

РАЗРАБОТКА УСЛОВИЙ ТСХ-СКРИНИНГА МОНОЦИКЛИЧЕСКИХ АНТИДЕПРЕССАНТОВ

Томаровская Л.Ю., Баярка С.В., Карпушина С.А.

*Национальный фармацевтический университет,
кафедра лекарственной и аналитической токсикологии, г. Харьков*

Ключевые слова: моноциклические антидепрессанты, скрининг, тонкослойная хроматография.

Резюме: Предложены условия ТСХ-скрининга пяти моноциклических антидепрессантов с использованием ТСХ-систем, рекомендованных TIAFT. Относительные параметры хроматографической подвижности при использовании в качестве внешнего стандарта амитриптилина позволили повысить надежность идентификации изучаемых антидепрессантов.

Resume: TLC screening conditions for five monocyclic antidepressants using the TLC systems recommended by TIAFT have been proposed. The relative chromatographic mobility parameters using amitriptyline as an external standard were able to increase the reliability of identification of the antidepressants being studied.

Актуальность. В современной фармакотерапии депрессий широкое применение нашли моноциклические антидепрессанты: флуоксетин (*N*-метил- γ -[4-(трифторметил)фенокси]бензолпропанамин), флувоксамин ((*E*)-5-метокси-1-[4-(трифторметил)фенил]-1-пентанон-*O*-(2-аминоэтил) оксим), венлафаксин (1-[2-(диметиламино)-1-(4-метоксифенил)этил]циклогексанол), милнаципран ((1*R*, 2*S*)-цис-2-(аминометил)-*N,N*-диэтил-1-фенилциклопропанкарбоксамид) и сульпирид (5-(аминосульфонил)-*N*-[(1-этил-2-пирролидинил)метил]-2-метоксибензамид). По механизму фармакологического действия флуоксетин и флувоксамин относятся к селективным ингибиторам обратного захвата серотонина (СИОЗС), венлафаксин и милнаципран характеризуются двойным механизмом фармакологического действия: избирательным ингибированием обратного захвата серотонина и норадреналина (ИОЗСН). Препараты групп СИОЗС и ИОЗСН являются тимоаналептиками последних поколений и, с учетом безопасности лечения и переносимости, относятся к препаратам первого ряда – имеют высокую степень избирательного нейрхимического действия и минимальные побочные эффекты. Сульпирид в качестве атипичного нейролептика используют для лечения психических расстройств.

Несмотря на относительную безопасность, имели место случаи смертельных отравлений указанными препаратами, большинство из которых были связаны с одновременным приемом с другими препаратами центрального действия (антидепрессанты разных групп, бензодиазепинами и др.): флуоксетином [5], флувоксamiном [4], венлафаксином [7, 8], милнаципраном в присутствии терапевтических концентраций флуоксетина [6], сульпиридом [9].

В практике судебной токсикологии при экспертизе отравлений лекарственными препаратами для реализации токсикологического скрининга широко используется метод тонкослойной хроматографии (ТСХ-скрининг). При этом Международной ассоциацией судебных токсикологов (TIAFT) рекомендованы условия для систематического ТСХ-скрининга лекарственных веществ [1, 3].

Цель: Разработка условий ТСХ-скрининга моноциклических антидепрессантов на основе хроматографических систем, рекомендованных ТИАФТ для систематического ТСХ-скрининга лекарственных веществ.

Задачи: 1. Установить параметры хроматографической подвижности флуоксетина, флувоксамина, венлафаксина, милнаципрана и сульпирида в скрининговых ТСХ-системах, рекомендованных ТИАФТ; 2. Разработать условия визуализации указанных препаратов на хроматографических пластинах; 3. Установить оптимальные условия разделения и идентификации моноциклических антидепрессантов методом ТСХ для целей токсикологического скрининга.

