ აცეტონტრილი/დეიონიზირებული წყლის ნარევით (1:3) და 10მკლ შევყვანეთ ქრომატოგრაფში.

აპარატურული გაწოდება. კვლევის დროს ვიყენებდით სითხურ ქრომატოგრაფს მასსპექტრომეტრთან ტანდემში (LC-MS-MS) - AGILENT TECHNOLOGIES 1290 Infinity AGILENT TECHNOLOGIES 6460 Triplequad LC/MS, სვეტი - ZorbaxEclipse, სტაციონარული ფაზა - C18 (100x2.1mm, 1.8 μm). ხელსაწყო აგრეთვე აღჭურვილი იყო წი ნა სვეტი - UHPLC GUARD ZorbaxEclipse, სტაციონარული ფაზა - C18(5x2.1mm, 1.8 μm). იონიზაცია მიიღწეოდა დადებითი ელექტრო გაფრქვევით (ESI⁺). შკანირება მიმდინარეობდა მრავალჯერადი რეაქციების მონიტორინგით (MRM).

მეთოდი. რისპერიდონის საანალიზოდ შერჩეული იქნა სისტემა: 0.1% ჭიანჭველმჟავას წყალხსნარი HCOOH (H₂O):0.1% ჭიანჭველმჟავას ხსნარი აცეტონტრილში HCOOH(CH₃CN) – 60:40 (v/v). ანალიზის ხანგრძლივობა იყო 4 წუთი. რეჟიმი იზოკრატიული, მოძ რა ვი ფაზის დინების სიჩქარე 0.5 მლ/წთ, სვეტის ტემპერატურა 40°C . რისპერიდონის ოპტიმალური MRM გადასვლები არის m/z 410→ 191, m/z 410→ 163 და m/z 410→ 110 (სურათი 2).

სურათი 2. რისპერიდონის LC/MS/MS ქრომატოგრამები სხვადასხვა ტრანზაქციების პირობებში



შედეგების განხილვა. ჩატარებული კვლევის შედეგად დადგენილი იქნა, რომ რისპერიდონი იძლევა სიმეტრიულ პეკს შეგავების დროით $\bar{t}=1.57$ წთ კვლევაში მითითებული მეთოდის პირობებში. მეთოდმა აჩვენა სწორხაზოვნება საკალიბრო სტანდარტული ხსნარების ანალიზისას 0.5–100 ნგ/მლ კონცენტრაციის ფარგლებში, კორელაციის კოეფიციენტი $R^2=0.998$. რისპერიდონის განსასაზღვრავი მინიმუმი მოცემულ პირობებში იყო 3.2 ნგ/მლ.

დასკვნა. შემუშავებული იქნა ადამიანის შარდში რისპერიდონის განსაზღვრის სწრაფი, ეფექტური, სელექციური მეთოდი, რომელიც საშუალებას იძლევა დადგენილი იქნას რისპერიდონის მინორული რაოდენობის არსებობა შარდში.

მეთოდი შესაძლებელია გამოყენებული იყოს შარდში რისპერიდონის თვისობრივ-რაოდენობრივი ანალიზისათვის, როგორც სასამართლო-ქიმიური ექსპერტიზისათვის, ასევე მწვავე მოწამვლების დადგენის მიზნით.

ლიტერატურა

- Goff C., Freudenreich O., Henderson C. – Massachusetts general hospital comprehensive clinical psychiatry// Antipsychotic Drugs, 2016, Chapter 42, 577-593.
- Charmahali G. et al. – Determination of trace amounts of risperidone in human urine sample by hollow fiber liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography// Biosciences Biotechnology Research Asia, 2015, #12(1), 539-548.
- De Meulder M. et al. – Validated LC-MS/MS methods for the determination of risperidone and the enantiomers of 9-hydroxyrisperidone in human plasma and urine// J. Chromatogr., Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 2008, #870(1), 8-16.

4. Foroutana S. et al. – Rapid high performance liquid chromatographic determination of risperidone in human plasma// Iranian J. Pharmaceutical Res., 2006, #1, 37-40.
5. Jakovljević M. – New generation vs. first generation, antipsychotics debate: pragmatic clinical trials and practice-based evidence// Psychiatria Danubina, 2009, v21, #4, 446-452.
6. Jašović-Gašić M. et al. – Antipsychotics - History of development and field of indication// Psychiatria Danubina, 2012, v24, Suppl. 3, 342-344
7. Prescribing Information of Risperidon Tablets USP, Torrent Pharmaceuticals Ltd, 8048607, 06.2014, 1-51.
8. Randall C. – Disposition of toxic drugs and chemicals in man//Chemical Toxicology Institute Foster City California Chemical Toxicology Institute Foster City, California, 2011, 769-771.
9. USP 32-NF 27 – Risperidone// 2009, #31(6), 1659.
10. Zhang G., Terry A., Bartlett M. – Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of olanzapine, risperidone, 9-hydroxyrisperidone, clozapine, haloperidol and ziprasidone in rat plasma// J. Chromatogr., Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 2007, #858(1-2), 276-281.



***12. გოგატიშვილი, ნ. გ. ჯაპარიძე, ს. ბახტაძე, ნ. ხაჩაპურიძე, ს. კასრაძე
ელექტროფიზიოლოგიური ცვლილებები და ეპილეფორიული
გულყრები მუცლადყოფნის პერიოდში ანტიეპილეფორული
შეგავლენის მქონე ბავშვებში***

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი, ²ნეფროლოგიის და ნეიროფსიქოლოგიის ინსტიტუტი, ³კავკასიის საერთაშორისო უნივერსიტეტი, თბილისი, საქართველო

*N. GOGATISHVILI, G. JAPARIDZE, S. BAKHTADZE, N. KHACHAPURIDZE, S. KASRADZE
SEIZURES AND EPILEPTIFORM EEG-DISCHARGES IN CHILDREN WITH FOETAL
EXPOSURE OF ANTIEPILEPTIC DRUGS*

*Tbilisi State Medical University; Institute of Neurology and Neuropsychology;
Caucasus International University, Tbilisi, Georgia*

SUMMARY

It is well known that foetal AEDs exposure is associated with an increased risk of congenital malformations, cognitive impairment and autistic spectrum disorders.

The aim of the current study was to assess the effects of foetal AEDs exposure on the seizures and epileptiform EEG discharges in children.

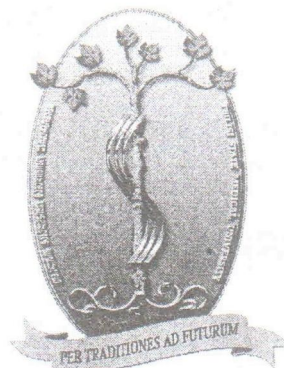
A prospective cohort group of children aged 3-6 years (MD - 4.5 years) with fetal exposure to AEDs from mothers with epilepsy (Case-group) was formed. Age matched individuals without fetal AEDs exposure from healthy women were enrolled as a control group. In all of the 96 children from case (n=47) and control (n=49) groups standard EEG and neurological/epileptological examinations were performed.

Specific epileptiform EEG-discharges and nonspecific EEG abnormalities were observed in 21% of children from case group (10/47); in one child (2%) of control group specific epileptiform EEG discharges (spike and wave discharges), without clinical seizures (1/49) were revealed. Epilepsy was diagnosed in three children (6%) from case group: two of them were siblings with foetal VPA exposure and focal epilepsies were diagnosed in the both of them. In the remaining one child of the mother with reflex epilepsy and foetal VPA-exposure, reflex epilepsy was diagnosed.

