

<https://doi.org/10.17116/sudmed20196204137>

## Изучение фенспирида для целей и задач химико-токсикологического исследования

Д.фарм.н. Р.А. КАЛЕКИН\*, к.фарм.н. А.М. ОРЛОВА, д.х.н. С.А. САВЧУК, к.фарм.н. С.С. БАРСЕГЯН

ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Минздрава России, Москва, Россия, 125284

**Цель работы** — изучение фенспирида для целей и задач химико-токсикологического исследования. Предложена методика химико-токсикологического исследования фенспирида в моче предварительными и подтверждающими методами. В качестве предварительного исследования фенспирида авторы предложили метод тонкослойной хроматографии в системе растворителей ацетон — 25% раствор аммиака (9:1). Значение  $R_f$  фенспирида  $0,80 \pm 0,02$ . Степень экстракции при использовании в качестве экстрагента смеси хлороформ—пропанол (9:1)  $28,1 \pm 1,4\%$ . В качестве подтверждающего метода предложены условия идентификации фенспирида газохроматографической масс-спектрометрией (время удерживания фенспирида  $11,1 \pm 0,1$  мин) с последующим количественным определением аналита. Приведены условия для качественного (время удерживания фенспирида  $8,1 \pm 0,1$  мин) и количественного определения фенспирида методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

*Ключевые слова:* фенспирид, эреспал, эпистат, эриспирус, прегабалин, химико-токсикологическое исследование.

### КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Калекин Р.А., Орлова А.М., Савчук С.А., Барсегян С.С. Изучение фенспирида для целей и задач химико-токсикологического исследования. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2019;62(4):37-41. <https://doi.org/10.17116/sudmed20196204137>

## The study of fenspiride: goals and objectives for chemical and toxicological studies

R.A. KALEKIN, A.M. ORLOVA, S.A. SAVCHUK, S.S. BARSEGYAN

Federal Center for Forensic Medical Expertise of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia, 125284

**The purpose of this work** is to study fenspiride for the purposes and tasks of chemical and toxicological research. The technique of chemical-toxicological study of fenspiride in urine by preliminary and confirming methods is proposed. The authors proposed a method of thin-layer chromatography in the solvent system of acetone — 25% ammonia solution (9:1) in a preliminary study of fenspiride. The  $R_f$  value of fenspiride is  $0.80 \pm 0.02$ . The degree of extraction when used as an extractant mixture of chloroform—propanol (9:1) is  $28.1 \pm 1.4\%$ . The conditions for identification of fenspiride by gas chromatography-mass spectrometry (fenspiride retention time  $11.1 \pm 0.1$  minutes), followed by quantitative determination of the analyte, are proposed as a confirming method. The conditions for qualitative (retention time of fenspiride  $8.1 \pm 0.1$  minutes) and quantitative determination of fenspiride by high-performance liquid chromatography are proposed.

*Keywords:* fenspiride, eurespal, epistat, ericerus, eryspirus, pregabalin, chemical-toxicological study.

### TO CITE THIS ARTICLE:

Kalekin RA, Orlova AM, Savchuk SA, Barsegyan SS. The study of fenspiride: goals and objectives for chemical and toxicological studies. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*. 2019;62(4):37-41. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/sudmed20196204137>

Фенспирид (8-(2-фенилэтил)-1-окса-3,8-дiazаспи-ро[4,5]-декан-2-он) — бронходилатирующее, антигистаминное, противоспазмолитическое, спазмолитическое и противоастматическое лекарственное средство (рис. 1). Препарат показан при заболеваниях верхних и нижних отделов дыхательных путей (ларингит, трахеобронхит, бронхиальная

астма, инфекционные заболевания дыхательных путей), при отите и синусите [1].

Фенспирид имеет ряд побочных реакций: со стороны пищеварительной системы (тошнота, боль в эпигастриальной области); со стороны сердечно-сосудистой системы (умеренная тахикардия); эритема, сыпь; головокружение [1].