Материалы и методы. На линию старта хроматографической пластины Merck (Silica gel 60 F254, размер 10x20 см) на расстоянии 2 см от каждого края с помощью калиброванного капилляра наносили по 10 мкл модельных растворов исследуемых АД в хлороформе с концентрацией 1 мг/мл (10 мкг в пробе). Хроматографирование проводили в камерах объемом 1000 см³, в которые вносили по 10 мл соответствующих подвижных фаз (табл. 1). Камеры насыщали в течение 15 мин. Длина пути пробега подвижной фазы составляла 10 см. Хроматограмму высушивали на воздухе и детектировали антидепрессанты, последовательно, в УФ-свете ($\lambda = 254$ нм), затем с помощью нингидрина, реактива Драгендофа в модификации по Мунье (или раствором подкисленного йодплатината калия).

Результаты и их обсуждение. Значения hRf (среднее из пяти определений) исследуемых антидепрессантов в изученных ТСХ-системах приведены в табл. 1. Как видно, наиболее пригодными для обнаружения и разделения исследуемых моноциклических антидепрессантов являются подвижные фазы 4 и 7.

Таблица 1. Значения hRf моноциклических антидепрессантов в подвижных фазах, рекомендованных ТИАФТ для систематического ТСХ-скрининга

Препарат	Величина $hRf \pm 2$ в подвижных фазах*								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Флуоксетин	0	40	87	90	63	13	78	30	6
Флувоксамин	0	0	12	51	4	0	52	28	2
Венлафаксин	1	0	30	84	52	21	65	57	13
Милнаципран	0	0	18	31	0	0	28	5	14
Сульпирид	0	0	2	54	13	7	37	0	2

*Подвижные фазы: 1. Хлороформ – ацетон (80:20); 2. Этилацетат; 3. Хлороформ – метанол (90:10); 4. Этилацетат – метанол – 25 % раствор гидроксида аммония (85:10:5); 5. Метанол; 6. Метанол – *n*-бутанол (60:40); 7. Метанол – 25 % раствор гидроксида аммония (100:1,5); 8. Циклогексан – толуол – диэтиламин (75:15:10); 9. Ацетон.

При этом выбранные подвижные фазы показали относительно высокую корреляцию абсолютных параметров хроматографической подвижности. Согласно рекомендациям ТИАФТ, для надежного разделения веществ в процессе ТСХ-скрининга необходимо использовать две (или более) хроматографические системы, желательно с низкой корреляцией величин Rf [3].

С целью повышения селективности разделения исследуемых антидепрессантов были установлены их относительные параметры хроматографической подвижности (hRf (отн.)) при использовании в качестве внешнего стандарта amitriptilina

(трициклический антидепрессант) (табл. 2). Величины hRf (отн.) показали более низкую корреляцию между выбранными подвижными фазами, чем их соответствующие абсолютные значения. А для венлафаксина наблюдали обратную корреляцию, что позволяет оценивать результаты его идентификации в данных условиях ТСХ-скрининга как полученные двумя различными методами анализа.

Результаты визуализации антидепрессантов приведены в табл. 3. Наиболее чувствительным реактивом для детектирования исследуемых веществ на хроматографической пластине был подкисленный йодплатинат калия. Сочетание результатов окрашивания с указанным реактивом и нингидрином позволило дифференцировать все исследуемые лекарственные вещества.

Таблица 2. Абсолютные и относительные параметры хроматографической подвижности моноциклических антидепрессантов в некоторых подвижных фазах, рекомендованных ТИАФТ для систематического ТСХ-скрининга

Препарат	Величины hRf (станд.), $hRf(x)$ и hRf (отн.) в подвижных фазах			
	4		7	
Амитриптилин	91	1	51	1
Флуоксетин	90	1,0	78	1,5
Флувоксамин	51	0,56	52	1,0
Венлафаксин	84	0,92	65	1,3
Милнаципран	31	0,34	28	0,55
Сульпирид	54	0,59	37	0,73