Epileptiform EEG discharges are tenfold and the seizures are three times as often found in children with fetal AEDs exposure from mothers with epilepsy than in their healthy peers from healthy mothers. These effects may be due to epilepsy itself or foetal AEDs exposure may play some role that needs further research.

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი

TBILISI STATE MEDICAL UNIVERSITY



სამეცნიერო შრომათა კრებული

COLLECTION OF SCIENTIFIC WORKS

XLVIII

თბილისი 2014 TBILISI

10. Рами И. Н. соавт. «2000 болезней», Москва, 2000.

11. გრიგოლია ნოდარ, «ქირურგიული დაავადებები», თბილისი, 2011 წ.

12. «ჯანთელობის დაცვა». საქართველო, 2010 წ. სტატისტიკური ცნობარი, საქართველოს ჯანდაცვის სამინისტრო, თბილისი, 2010 წ.

Ivanishvili T., Tatanashvili D., Shapatava K., Abuladze T., Makhashvili D.

THE ROLE OF ULTRASONOGRAPHY DIAGNOSIS OF ACUTE APPENDICITIS

TSMU, DEPARTMENT OF SURGERY; DIAGNOSTIC CENTRE „INTERCLINIK „

Nowadays acute appendicitis is an actual moot point of surgery. Every year 10% of population get sick of this pathology. In case of delay in treatment the quantity is 0,2-0,3 %.

Since 2010 there has been made 7890 appendectomy in Georgia (mortality 0,01).The desired result, in our opinion, successes in acute appendicitis diagnostics – as ultrasonography necessarily engaging, which is quicker, limited research, low price method of treatment.

Ultrasound examination result means the next visit to CT and MRI researches.

Imnadze N., Sivsivadze K., Murtazashvili T., Jokhadze M., Tushurashvili P.

DETERMINATION OF SOME ANTIPSYCHOTIC DRUGS IN HUMAN PLASMA BY LIQUID CHROMATOGRAPHY – TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC/MS/MS)

TSMU, DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL AND TOXICOLOGICAL CHEMISTRY; LEVAN SAMKHARAULI NATIONAL FORENSICS BUREAU

INTRODUCTION - Development of the rapid, sensitive and selective methods of determination of various subjects of intoxication is the main goal of the Toxicological chemistry and Forensic medicine.

Olanzapine and Risperidone are antipsychotic drugs used to treat schizophrenia and related disorders (Fig. 1 a and b). They have a lower incidence of treatment-emergent extrapyramidal symptoms and greater decrease in total psychopathology relative to haloperidol and a more favorable safety profile [1]. In similar to the world experience, these two products are having a high frequency prescription, among antipsychotics in Georgia. Not singular the cases when the products are prescribed simultaneously and patient use it

without respective precaution [2,3] and outcome of such administration could be toxic [4].

Several analytical methods for the determination of olanzapine and risperidone in human fluids are published [5,6]. In these reports, the use of gas chromatography coupled to nitrogen phosphorus detection (GC-NPD) has been described [7]. However, in most reports high-performance liquid chromatography (HPLC) has been used in conjunction with UV, fluorescence, or electrochemical detection with use of derivatization step to increase fluorescence capacity [8-10]. Recently, liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) has proven to be a powerful tool for determining drug concentrations in biological matrices and several LC-tandem MS methods for the determination of olanzapine and risperidone in plasma, serum, cerebrospinal fluids, blood or brain tissues have previously been published [11-14]. The objective of the present study was to develop the selective and sensitive method of analysis on simultaneous determination of olanzapine and risperidone in human plasma. The presented assay is the modified version of an LC-MS-MS assay used to determine olanzapine in whole blood [15]. As internal standard was applied the quetiapine (IS).

EXPERIMENTAL - Chemicals and materials - Chemicals and materials (suppliers) were as follows: standards of olanzapine, risperidone and quetiapine (IS) were purchased by SIGMA-ALDRICH. HPLC grade solvents: acetonitrile and formic acid from MERCK, deionised water for LC/MS/MS was received on HYJD-III-D. Solid-phase extraction cartridges - Bond Elut[®]LRC cartridges from VARIAN Inc.

Blank human plasma was provided by Blood Institute, Georgia and kept on -20°C. All samples were negative for substances of abuse like THCA, benzoylcegonine, methadone, amphetamines including MDMA, opiates, and benzodiazepines with immunoassays and for buprenorphine and norbuprenorphine with ELISA (HumaLyzer 3000).

LC/MS/MS conditions - The LC system was AGILENT TECHNOLOGIES 1290 Infinity AGILENT TECHNOLOGIES 6460 Triple quad LC/MS. Separation was performed by isocratic elution on Zorbax Eclipse plus C18 (100*2.1 mm, 1.8µm) column, equipped with pre-column: UHPLC GUARD Zorbax Eclipse plus C18 (5*2.1 mm, 1.8µm), with a mobile phase consisting of 0.1% water solution of formic acid (H₂O):0.1% acetonitrile solution of formic acid = 60 : 40 (v/v). Ionization and detection of analyte and IS was performed on an AGILENT TECHNOLOGIES 6460 triple quadrupole mass spectrometer equipped with Turbo Ionsprays operating in the positive ion mode. Quantitation was performed using electro spray ionization technique (ESI⁺) operating in multiple reaction monitoring (MRM) of the protonated precursors or to production transitions at *m/z* 313 @ 256, *m/z* 313 @ 157 and *m/z* 313 @ 84 for OLZ 411 @ 206, 411 @ 191 and 411 @ 110 for RIP as the quantitative and confirmative traces, respectively (Fig. 2). Total chromatographic run time was 6 min.

Standard curves - An OLZ and RIP stock solution (1.0 mg/mL) in methanol was diluted with methanol to produce an intermediate stock solution (500 ng/mL). This was further diluted to prepare standard and (independently) QC solutions. An IS stock solution (100 mg/mL) was also prepared in methanol and diluted to give an IS working solution (10.0 ng/mL). All solutions were stored at 4°C when not in use. OLZ and RIP calibration standards (CS-1 to CS-10, 0.10, 0.15, 0.20, 0.50, 1.50, 3.00, 10.0, 25.0, 40.0 and 50.0 ng/mL) (n=5). All samples were stored at -20°C pending analysis.

Extraction procedure

In vitro blood sample extraction was carried out by solid-

- phase extraction with following steps procedure:
- Homogenization of 190 ml Plasma+10 ml methanol+50ml (50ng/mL) QC solution and IS;
 - Homogenization with phosphate buffer (100mM) to pH 6;
 - Centrifugation 10 min with 2000 rpm;
 - Supernatant transfer to conditioned cleanup SPE tube;
 - Cartragewash: 3 mL DI Water/ 1% acetic acid/MeOH;
 - Elute : ethyl acetate: acetonitrile: ammonia (78:20:2 v/v);
 - Evaporation of eluate under a gentle stream of nitrogen < 40°C;
 - Injection of 5 mL of reconstituted in 100 mL samples were injected in LC/MS/MS.

RESULTS AND DISCUSSION- LC-MS/MS method of determination of olanzapine and risperidone in human plasma simultaneously is successfully developed. The Representative chromatograms of the study subjects and IS are shown on Figure 3. The described condition causes good resolution, without extensive peaks tailing, with retention time -0.717 min (OLZ) 0.783 min (RIP) and 0.881 min (IS) respectively.

A 10-point linear calibration curves showed a R^2 value of 0.9971 for OLZ and 0.9958 for RIP (Fig.3). The assay is linear in the range 0.15-40.0 ng/mL for OLZ and 0.20-50.0 ng/mL for RIP. Lower limit of quantitation and limit of detection are 0.10 and 0.015 ng/mL for OLZ and 0.20 and 0.025ng/mL for RIP.