Вследствие негативного влияния на работу сердца производители фенспирида, а также других препаратов на его основе вынуждены были провести дополнительные исследования. Результаты исследований показали, что при длительном приеме фенспирид нарушает сердечный ритм, приводя к развитию такой опасной патологии, как тахикардия [2]. Установили, что во время приема препарата увеличивается риск появления аритмии у пациента, так как фенспирид провоцирует удлинение интервала Q—T на кардиограмме, что может привести к появлению нарушений, не совместимых с жизнью [3]. Подобные (содержащие фенспирид) препараты при регулярном приеме вызывают стойкую зависимость, схожую с наркотической [2]. Таким образом, препараты, в состав которых входит фенспирид, признаны потенциально опасными для здоровья.

До февраля 2019 г. на фармацевтическом рынке России зарегистрированы лекарственные препараты, содержащие фенспирид, под следующими торговыми названиями: гленспирид, фармаспал, велиспал, феспален, эладон, фенспирид, кодестим, эпистат, эриспирус, сирепс, эреспал [4].

В ближайшее время в России приостановят продажу некоторых лекарственных препаратов, созданных на основе фенспирида. Об этом сообщила пресс-служба Росздравнадзора. В список изымаемых лекарств попали эреспал, эпистат и эриспирус; под вопросом остальные лекарственные препараты, содержащие фенспирид.

Согласно письму Росздравнадзора от 14.02.2019 №024-409/19 «О лекарственном препарате эреспал», в связи с неблагоприятным соотношением польза—риск при использовании данного препарата отзывается регистрационное удостоверение на данное лекарственное средство. Решение о порядке дальнейшего обращения лекарственных препаратов других торговых наименований, содержащих фенспирид, будет принято Минздравом России на основании заключения Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения по результатам фармаконадзора либо на основании подачи заявления держателями регистрационных удостоверений [5].

По данным аналитической компании RNC «Pharma», в России за 2018 г. продано 11,1 млн упаковок препаратов на основе фенспирида.

Таким образом, создается риск появления на рынке не зарегистрированных в России лекарственных препаратов, содержащих фенспирид, и их употребления населением. Возможно увеличение рисков, вызванных приемом как незарегистрированных, так и имеющих на фармацевтическом рынке на момент написания статьи препаратов.

Данные литературы по определению фенспирида в плазме крови и моче касаются в основном вопросов мониторинга препарата, его биоэквивалентности, фармакокинетики. Так, для количественного определения фенспирида в плазме и моче описан метод, включающий жидкость-жидкостную экстракцию аналита из биоматрицы смесью органических растворителей из щелочной и кислой среды с дальнейшим разделением методом жидкостной хроматографии (LC) на обращенно-фазной колонке с использованием электрохимического детектора (для концентраций менее 100 нг/мл) и УФ-детектора для более высоких концентраций аналита. Отмечено также, что фенспирид практически не метаболизируется и в основном в неизменном виде находится в плазме и моче человека [6].

Yu. Pidrughnyukov и соавт. [5] описали разработку и валидацию быстрого метода высокоэффективной жидкостной

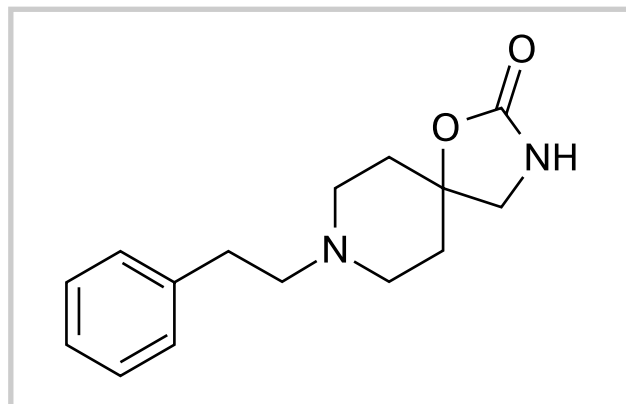


Рис. 1. Структурная формула фенспирида.

Fig. 1. Structural formula of fenspiride.