Таблица 3. Визуализация антидепрессантов при ТСХ-скрининге

Препарат	Окраска (предел обнаружения, мкг в пробе)			
	УФ-свет ($\lambda = 254$ нм)	Нингидрин	Реактив Драгендорфа по Мунье	Подкисленный йодплатинат калия
Амитриптилин	нет флюоресценции	нет окрашивания	оранжевая (1,0)	сине фиолетовое (0,2)
Флуоксетин	зеленая флюоресценция (2,0)	оранжевая (5,0)	оранжевая (0,5)	сине фиолетовое (0,5)
Флувоксамин	нет флюоресценции	красная (4,0)	оранжевая (3,0)	коричнево-фиолетовая (1,0)
Венлафаксин	нет флюоресценции	сине-зеленая (3,0)	оранжевая (3,0)	сине-фиолетовая (2,0)
Милнаципран	нет флюоресценции	розово-фиолетовая (4,0)	оранжевая (5,0)	синяя (1,0)
Сульпирид	нет флюоресценции	розово-фиолетовая (2,0)	оранжевая (2,0)	розово-фиолетовая (1,0)

Выводы: 1. В условиях ТСХ-скрининга для обнаружения и разделения флуоксетина, флувоксамина, венлафаксина, милнаципрана и сульпирида рекомендованы подвижные фазы этилацетат – метанол – 25% раствор гидроксида аммония (85:10:5) и метанол – 25% раствор гидроксида аммония (100:1,5).

2. Относительные параметры хроматографической подвижности изученных моноциклических антидепрессантов при использовании в качестве внешнего стан-

дарта amitriптилина показали между выбранными подвижными фазами более низкую корреляцию, чем соответствующие им абсолютные значения.

3. На основе относительных параметров хроматографической подвижности при использовании в качестве внешнего стандарта amitриптилина и результатов визуализации с помощью подкисленного йодплатината калия и нингидрина удалось надежно разделить и идентифицировать все изученные моноциклические антидепрессанты.

Литература

1. Вергейчик Т. Х. Токсикологическая химия / Т. Х. Вергейчик. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 400 с.
2. A case of fluvoxamine overdose / H. Oka, Y. Shirakawa, K. Koyama [et al.] // *Chudoku Kenkyu*. – 2002. – V. 15 (1). – P. 53–57.
3. *Clarke's Analytical Forensic Toxicology* / Ed. by Sue Jickells, Adam Negrusz. – London : Pharmaceutical Press, 2008. – 648 p.
4. First death case of serotonin syndrome in Japan induced by fluvoxamine and tandospirone / T. Kawano, T. Kosuge, S. Takagi [et al.] // *Chudoku Kenkyu*. – 2011. – 24(4). – P. 305–310.
5. Fatal fluoxetine intoxication with markedly elevated central blood, vitreous, and liver concentrations / F. L. Cantrell, C. Vance, B. Schaber, I. McIntyre // *J. Anal. Toxicol.* – 2009. – V. 33 (1). – P. 62–64.
6. Fatal intoxication with milnacipran / L. Fanton, F. Bévalot, H. Grait [et al.] // *J. Forensic Leg. Med.* – 2008. – V. 15 (6). – P. 388–390.
7. Goering, K. Postmortem tissue concentrations of venlafaxine / K. Goering, I. McIntyre, O. F. Drummer // *Forens. Sci. Int.* – 2001. – V. 121 (1–2). – P. 70–75.
8. Mazur, J. Fatality related to a 30-g venlafaxine overdose / J. Mazur, J. Doty, A. Krygiel // *Pharmacotherapy*. – 2003. – V. 23 (12). – P. 1668–1672.
9. The distribution of Doxepine and Sulpiride in human poisoning death / Z. Wei, K. Xiao, M. Wu [et al.] // *Rom. J. Leg. Med.* – 2012. – V. 20 (1). – P. 57–60.
10. Wu, M. L. Fatal serotonin toxicity caused by moclobemide and fluoxetine overdose / M. L. Wu, J. F. Deng // *Chang.Gung.MedJ.* – 2011. – V. 34(6). – P. 644–649.