CONCLUSION - Developed a selective and sensitive method for the simultaneous determination of olanzapine (OLZ) and risperidone (RIP) in human plasma, based on liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The method was subsequently applied to *in vitro* plasma samples. The developed method gives the opportunity of rapid and simultaneous determination of olanzapine and risperidone of forensic investigation of the intoxication or postmortem cases.

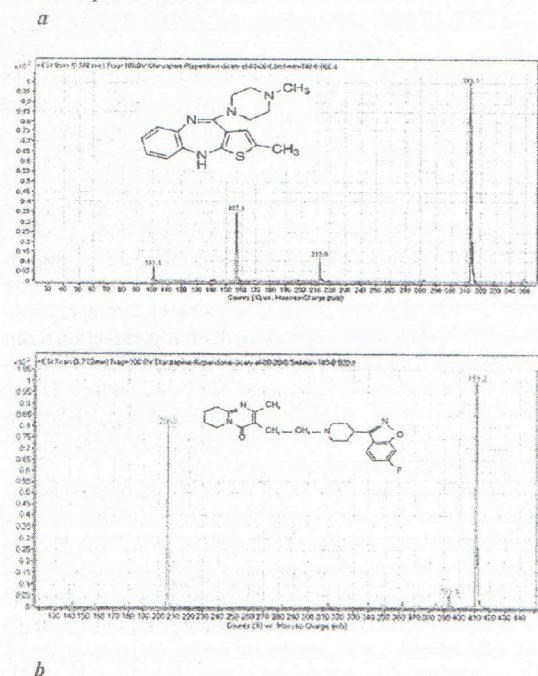


Fig. 1. Product ion mass spectra of Olanzapine (a) and Risperidone(b) in positive ionization mode

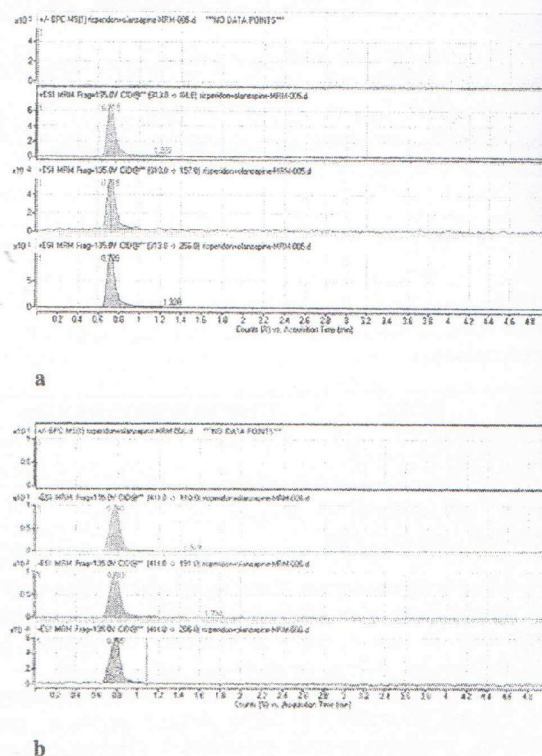
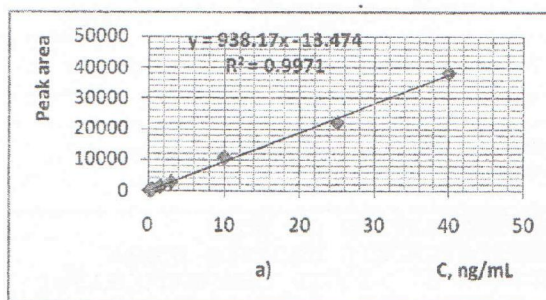
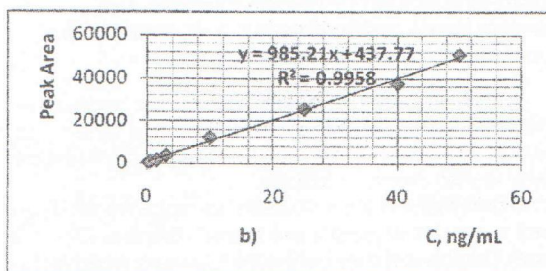


Fig. 2. MS/MS transitions for Olanzapine (a) and Risperidone(b)



a



b

Fig. 3. Calibration standards curve for Olanzapine (a) and Risperidone(b)

References:

- Purdon SE1, Jones BD, Stip E, Labelle A, Addington D, David SR, Breier A, Tollefson GD. Neuropsychological change in early phase schizophrenia during 12 months of treatment with olanzapine, risperidone, or haloperidol. The Canadian Collaborative Group for research in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 2000 Mar;57(3):249-58.
- Medicinal Product Statistic in Denmark 2003-2007. <http://www.laegemiddels-tyrrelsen.dk/db/filarkiv/6686/Kapitel1.pdf>, September 2008.
- W. J. Broekema, I. W. de Groot, and P. N. van Harten. Simultaneous prescribing of atypical antipsychotics, conventional antipsychotics and anticholinergics - a European study. *Pharm World Sci*. Jun 2007; 29(3):126-130.
- M.D. Robertson and M.M. McMullin. Olanzapine concentrations in clinical serum and postmortem blood specimens—when does therapeutic become toxic? *J. Forensic Sci*. 45: 418–421(2000).
- M.A. Saracino, O. Gandolfi, R. Dall’Olio, L. Albers, E. Kenndler, and M.A. Raggi. Determination of Olanzapine in rat brain using liquid chromatography with coulometric detection and a rapid solid-phase extraction procedure. *J. Chromatogr. A* 1122: 21–27(2006).
- R.V.S. Nirogi, V.N. Kandikere, M. Shukla, K. Mudigonda, S. Maurya, R. Boosi, and A. Yeffamilli. Development and validation of a sensitive liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry assay for the quantification of olanzapine in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41: 935–942 (2006).
- S. Ulrich. Assay of olanzapine in human plasma by a rapid and sensitive gas chromatography–nitrogen phosphorus selective detection (GC–NPD) method: validation and comparison with high performance liquid chromatography–coulometric detection. *Ther. Drug Monit.* 27: 463–468 (2005).
- G. Zhang, A.V. Terry, and M.G. Bartlett. Sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of olanzapine, risperidone, 9-hydroxy-risperidone, clozapine, haloperidol and ziprasidone in rat brain tissue. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 858: 276–281 (2007).
- A. Pathak and S.J. Rajput*. Development of a Stability-Indicating HPLC Method for Simultaneous Determination of Olanzapine and Fluoxetine in Combined Dosage Forms. *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 47, August 2009
- Zarna R. Dedania,¹ Ronak R. Dedania,¹ Navin R. Sheth,² Jigar B. Patel,³ and Bhavna Patel⁴. Stability Indicating HPLC Determination of Risperidone in Bulk Drug and Pharmaceutical Formulations. *International Journal of Analytical Chemistry* Volume 2011 (2011).
- ZHANG Meng-qi¹, Jing-ying¹, LU Chuan¹, LIU Gang-yi¹ et al. Development and validation of a liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry for determination of olanzapine in human plasma and its application to bioavailability study. *Acta Pharmaceutica Sinica* 2010, 45 (6): 767-771;
- Martin Josefsson, Markus Romana, Elisabeth Skogh, Marja-Liisa Dahld, Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of olanzapine and N-desmethylolanzapine in human serum and cerebrospinal fluid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 53 (2010) 576–582.
- De Meulder M1, Remmerie BM, de Vries R, Sips LL, Boom S, Hooijschuur EW, van de Merbel NC, Timmerman PM. Validated LC-MS/MS methods for the determination of risperidone and the enantiomers of 9-hydroxyrisperidone in human plasma and urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2008 Jul 1; 870(1):8-16. doi: 10.1016/j.jchromb.2008.04.041. Epub 2008 May 8.
- Maxime Culot, Anaëlle Fabulas - da Costa, Emmanuel Sevin, Erica Szorath, Stefan Martinsson, Mila Renfel, Yan Hongmei, Romeo Cecchelli, Stefan Lundquist. A Simple Method for Assessing Free Brain/Free Plasma Ratios Using an In Vitro Model of the Blood Brain Barrier. December 03, 2013. DOI: 10.1371/journal.plos one. 0080634
- Murtazashvili T.a, Johhadze M.b, Makharadze R.a, Sivsivadze K.a, Imnadze N.a*, Tushurashvili P.b. Determination of Olanzapine in Whole Blood Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS). Materials of II International Scientific Conference. Tbilisi. 2-4 May, 2014.