хроматографии (ВЭЖХ) с масс-селективным детектированием для количественного определения фенспирида в плазме крови человека с целью изучения биоэквивалентности таблеток препарата. Сопутствующие протеины в пробе осаждали ацетонитрилом, аналит и внутренний стандарт (бупивакаин) разделяли на колонке, используя в качестве мобильной фазы смесь ацетонитрила и воды. Выход аналита составил от 99,3 до 101,9%, минимально детектируемое количество — 2 нг/мл.

Активное применение фенспирида в отечественной и зарубежной медицине, наличие у него токсических свойств (препарат умеренно опасен при введении внутрь и умеренно токсичен при введении в брюшную полость [8]), случаи отрыва с фармацевтических рынков, а также отсутствие исследований химико-токсикологических свойств этого соединения [9] определяют актуальность его дальнейшего изучения.

Цель исследования — изучение фенспирида для целей и задач химико-токсикологического исследования.

## Материал и методы

Объект исследования — фенспирид (8-(2-фенилэтил)-1-окса-3,8-диаза Spiro[4,5]-декан-2-он) в виде гидрохлорида.

Предварительную идентификацию осуществляли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ.

Одним из вариантов подтверждающей идентификации явилась спектрофотометрия (спектрофотометр НР 8453, растворяющая среда — вода и этанол, длина волны 190—350 нм,  $l=1$  см). Метод использовали для определения содержания фенспирида.

В качестве дополнительных методов, подтверждающих идентификацию, и последующего количественного определения использовали ГХ-МС (хроматограф Agilent Technologies 6890 Network GC System с МС-детектором 5973 Network) и ВЭЖХ (хроматограф Agilent Technologies 1100 с диодно-матричным детектором).

## Результаты и обсуждение

### Тонкослойная хроматография

На линию старта хроматографической пластины наносили 10 мкл 0,1% раствора фенспирида в воде (10 мкг).

Хроматографирование проводили в стеклянных камерах в системе ацетон — 25% раствор аммиака (9:1) [10, 11].

После насыщения камеры парами системы растворителей в течение 30 мин в нее помещали хроматографические пластины с нанесенными пробами и камеру герметично закрывали крышкой.

После хроматографирования зоны адсорбции исследуемых веществ детектировали при облучении хроматограммы УФ-светом ( $\lambda=254$  нм), при этом наблюдали флюоресценцию фиолетового цвета, а при обработке реактивом Драгендорфа в модификации по Мунье зоны пятен веществ окрашивались в коричневый цвет.

Для определения возможности использования предложенной системы растворителей в экспертной практике, кроме исследуемого вещества, на пластину наносили нативную мочу, содержащую фенспирид и следующие

**Таблица 1. Хроматографическая подвижность лекарственных веществ в системе ацетон — 25% раствор аммиака (9:1)**

**Table 1. Chromatographic mobility of drugs in the system of acetone — 25% ammonia solution (9:1)**

Исследуемое вещество	Средние значения Rf пятен (n=6)
Фенспирид	<b>0,80</b>
Моча, содержащая фенспирид	<b>0,80</b> ; 0,70; 0,54; 0,26
Прегабалин	0,13
Карбамазепин	0,85
Клозапин	0,87
Кодеин	0,89
Клонидин	0,74
Трамадол	0,90

лекарственные вещества: прегабалин, карбамазепин, клозапин, кодеин, клонидин и трамадол. Как видно из данных **табл. 1**, предложенная система растворителей позволяет отделить фенспирид от неидентифицированных веществ из мочи и возможных сопутствующих приемов лекарственных средств. Отклонение Rf не превышало  $\pm 0,02$ . Критерий разделения пятна фенспирида с ближайшим пятном соэкстрактивного вещества составляет 1,14, что достаточно для точной визуальной идентификации исследуемого вещества.

#### Изолирование

Исследование проводили по следующей методике: в делительные воронки вместимостью 50 мл вносили по 20 мл водного раствора, содержащего 1 мг фенспирида, подщелачивали 0,3 мл 25% раствора аммиака до pH 10,0–12,0, добавляли 10 мл экстрагента. В качестве экстрагентов использовали две смеси — хлороформ:пропанол (9:1) и диэтиловый эфир:дихлорметан (6:4). Экстрагировали в течение 5 мин на встряхивателе. Полученные эмульсионные растворы для разделения фаз центрифугировали при 3500 об/мин в течение 10 мин. Органическую фазу переносили в фарфоровую чашку и испаряли растворитель в токе теплого воздуха. Полученный сухой остаток растворяли в дистиллированной воде, количественно переносили в мерные колбы вместимостью 25 мл и доводили водой до метки. Оптическую плотность полученных растворов измеряли с помощью спектрофотометра марки НР 8453 в кюветах с рабочей длиной 10 мм при длине волны 238 нм. Раствором сравнения служило извлечение из контрольного опыта без добавления фенспирида. Результаты изолирования представлены в **табл. 2**.

Степень экстракции использованных двух смесей растворителей практически равнозначна. В дальнейшем предложена смесь хлороформ—пропанол (9:1) ввиду меньшей токсичности ее компонентов. Важным фактором при проведении анализа является наличие соэкстрактивных веществ в извлечении; чистота извлечений влияет

**Таблица 2. Степень извлечения фенспирида из водных растворов (концентрация 0,05 мг/мл), n=6**

**Table 2. The degree of extraction of fenspiride from aqueous solutions (concentration 0.05 mg/ml), n=6**

Показатель	Смесь экстрагентов	
	хлороформ:пропанол (9:1)	диэтиловый эфир:дихлорметан (6:4)
Степень извлечения	25,5; 27,8; 29,0; 27,9; 29,5; 28,8	28,9; 31,3; 29,9; 32,1; 27,5; 31,2
Метрологические характеристики	x=28,08 S=1,42 S <sub>x</sub> =0,58 $\Delta x=1,16$ $\epsilon=4,16$	x=30,04 S=1,66 S <sub>x</sub> =0,68 $\Delta x=1,36$ $\epsilon=4,53$

**Таблица 3. Результаты хроматографирования фенспирида методами ГХ-МС и ВЭЖХ, n=6**

**Table 3. Results of fenspiride chromatography by GC-MS and HPLC methods, n=6**

Показатель	Метод	
	ГХ-МС	ВЭЖХ
Время удерживания	11,3; 11,0; 11,2; 11,2; 11,0; 11,1	8,2; 8,0; 8,1; 8,3; 8,1; 8,0
Метрологические характеристики	x=11,13 S=0,12 S <sub>x</sub> =0,05 $\Delta x=0,10$ $\epsilon=0,89$	x=8,12 S=0,12 S <sub>x</sub> =0,05 $\Delta x=0,10$ $\epsilon=1,18$

на результаты исследований. Недостаточная очистка последних может привести к ложноположительным результатам [12].

### Газохроматографическая масс-спектрометрия

Анализ выполняли на хроматографе с масс-селективным детектором Маэстро Agilent Technologies 7820/5975N с колонкой HP-5MS длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм, толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм.

Условия хроматографирования: газ-носитель — гелий марки А, постоянный поток 2 мл/мин. Программа термостата колонок (DOAS): температура 50 °С (0,5 мин), 99 °С /мин, 100 °С (1 мин), 15 °С/мин, 280 °С (30 мин). Программа термостата колонок (SCREEN): 1 мин при 100 °С, подъем температуры до 300 °С со скоростью 35 °/мин, выдержка 10 мин при 300 °С. Режим ввода пробы: splitless (без деления потока). Объем вводимой пробы 1 мкл (без деления потока). Температура инжектора 270 °С, интерфейса 280 °С.

Условия масс-спектрометрического детектирования: анализ в режиме сканирования по полному ионному току (SCAN), температура источника ионов 230 °С, температура анализатора 150 °С. Диапазон масс  $m/z$  29—650 а. е. м. Напряжение на умножителе: результат, полученный при автоматической настройке по перфторбутиламину в режиме ATUNE + 100 кВ. Задержка на пик растворителя 3 мин.