იმნაძე ნ., სიგისვიძე კ., მურთაზაშვილი თ., ჯოსხაძე მ., თუშურაშვილი პ.

აღმნიშნის პლაზმის სითხურ ქრომატოგრაფიული - მას სპექტრომეტრიული (LC/MS/MS) მეთოდით ზოგიერთი ანტი-ფსიქოტრიკული - ფსიქოტრიკული პრეპარატის განსაზღვრა

თსსუ, ფარმაცევტული და ტოქსიკოლოგიური ქიმიის დეპარტამენტი; სსიპ "ლევან სამხარაულის" სასამართლო ექსპერტიზის ეროვნული ცენტრი

ზოგიერთი ანტიფსიქოტრიკული პრეპარატის, კერძოდ, ოლანაპინის (OLZ) და რისპერიდონის (RIP) აღმნიშნის პლაზმის ერთდროული განსაზღვრის მიზნით შემუშავებულია მგრძობიარე და სელექციური სითხურ ქრომატოგრაფიული — მას სპექტრომეტრიული (LC/MS/MS) მეთოდი. საანალიზო ობიექტების და ქვეტიპინის (შიდასტანდარტი) ექსტრაქცია ხდებოდა 200 მლ პლაზმიდან მყარ ფაზური ექსტრაქციით კარტრიჯზე Bond Elut[®] LRC (VARIAN INC.).

სითხური ქრომატოგრაფიის სისტემა არის AGILENT TECHNOLOGIES 1290 Infinity AGILENT TECHNOLOGIES 6460 Triple quad LC/MS. ქრომატოგრაფიული დაყოფა ხდებოდა Zorbax Eclipse plus C18 (100x2.1 მმ, 1.8 მკმ) სვეტზე, რომელიც აღჭურვილი იყო ნინას-ვეტი: UHPLC GUARD Zorbax Eclipse plus C18 (5x2.1 მმ, 1.8 მკმ). მოძრავი ფაზა: 0.1% ჭიანჭველმჟავას ხსნარი წყალში: 0.1% ჭიანჭველმჟავას ხსნარი აცეტონიტრილში (60:40) (მოც/მოც), დინების სიჩქარე — 0.6 მლ/წთ, სვეტის ტემპერატურა — 40°C. მოცემული პირობების საშუალებას იძლევა მივიღოთ პრეპარატების სიმეტრიული პიკი შესაბამისი შეკავების დროით 0.717 წთ (OLZ) და 0.783 წთ (RIP).

მას-სპექტრომეტრიული განსაზღვრა მოიცავს იონიზაციას ელექტროგაფრქვევით, დადებითი იონის ტიპის მიხედვით, რეაქციების მრავალჯერადი მონიტორინგით, შემდეგი გადასვლებით მ/ზ 313/256 (OLZ)-თვის და მ/ზ 411/206 (RIP)-თვის, როგორც თვით-

სობრივი ისე რაოდენობრივი ანალიზისთვის.

შემუშავებული მეთოდი აპრობირებულია *in vitro* პლაზმის მოდელში. საკალიბრო გრაფიკი სნორხაზოვანია ფარგლებში 0.20—40.0 ნგ/მლ (OLZ) და 0.30-50ნგ/მლ (RIP). შემუშავებული მეთოდი საშუალებას იძლევა დავადგინოთ აღნიშნული ანტიფსიქოზური საშუალებების არსებობა და როდენობრივი შემცველობა მწვავე მონამვლებისა და სასიკვდილო შემთხვევების დროს.

კანდელაკი ე., ყავლაშვილი ნ., ხერხეულიძე მ., ჩხაიძე ი.

ნატივი მოტორული უნარების შეფასება DENVER II — ის ტესტის და PEDS — ის (მშობლის ჩივილის გამოვლენის კითხვარი) საშუალებით

თსსუ, პედიატრიის დეპარტამენტი, ზოგადი პედიატრიის დეპარტამენტი

ადრეული ასაკის ბავშვის განვითარების შეფასება პირველადი ჯანდაცვის მნიშვნელოვანი ფუნქციაა. მრავალი წელია მიმდინარეობს სამეცნიერო მუშაობა ვალიდური და სენსიტიური სკრინინგული ინსტრუმენტების შესარჩევად. DENVER II — ის ტესტი განვითარებულ ქვეყნებში უკვე მრავალი წელია გამოიყენება პირველადი ჯანდაცვის მიერ, როგორც ბავშვის განვითარების სკრინინგული ინსტრუმენტი. დღეისათვის საკმაოდ ბევრი მასალა დაგროვდა, რომელიც ადასტურებს ამ ტესტის მნიშვნელობას ადრეული ასაკის ბავშვების განვითარების შეფასე-

ბისას. ტესტის მიხედვით შესაძლებელია დადგინდეს კონკრეტული ასაკის ბავშვთა რამდენი პროცენტი ასრულებს განსაზღვრულ ნიშანსვეტს. DENVER II ტესტი აფასებს 4 კომბინირებულ სფეროს: პერსონალურ-სოციალური, ნატივ მოტორული-ადაპტური, მეტყველება/ენა და უხეში მოტორიკა [1,2,3,5].

ამერიკის პედიატრიის აკადემიის მიერ რეკომენდებულია კიდევ ერთი სკრინინგული ინსტრუმენტი PEDS — მშობლის ჩივილის გამოვლენის კითხვარი, რომელიც უფრო მაღალი სენსიტიურობითა და სპეციფიკურობით გამოირჩევა DENVER II — თან შედარებით^[5]. მიჩნეულია, რომ მშობლის ჩივილის გამოვლენა ძალზე დიდი ინფორმაციის მატარებელია და, ზოგ შემთხვევაში, განვითარების შეფერხებების იდენტიფიცირებისას უშუალო, ერთმომენტური და-კვირვებაზე უფრო უკეთესი შედეგების მომტანია (ცხრილი 1).