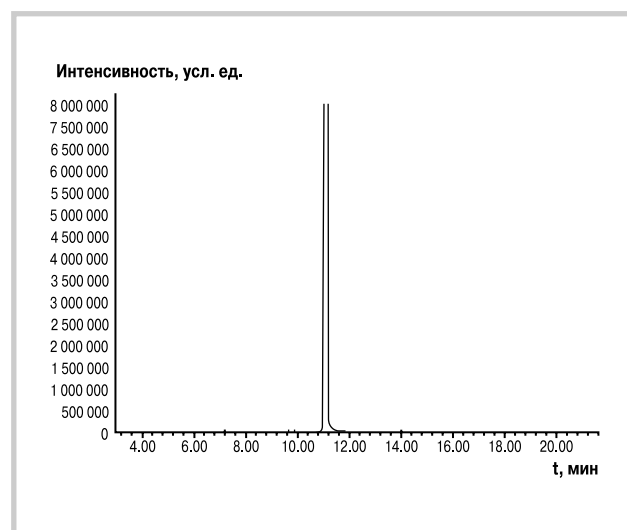
Идентификацию проводили с помощью программы AMDIS по библиотекам масс-спектров SUDMED\_2259\_AMDISLIB\_20151205, NIST 2014, MPW 2011, W9N.

Результаты хроматографирования представлены на **рис. 2**.

Как видно на **рис. 2**, фон соэкстрактивных веществ при извлечении из контрольной мочи не создает помех для проведения исследования анализируемых проб. Время удерживания фенспирида составляет  $11,1 \pm 0,1$  мин. Масс-спектр фенспирида обладает характерными пиками с  $m/z$  169; 170; 96; 42; 91; 105; 82; 77; 112; 56.

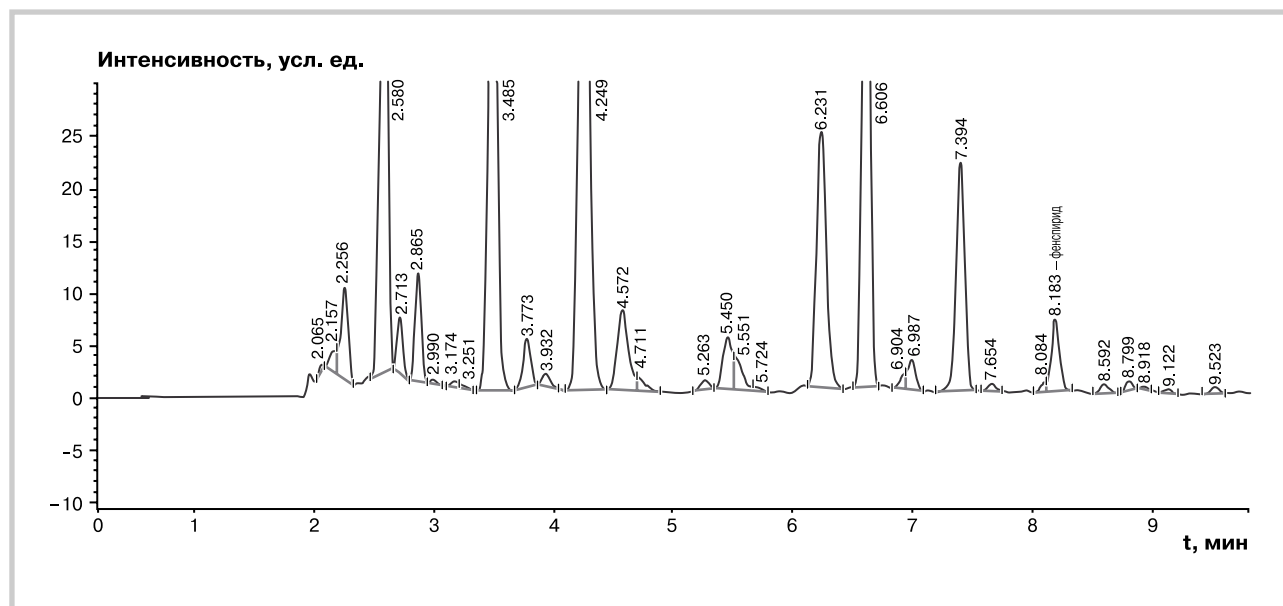
### Высокоэффективная жидкостная хроматография