პირველადი ჯანდაცვისთვის მარტივი, ხელმისაწვდომი სკრინინგული ინსტრუმენტის მიწოდება ძალზე მნიშვნელოვანი საკითხია, ამიტომ სკრინინგული ინსტრუმენტების შერჩევა და ადაპტაცია საქართველოს ბავშვთა პოპულაციისთვის მნიშვნელოვან საკითხად გვესახება. განვითარება ინდივიდუალური, უნიკალური გზით ხორციელდება ყველა ბავშვთან და შეფასებისას დროის სიმცირე, ინფორმაციის და სამეცნიერო მტკიცებულებების სიმცირე აღნიშნულ საკითხებთან დაკავშირებით არის ის ძირითადი მიზეზი, რის გამოც სშირად ექიმებს უჭირთ ბავშვის განვითარებასთან დაკავშირებული პრობლემების გამოვლენა და სწორი მართვა. ამავე დროს, საყოველთაოდ მიღებული და დამტკიცებულია, რომ განვითარების პრობლემების ადრეული გამ-

PEDS და DENVER II მახასიათებლები

ცხრილი 1

მახასიათებლები	PEDS	DENVER II
სკრინინგის სახეობა	მშობლის ჩივილის გამოვლენა	უშუალო დაკვირვება ბავშვზე, მშობლის გამოკითხვა
ფორმატი	10 კითხვა, 9 ტიპის ჩივილი ქვესფეროების მიხედვით	4 კომბინირებული ქვესფერო, 125 შესაფასებელი ნიშანსვეტი.
სენსიტიურობა	74-79%	56-83%
სპეციფიურობა	70-80%	43-80%
ნიშანსვეტის მაგალითი	გაქვთ თუ არა ჩივილი თქვენი შვილის მიერ თითების მოძრაობასთან დაკავშირებით?	“ დახატე ადამიანი”
დრო	მშობელი – 5-7 წთ. პროვაიდერი – 10-15 წთ.	პროვაიდერი – 15-20 წთ.
შეფასების მოდელი	მაგ. მიმართულება A ან B და ინტერვენციების შემდგომი განსაზღვრა	შესაძლებელია როგორც ჩამორჩენის ასევე წინსწრების დადგენა. 25% ზე ნაკლები მონაცემის მიღებისას აუცილებელია ხელახალი სკრინინგი და რეფერალი დრმა შეფასებისათვის
ვალიდაცია საქართველოში	მიმდინარეობს	მიმდინარეობს

თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტი
TBILISI STATE MEDICAL UNIVERSITY



სამეცნიერო შრომათა კრებული

COLLECTION OF SCIENTIFIC WORKS

XLVII

თბილისი 2013 TBILISI

დეს ფიზიკური ვარჯიშის, როგორც დაავადებათა მართვის მნიშვნელოვანი მეთოდის განვითარებას.

იბადება კითხვა, როგორ უნდა დაინერგოს ფიზიკური ვარჯიში ფართო საზოგადოებაში, რომ იგი წარმატებული და ხარჯ-ეფექტური იყოს. არსებობს ორი შესაძლო გზა: პირველი — ჯანმრთელობის დაცვის ეროვნული სისტემის მიერ უნდა შემუშავდეს სისტემა იმ პროფესიონალების ანაზღაურების უზრუნველსაყოფად, რომლებიც შეიმუშავენ და განახორციელებენ ფიზიკური ვარჯიშის პროგრამებს; ამ მიდგომის უარყოფითი მხარეა საზოგადოებრივი ჯანდაცვის ხარჯების გაზრდა მოკლევადიანი პერსპექტივით, თუმცა უნდა აღინიშნოს, რომ საბოლოო გრძელვადიან პერსპექტივაში დადებითი ეკონომიკური ბალანსი მოიაზრება. მეორე მიდგომით, უკვე არსებულ (როგორც კერძო, ასევე სახელმწიფო) ფიტნეს ცენტრებს უნდა მიენიჭოს სამედიცინო ფიტნეს ცენტრების სტატუსი, სადაც ორგანიზებულიად განხორციელება ვარჯიშის პროგრამები ჯანმრთელობის შენარჩუნების და კონკრეტული დაავადებების მკურნალობის მიზნით [11]. ამ მიდგომის უპირატესობაა ის, რომ არ მოითხოვს სახელმწიფოს მიერ დაფინანსებას.

ლიტერატურა:

1. Herman WH, Hoerger TJ, Brandle M et al. The cost-effectiveness of lifestyle modification or metformin in preventing type 2 diabetes in adults with impaired glucose tolerance. *Ann Intern Med*, 142 (2005).
2. Ginsberg GM, Viskoper RJ, Oren S et al Resource savings from non-pharmacological control of hypertension. *J Hum Hypertens*, 4 (1990).
3. Buttar HS, LI T, Ravi N. Prevention of cardiovascular diseases: Role of Exercise, dietary interventions, obesity and smoking cessation. *Exp Clin Cardio*, 10 (2005)
4. Thune I, Brunn T, Lund E, Gaard M. Physical activity and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*, 336 (1997)
5. Venugopalan G. Breast cancer cells growing in 3-D matrix revert to normal. *American Society for Cell Biology*. 17 Dec. 2012
6. Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ et al. Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev*, 17 (2011)
7. Burzava JK, Schmeler KM, Soliman PT et al. Prospective evaluation of insulin resistance among endometrial cancer patients. *Am J Obstet Gynecol*, 204 (2011)
8. Wolin KY, Yan Y, Colditz GA. Physical activity and risk of colon adenoma: a meta-analysis. *Br J Cancer*, 104 (2011)
9. Luzi L, Codella R. Immunomodulatory effects of exercise in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes*, 60 (Suppl 1) (2011)
10. Bacon CG, Mittleman MA, Kawachi I et al. Sexual function in men older than 50 years of age: results from the health professionals follow-up study. *Ann intern med*, 139 (2003)
11. Giulio F. *Medical Wellness. Il nuovo Club*. Ed Il Campo Bologna, Vol 22, n. 124 (2011)

ROLE OF PHYSICAL EXERCISE IN PREVENTION OF DISEASES: NEW PROSPECTS

TSMU, DIVISION OF MEDICAL REHABILITATION AND SPORTS MEDICINE, DEPARTMENT OF CLINICAL SCIENCES

Considering world economical crisis, use of low-cost preventive interventions, such as physical activity becomes necessary. Inclusion of physical activity in everyday lifestyle decreases pharmaceutical and overall costs of public health care system.

During recent years, number of scientific works has described potential of regular physical exercise in prevention of several types of malignant tumors, along with cardiovascular and metabolic disorders, which have been traditionally viewed as targets for physical activity programs. For example, physical exercise can have a preventive role in development of breast cancer, by means of influencing its hormonal and metabolic mechanisms, as well as in development of colon cancer. Physical exercise decreases insulin resistance, which supposedly is a connecting link in pathogenesis of many malignant tumors, including endometrial cancer. According to newest investigations, preventive effect of physical exercise concerns auto-immune diseases as well, such as diabetes type 1.

Therefore, national governments should pay great attention to development of physical activity programs, as an important method of diseases treatment and prevention.

სივსივაძე კ. ა*, მურთაზაშვილი თ. ა, ჯოხაძე მ. ა, მახარაძე რ. ა, იმნაძე ნ. ა

**მეორე თაობის ჯოჯიკი
ანტიფსიქოზური საშუალების ეფექტურობის
ტოქსიკოლოგიური ანალიზის მეთოდების
მიმოხილვა**

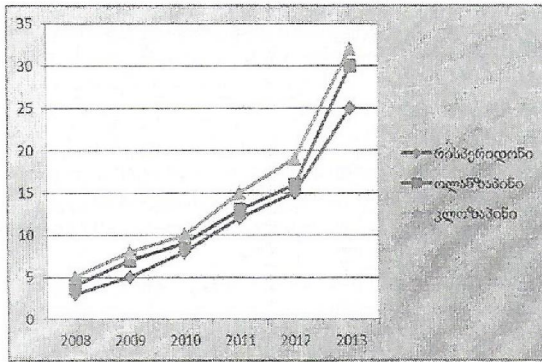
* თსსუ, ფარმაცევტული და ტოქსიკოლოგიური ეფექტის დაპარტამენტი; * თსსუ, ფარმაცევტული და ზოტანიკის დაპარტამენტი

შესავალი - შიზოფრენია წარმოადგენს ძირითად ფსიქიატრიულ დაავადებას, რომელსაც ახასიათებს აზროვნებისა და აღქმის ძირეული დარღვევები, შეუსაბამო ემოციური რეაგირებითა და/ან ემოციური სფეროს გასადავებით. დღეისათვის დაავადებული პაციენტების რაოდენობა შეადგენს მოსახლეობის 1%-ს. დაავადების აქტუალობაზე და პრობლემატიკაზე მიუთითებს დაავადების გავრცელების ზრდის სტატისტიკა სხვადასხვა ქვეყნებში [11].