Полученную водную фазу перенесли в виалы и исследовали на жидкостном хроматографе Agilent Technologies 1100 с диодно-матричным детектором. Объем вводимой пробы 20 мкл. Режим хроматографирования: колонка стальная размерами  $4,6 \times 150$  мм, заполненная обращенно-фазовым сорбентом Zorbax Eclipse XDB-C 18 с размером частиц 5 мкм. Детектирование проводили при длине волны от 200 до 600 нм. Подвижная фаза: раствор А (0,1% раствор трифторуксусной кислоты); раствор В — ацетонитрил. Скорость хроматографирования 0,7 мл/мин. Хроматографирование проводили в градиентном режиме, изменяя содержание ацетонитрила: начальная концентрация — 10%



**Рис. 2.** Хроматограмма фенспирида при извлечении из мочи методом ГХ-МС.

**Fig. 2.** Chromatogram of fenspiride in urine extraction (GC-MS).



**Рис. 3.** Хроматограмма фенспирида при извлечении из мочи методом ВЭЖХ.

**Fig. 3.** Chromatogram of fenspiride in urine extraction (HPLC).

ацетонитрила (выдерживали в течение 1 мин), далее увеличивали концентрацию ацетонитрила до 40% в течение 10 мин. Результаты регистрировали при длине волны 258 нм (рис. 3). Время удерживания фенспирида составило  $8,1 \pm 0,1$  мин.

Данные условия хроматографирования позволяют идентифицировать фенспирид и отделить аналит от соэкстрактивных или сопутствующих лечению веществ, а также количественно определить исследуемое вещество.

Для количественной оценки построен калибровочный график по соотношению площади пика фенспирида и его концентрации, коэффициент корреляции составил 0,99997.

Метрологические характеристики результатов газохроматографической масс-спектрометрии (ГХ-МС) и ВЭЖХ представлены в табл. 3.

Разработанные методики качественного и количественного определения фенспирида валидированы по критериям линейности, правильности, прецизионности и селективности.

## Выводы

1. В качестве предварительного исследования предложен метод тонкослойной хроматографии в системе растворителей ацетон — 25% раствор аммиака (9:1). Значение  $R_f$  фенспирида  $0,80 \pm 0,02$ .

2. Степень экстракции фенспирида из мочи при использовании в качестве экстрагента смеси хлороформ—пропанол (9:1) составляет  $28,1 \pm 1,4\%$ .

3. В качестве подтверждающего метода предложены условия идентификации фенспирида газохроматографической масс-спектрометрией (время удерживания фенспирида  $11,1 \pm 0,1$  мин) с последующим количественным определением аналита.

4. Предложены условия для качественного (время удерживания фенспирида  $8,1 \pm 0,1$  мин) и количественного определения фенспирида методом ВЭЖХ.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
The authors declare no conflicts of interest.**

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. *Регистр лекарственных средств России: Энциклопедия лекарств*. Изд. 23-е. М.: ООО РЛС-2014, 2014;1392.  
*Registr lekarstvennykh sredstv Rossii: Enciklopediya lekarstv*. Izd. 23-e. M.: ООО RLS-2014, 2014;1392. (In Russ.).
2. URL: <https://www.secret-dolgolet.ru/erespal/> Ссылка активна на 01.03.19  
URL: <https://rosregistr.ru/e229466/html> Accessed 01.03.2019
3. URL:<https://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx?RegNumber=&MnnR=%d1%84%d0%b5%d0%bd%d1%81%d0%bf%d0%b8%d1%80%d0%b8%d0%b4&lf=&TradeNmR=&OwnerName=&MnfOrg=&MnfOrgCountry=&ifs=0&isND=0&order=RegDate&orderType=desc&RegType=&pageSize=10&pageNum=5> Ссылка активна на 01.03.19  
URL:<http://www.roszdravnadzor.ru/i/upload/imag-es/2019/2/14/1550157442.84349-1-387.pdf> Accessed 01.03.19
4. Sauveur C, Baune A, Vergnes N, Jeannot PH. The determination of fenspiride in human plasma and urine by liquid chromatography with electrochemical or ultraviolet detection. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*. 1989;7(12):1799-1804.
5. Pidpruzhnykov YuV, Sabko VE, Iurchenko VV, Zupanets IA. UPLC-MS/MS Quantification of Fenspiride in Human Plasma. *J Bioequiv Availab*. 2013;5(4):185-190.  
<https://dx.doi.org/10.4172/jbb.1000156>
6. Методические указания 4.1.3177-14. Измерение концентрации 8-(2-фенилэтил)-1-окса-3,8-дiazаспиро[4,5]-декан-2-она гидрохлорида (фенспирида гидрохлорид, эреспал) в воздухе рабочей зоны методом спектрофотометрии. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 2014;24.  
Metodicheskie ukazaniya 4.1.3177-14 Izmerenie koncentracii 8-(2-fenile'til)-1-oksa-3,8-diazaspiro[4,5]-dekan-2-ona gidrochlorida (fenspirida gidrochlorid, erespal) v vozduxe rabochej zony metodom spektrofotometrii. Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitel'ej i blagopoluchiya che-loveka. 2014;24. (In Russ.).
7. Орлова А.М. Анализ публикаций по токсикологической (судебной) химии в журнале «Судебно-медицинская экспертиза» за период 2004—2013 гг. Сообщение 2. Анализ и оценка публикаций, особенности развития исследований. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2016;59(1):52-59.  
Orlova AM. The analysis of publications on toxicological (forensic) chemistry in the journal «Forensic medical examination» for the period 2004—2013. Message 2. Analysis and evaluation of publications, peculiarities of research development. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*. 2016;59(1):52-59. (In Russ.).
8. Карташов В.А., Чернова Л.В., Величко Г.П. ТСХ-скрининг и индексы удерживания токсических веществ. *Новые технологии*. 2012;2:240-247.  
Kartashov VA, Chernova LV, Velichko GP. TLC-screening and retention indices of toxic substances. *Novye tehnologii*. 2012;2:240-247. (In Russ.).
9. Калёкин Р.А. Определение нейролептиков — производных бензамидов методом тонкослойной хроматографии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013;2:19-20.  
Kalekin RA. Determination of neuroleptics-derivatives of benzamide by thin-layer chromatography. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013;2:19-20. (In Russ.).
10. Саломатин Е.М., Калёкин Р.А., Орлова А.М., Валуева М.И. Особенности и перспективы исследования птомаинов для целей судебно-химического анализа. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2015;58(6):49-52.  
Salomatin EM, Kalekin RA, Orlova AM, Valueva MI. Features and prospects of research of ptomains for the purposes of forensic chemical analysis. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*. 2015;58(6):49-52. (In Russ.).
11. Калёкин Р.А. Определение нейролептиков — производных бензамидов методом тонкослойной хроматографии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013;2:19-20.  
Kalekin RA. Determination of neuroleptics-derivatives of benzamide by thin-layer chromatography. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013;2:19-20. (In Russ.).
12. Саломатин Е.М., Калёкин Р.А., Орлова А.М., Валуева М.И. Особенности и перспективы исследования птомаинов для целей судебно-химического анализа. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2015;58(6):49-52.  
Salomatin EM, Kalekin RA, Orlova AM, Valueva MI. Features and prospects of research of ptomains for the purposes of forensic chemical analysis. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*. 2015;58(6):49-52. (In Russ.).

Поступила 11.03.19  
Received 11.03.19

Принята в печать 17.04.19  
Accepted 17.04.19