უკანასკნელ წლებში საქართველოს ფარმაცევტულ ბაზარზე არსებულ ანტიფსიქოზურ საშუალებებს დაემატა მრავალი ახალი ფორმულისა და მოქმედების მქონე, როგორც უცხოური, ასევე სამამულო წარმოების პრეპარატი. ბოლო ათწლეულში

მთელ მსოფლიოში მნიშვნელოვნად გაიზარდა ამ სა-
შუალებების სამედიცინო და არასამედიცინო მომხ-
მარებლების რიცხვი, შესაბამისად, იმატა ანტიფ-
სიქოზური საშუალებებით გამოწვეული მონამელებ-
ის რაოდენობამ[15].

ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური თვალსაზრისით, გან-
საკუთრებულ ინტერესს იწვევს მეორე თაობის ანტი-
ფსიქოზური საშუალებები, კერძოდ - რისპერიდონი,
ოლანაპინი და კლოზაპინი, რომლებიც, ასევე,
ცნობილია ატიპური ანტიფსიქოზური პრეპარატებ-
ის სახელწოდებით. ისინი შეტანილია შიზოფრენიის და
სხვა ფსიქოზური აშლილობების კლინიკური მდგომარ-
ეობის მართვის სახელმწიფო სტანდარტში, ასევე საერ-
თაშორისო გაიდლაინებში და, შესაბამისად, აქტიურად
ინიშნება მსოფლიოს და, მათ შორის, საქართველოს
კლინიკებში აღნიშნული დაავადების სხვადასხვა სტა-
დიის სამკურნალოდ[2,4]. ამის ფონზე, გაზრდილია
მოცემული პრეპარატების საქართველოში რეგისტრაციის და
იმპორტის მაჩვენებლები (ნახ. №1)[1].



ნახ. №1 — საქართველოში რისპერიდონის, ოლანაპინის, კლოზაპინის რეგისტრაციის სტატისტიკა

საყურადღებოა ის ფაქტიც, რომ ბოლო წლებში,
პოპულარულია „ანტიფსიქოზური პოლიფარმაციის“
გამოყენება შიზოფრენიის უკეთესი მართვისათვის.
ეს, თავის მხრივ, აღნიშნული პრეპარატების კომბი-
ნაციაში ხშირად გამოყენების საწინდარია და მნიშ-
ვნელოვნად ზრდის ინტოქსიკაციის ალბათობას[5].

კვლევის ობიექტები და მიზანი - სტატიაში განხილულია ბენზოპრაზოლის ნარმოებული ატიპური ანტიფსიქოზური საშუალების რისპერიდონის, თიენობენზოდიანზეპინის ჯგუფის ანტიფსიქოზური (ნეიროლეფსიური) საშუალების ოლანაპინის და ტრიციკლურ დიბენზოდიანზეპინი კლოზაპინის ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზის მეთოდები.

ანალიზის მეთოდები - რისპერიდონის, ოლანაპინის და კლოზაპინის თვისობრივი და რაოდენობრივი ანალიზის მეთოდებზე მრავალი ქვეყნის მეცნიერი მუშაობს როგორც პრეპარატებში, ასევე ბიოლოგიურ მასალაში. კვლევის საგანს წარმოადგენს ანალიზის შესაბამისი პირობების შერჩევა მოცემული პრეპარატების ინდივიდუალური და/ან სხვა ნივთიერებებთან ერთდროული განსაზღვრის მიზნით. კვლევების ძირითადი მიმართულებაა გამხსნელთა სისტემის, ექსტრაქციების და ანალიზისთვის

საჭირო სხვა პარამეტრების ოპტიმიზაცია.

მრავალფეროვანია ბიბლიოგრაფიული მონაცემები ბიოლოგიურ მასალაში აღნიშნული პრეპარატების აღმოჩენის და რაოდენობრივი განსაზღვრის ქიმიური და ფიზიკურ-ქიმიური მეთოდების შესახებ.

სტატიაში წარმოდგენილია, როგორც ანტიფსიქოზური საშუალებების ანალიზისათვის გამოყენებული მეთოდების ჩამონათვალი, ასევე რამდენიმე კონკრეტული კვლევა, რომელიც შესაძლებელია შემდგომში გამოყენებული იყოს, როგორც მასალა და საფუძველი ახალი მეთოდის შემუშავებისათვის.

რისპერიდონის სისხლის პლაზმაში განსაზღვრისათვის იყენებენ მაღალეფექტურ სითხურ ქრომატოგრაფიას შემდეგ პირობებში: სვეტი Nucleosil-C8 (150 X 4 მმ), ულტრაიისფერი (UV) დეტექტირება 280 ნმ, მოძრავი ფაზა: ნატრიუმის დიჰიდროფოსფატის ბუფერი — აცეტონიტრილი (55:45), pH 6.0, მოძრავი ფაზის დინების სიჩქარე 1.5 მლ/წთ. აღმოსაჩენი მინიმუმი 0.5 ნგ/მლ. საკალიბრო გრაფიკი სასურველ სწორხაზოვნებას ინარჩუნებს 2-50 ნგ/მლ კონცენტრაციის ფარგლებში[9].

სისხლის პლაზმაში რისპერიდონის განსაზღვრისათვის ჩინელი მკვლევარები Ming-zhu Huang et al. იყენებენ სითხურ ქრომატოგრაფიას/ტანდემური მას-სპექტრომეტრიით, შემდეგ პირობებში: სვეტი Alltima-C18 (2.1 100 მმ), მოძრავი ფაზა ჭიანჭველმჟავა-აცეტონიტრილი (40:60), კვლევის შედეგების მიხედვით რაოდენობრივი განსაზღვრის უმცირესი ზღვარი (LLOQ) მერყეობს 80% -120% ფარგლებში[10].

პრეპარატებში ოლანაპინის განსაზღვრის მიზნით იყენებენ სპექტროფოტომეტრიას ულტრაიისფერ და ხილვად უბანში, უწყლო არეში ტიტვრის მეთოდს, მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფიას[7,8]. ხოლო ბიოლოგიურ ობიექტებში, მისი თვისობრივი და რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის, სხვადასხვა მკვლევარების მიერ მონოდეზილი ანალიზის ქვემოთ აღწერილი მეთოდები.

კომპლექსური უნივერსიტეტის, სასამართლო ქიმიის განყოფილების სპეციალისტების მიერ შემუშავებულია და ვალიდირებულია სისხლში ოლანაპინის განსაზღვრის მეთოდი - ცილების მარტივი დალექვით და სითხური ქრომატოგრაფია/ტანდემური მას-სპექტრომეტრის გამოყენებით. სისხლის ნიმუშის შემუშავებული მეთოდით ინდუცირებული დალექვის შემდეგ ახდენენ ოლანაპინის და შიდა სტანდარტის დიბენზოპინის ქრომატოგრაფირებას შექცევადფაზიან Zorbax Extended - C 18 სვეტზე, pH 9.0 პირობებში. დეტექტირება ხდებოდა სამმაგი კვადროპოლის მასს-სპექტრომეტრზე, ანალიზის ხანგრძლივობა კი შეადგენდა 15 წუთს. პროცესი სწორხაზოვანია შემდეგი კონცენტრაციის ფარგლებში - 0.005 — 0.05 მგ/კგ ოლანაპინი სისხლში. მეთოდის ვალიდაციის მონაცემებია: განსაზღვრის მინიმუმი — 0.005 მგ/კგ ოლანაპინი. დღის და დღეთაშორის ცდომილება შეადგენს 11 %-ზე ნაკლებს 0.01-0.5 მგ/კგ კონცენტრაციისას, ხოლო მეთოდის სიზუსტე მერყეობს - 85-115 % დიაპაზონში. გამოყენებული იყო 27 სისხლის ნიმუში, აქედან 20 გვაძური სისხლის[6].

Ulrich S. ოლანაპინის სისხლის პლაზმაში განსაზღვრის მიზნით გვთავაზობს გაზურ-ქრომატოგ-

რაფიას აზოტ-ფოსფორული სელექციური დეტექტირებით (GC-NPD). ანალიზის ხანგრძლივობა შეადგენს 7 წუთს, სვეტის სახით შემოთავაზებულია HP-5 Fused-silica კაპილარი (5 მ 0.2 მმ (შიდა დიამეტრი), მყარი ფაზის ფენის სისქე - 0.33 მიკრონი, გაზი მატარებელი - 0.7 მლ აზოტი). საკალიბრო გრაფიკის სწორხაზოვნება დაცულია 1- 50 ნგ/მლ-ის კონცენტრაციის ფარგლებში. მეთოდის განსაზღვრის მინიმუმია 0.3 ნგ/მლ[14].

პრეპარატებში კლოზაპინის თვისობრივი და რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის იყენებენ პოლაროგრაფიას, ულტრაიისფერ სპექტროფოტომეტრიას, ქემილუმინესცენტურ ანალიზს, ქირალურ ქრომატოგრაფიას, სითხეოვან ქრომატოგრაფიას კოლორიმეტრული დეტექტორით და სხვ.[7,8].

საინტერესოა, აგრეთვე, მონაცემები რისპერიდონის, ოლანზაპინის, კლოზაპინის ერთობლივი განსაზღვრის შესახებ.

უკანასკნელ წლებში შიზოფრენიის მკურნალობისათვის აქტიურად გამოიყენება ე.წ. "ანტიფსიქოზური პოლიფარმაცია", როგორც მკურნალობის თანამედროვე მიდგომა. აღნიშნულიდან გამომდინარე, აქტიუალურია ანტიფსიქოზური საშუალებების ბიოლოგიურ ობიექტებსა და მატრიცებში ერთდროული განსაზღვრის ანალიზის მეთოდების შემუშავება, ეს ჩვენს მიერ აღწერილი წყაროებითაც დასტურდება.

ავტორები რისპერიდონის, ოლანზაპინის, კლოზაპინის და ქვეთაპინის ერთდროული განსაზღვრისათვის გვთავაზობენ მაღალეფექტურ სითხური ქრომატოგრაფიას შემდეგი პირობებით: სვეტი - Luna C18, მოძრავი ფაზა - ამონიუმის აცეტატი (50 : 50), მოძრავი ფაზის დინების სიჩქარე - 1.0 მლ/წთ, უი დეტექტორი 280 ნმ სიგრძის ტალღაზე. ანალიზის შედეგები იყო სწორხაზოვანი 35-65 მკგ/მლ⁻¹ კონცენტრაციის ფარგლებში (ოლანზაპინისთვის $R^2 > 0.0992$, რისპერიდონის $R^2 > 0.0991$)[11].

სამეცნიერო ლიტერატურაში გამოქვეყნებულია ასევე რისპერიდონის, ოლანზაპინის, კლოზაპინის და ქვეთაპინის პლაზმაში ერთდროული განსაზღვრის მაღალეფექტური სითხური ქრომატოგრაფია, მეთოდი - ელექტროგაფრქვევით იონიზაცია/მას-სპექტრომეტრიასთან ტანდემში. მოცემულ კვლევის მიხედვით ახდენდნენ საანალიზო ნიმუშის ორჯერად ექსტრაქციას, ექსტრაქციების შემდგომი შეტუტიანებით. ანალიზი მიმდინარეობდა შემდეგ პირობებში: სვეტი - MACHEREY-NAGEL C18 (2.0 მმ 125 მმ, 3 მკმ), მოძრავი ფაზა — წყლიანი ფრაქცია: ჭიანჭველმჟავა (2.7 მმოლ/ლ) და ამონიუმის აცეტატი: 10 მმოლ/ლ) და აცეტონიტრილი (53:47), მოძრავი ფაზის დინების სიჩქარე — 0.16 მლ/წთ. კომპონენტების იონიზაცია ხდებოდა ელექტროგაფრქვევით და მიღებული შედეგების რეგისტრაცია სელექციურ-იონურ ჩამწერზე. მიღებული შედეგების მიხედვით, საკალიბრო გრაფიკი სწორხაზოვანია — კლოზაპინისთვის 20-1000 ნგ/მლ კონცენტრაციის ფარგლებში, ოლანზაპინის და რისპერიდონისთვის 1-50 ნგ/მლ. მეთოდის კვლავწარმოება შეადგენს 91%, დღის და დღეთაშორის ფარდობითი სტანდარტული გადახრა 15%-ზე ნაკლებია[12].

სითხური ქრომატოგრაფია, მას-სპექტრომეტრიასთან ტანდემში გამოყენებული იყო Uimovsk R. Et al. მიერ, ოთხი ნივთიერების, მათ შორის, რისპერიდონის, ოლანზაპინის, კლოზაპინის და მათი ძირითადი მეტაბოლიტების ადამიანის შრატში განსაზღვრისთვის. შრატის ცილების დალექვა ხდებოდა რეაგენტით: $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05% ხსნარი აცეტონიტრილი/მეთანოლში (40:60). ქრომატოგრაფიული დაყოფა ხდებოდა სვეტზე - BEH C18, მოძრავი ფაზის გრადიენტული მიწოდებით. მოძრავი ფაზა A (2 მმოლ/ლ ამონიუმის აცეტატი, 0.1% ჭიანჭველმჟავა 5%-იან აცეტონიტრილში), მოძრავი ფაზა B (2 მმოლ/ლ ამონიუმის აცეტატი, 0.1 % ჭიანჭველმჟავა 95 %-იან აცეტონიტრილში). შიდა სტანდარტი — ალპრენოლოლი. დეტექტირება ხდებოდა სამმაგი კვადროპოლიან ტანდემურ მას-სპექტრომეტრით. ანალიზის ხანგრძლივობა — 5 წუთი. მეთოდის დღის კვლავწარმოება შეადგენს 87.1-110%, ხოლო დღეთაშორისი - 88.1-108.2 %^[13].

დასკვნა - ანტიფსიქოზური საშუალებების — რისპერიდონი, ოლანზაპინი და კლოზაპინის სამეცნიერო ლიტერატურაში აღწერილი ანალიზის მეთოდების მრავალფეროვნება ადასტურებს, რომ ისინი საინტერესო ობიექტებია ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზის თვალსაზრისით. "ანტიფსიქოზურმა პოლიფარმაციამ" უკანასკნელ წლებში შეიძინა აქტიულობა და ამდენად, ამ პრეპარატების ქიმიურ-ტოქსიკოლოგიური ანალიზის მეთოდების შემუშავების და დახვეწის საკითხები გახსნილია სამეცნიერო მსჯელობისათვის.

წინამდებარე მონიხილვითი სტატია ემსახურება შესაბამისი ინტერესის შექმნას, რათა საქართველოს ნარკოლოგიურ-ტოქსიკოლოგიური ექსპერტიზის პრაქტიკაში დაინერგოს თანამედროვე, მგრძობიარე და აღწარმოებადი ანალიზის მეთოდები.

ლიტერატურა:

1. საქართველოს სამკურნალო საშუალებათა რეგისტრირება — www.rama.moh.gov.ge
2. შიზოფრენია და სხვა ფსიქოზური აშლილობანი, კლინიკური პრაქტიკის ეროვნული რეკომენდაცია.
3. М. Д. Машковский, Лекарственные средства.— 16-е изд.
4. Troy A. Moore, MS, Nancy H. Covell, Susan M. Essock, Alexander L. Miller, Real-World Antipsychotic Treatment Practices, Psychiatr Clin N Am 30 (2007) 401-416
5. K. Naresh, N. Narender Kumar and G. Jeyabalan, Simultaneous estimation of risperidone, olanzapine and quetiapine and its degradation products by HPLC, J. INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACY & LIFE SCIENCES – 2010, ISSN: 0976-7126
6. S. Ulrich. Assay of olanzapine in human plasma by a rapid and sensitive gas chromatography-nitrogen phosphorus selective detection (GC-NPD) method: validation and comparison with high-performance liquid chromatography-coulometric detection [J]. Ther Drug Monit, 2005, 27: 463-468.
7. USP30-NF25
8. USP Pharmacopeia 32, 16.12.2008
9. Seyyed Mohsen Foroutan, Afshin Zarghi, Alireza-Shafaati, ArashKhoddam, Rapid High Performance Liquid

Chromatographic Determination of Risperidone in Human Plasma, Iranian Journal of Pharmaceutical Research (2006) 1: 37-40

10. Ming-zhu Huang, Jian-zhong Shentu, Jun-chun Chen, Jian Liu, Hui-li Zhou, Determination of risperidone in human plasma by HPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study in Chinese volunteers, J Zhejiang Univ Sci B. 2008 February; 9(2): 114-120.

11. Kalra Naresh*, Nyola Narender Kumar and Jeyabalan G. Simultaneous estimation of risperidone, olanzapine and quetiapine and its degradation products by HPLC, INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACY & LIFE SCIENCES, Nov. 2010, ISSN: 0976-7126

12. Zhou Z, Li X, Li K, Xie Z, Cheng Z, Peng W, Wang F, Zhu R, Li H. Simultaneous determination of clozapine, olanzapine, risperidone and quetiapine in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004 Apr 5; 802(2):257-62.

13. Ušoinovská R., Brozmanová H, Sištík P, Silhán P, Kacířová I, Lemr K, Grundmann M., Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of five antidepressants and four atypical antipsychotics and their main metabolites in human serum, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2012 Oct 15; 907:101-7.

14. Ulrich S., Assay of olanzapine in human plasma by a rapid and sensitive gas chromatography-nitrogen phosphorus selective detection (GC-NPD) method: validation and comparison with high-performance liquid chromatography-coulometric detection. Therapeutic Drug Monitoring (Impact Factor: 2.23). 09/2005; 27(4):463-8.

15. Eva Saar, Dimitri Gerostamoulos, Olaf H. Drummer and Jochen Beyer, "Identification and quantification of 30 antipsychotics in blood using LC-MS/MS, Journal of Mass Spectrometry, Published: 20 July 2010.

Sivsvadze K^{a*}, Murtazashvili T^a, Jokhadze M^b, Makharadze R^a, Imnadze N^c.

THE REVIEW OF THE CHEMICAL-TOXICOLOGICAL METHODS OF ANALYSIS OF SOME ANTIPSYCHOTIC DRUGS OF SECOND GENERATION

^aTSMU, DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL AND TOXICOLOGICAL CHEMISTRY; ^bTSMU, DEPARTMENT OF PHARMACOGNOSY AND BOTANICS

Recent years pharmaceutical market has been enriched with numbers of new antipsychotic drugs. In the list of such agents are risperidone, olanzapine and clozapine. The number of its medical and nonmedical utilization significantly increased, respectively raised the quantity of intoxications caused by the antipsychotic drugs. Many scientists of various countries are working to elaborate the methods of qualitative and quantitative analysis for determination of risperidone, olanzapine and clozapine in drugs or in biological material. The main subject of the research is individual and simultaneous determination of above-mentioned agents and validation of these methods. The bibliography shows variety of these methods— spectral, electrochemical and chro-

matographic.

Antipsychotic polypharmacy is well established in schizophrenia therapy. Due to importance of this subject it is essential to deep study of the bibliographic data. Development and amelioration of the chemical-pharmaceutical methods of analysis of above-mentioned agents are still open for scientific discussions.

The present review serves to elaborate the respective background to establish the new, sensitive and reproductive methods of analysis in the narcological - toxicological practice of Georgia.

Simonia G., Andronikashvili I., Pantsulaia I., Kantaria N., Basishvili N.

CARDIOTONIC STEROIDS IN SALT-SENSITIVE ARTERIAL HYPERTENSION IN GEORGIA

TSMU, DEPARTMENT OF INTERNAL MEDICINE; UNESCO CHAIR "HEALTHY LIVING"

Introduction

It has been known that salt-sensitive hypertension is multifactorial cardiovascular dysfunction being a strong predictor for cardiovascular mortality. Salt-sensitivity has been noted in 25-50% of normotensive subjects and in 40-75% of hypertensive patients. Up to now the exact mechanism of salt-sensitivity and salt-sensitive hypertension remains unclear. Among humoral factors determining salt-sensitivity so called endogenous cardiotonic steroids that inhibit Na,K-ATPase – endogenous ouabain (EO) and marinobufagenin (MBG) have been considered. A. Bagrov and collaborators consider that blood pressure could be increased due to influence of cardiotonic steroids (endogenous ouabain and marinobufagenin) on Na,K-ATPase that inhibits proximal tubular reabsorption of sodium (2).

A number of studies have shown that circulating levels of EO in humans are modulated by dietary salt and chronic volume status. EO is related to vascular function and likely has an impact on the development of heart and renal failure. It has been considered that effects of EO involve sodium pump/sodium-calcium exchange system. (4). MBG is a steroid compound that belongs to bufadienolide cardiac inotropic factors. MBG appears to be involved in the development of volume-dependent, salt-sensitive arterial hypertension (3, 5).

Based on aforementioned, the overall *goal* of our study was to elucidate the role of EO and MBG in the development of salt-sensitive and salt-sensitive hypertension in Georgian patients.

The *objectives* of the study were: (a) Typing of normotensive and hypertensive subjects by salt-sensitivity test, and (b) Detection of circulating levels of EO and MBG in salt-resistant and salt-sensitive normotensive subjects during low and high salt diet;

Methods.

The study enrolled a total of 72 ethnically Georgian middle-aged (38-62 year old, 42 females and 30 males) subjects – 22 normotensives and 50 hypertensives of stage I essential hypertension (JNC VII) were examined. Anthropometry, blood pressure monitoring, and 24 hr urinary sodium excre-