Розробка методики виявлення та визначення мілнаципрану за допомогою методу ВЕРХ з мультихвильовим детектуванням, придатної для цілей хіміко-токсикологічного аналізу

Баюрка С.В., Карпушина С.А.
Кафедра токсикологічної хімії,
Національний фармацевтичний університет,
м. Харків, Україна
svitkrp@gmail.com

Мілнаципран – (1*R*, 2*S*)-цис-2-(амінометил)-*N*,*N*-діетил-1-фенілциклопропанкарбоксамід відноситься до новітніх тимоаналептиків III покоління, фармакологічний ефект яких обумовлений подвійною дією: вибірковим інгібуванням зворотнього захвату серотоніну та норадреналіну (ІЗЗСН). Мілнаципран використовується в терапії ендогенних депресій середнього та тяжкого ступеню. Зареєстровано випадок летального отруєння мілнаципраном [4], лабораторна діагностика показала наявність високих концентрацій мілнаципрану в крові (21,5 та 20 мг/л в периферичній та артеріальній крові, відповідно), а також присутність у терапевтичних концентраціях інших антидепресантів: флуоксетину та сертраліну. За результатами токсикологічного дослідження крові з метою з'ясування причини фатальної автомобільної аварії встановлено наявність в периферичній крові токсичних доз мілнаципрану (3,15 мкг/мл) та 1,3 г/л етанолу [2]. Таким чином, розробка методів хіміко-токсикологічного аналізу мілнаципрану є актуальною задачею.

Розроблено біоаналітичні методики дослідження мілнаципрану в крові та плазмі за допомогою газо-рідинної хроматографії з нітроген-фосфорним детектуванням, високоефективної рідинної хроматографії з УФ-спектрофотометричним, діодно-матрічним, флюоресцентним та МС-детектуванням [3]. ВЕРХ-МС (ВЕРХ-МС/МС) характеризується найвищою специфічністю, що робить її ідеальним методом аналізу на етапі скринінгових токсикологічних досліджень. Але вказаний метод потребує складного, з високою вартістю, обладнання, вимагає висококваліфікованого персоналу для інтерпретації результатів, що робить його малодоступним для ряду лабораторій. Метод ВЕРХ з УФ-спектрофотометричним детектуванням є досить чутливим відносно до токсичних та летальних концентрацій лікарських речовин, доступним щодо інструментальної бази і знайшов широке використання при токсикологічних дослідженнях. Детектування за допомогою діодно-матричного та мультихвильового УФ-спектрофотометричних аналізаторів дозволяє доповнювати параметри утримування також і спектральними характеристиками аналіту. Використання баз даних з параметрів утримування та спектральних характеристик досліджуємої речовини, які в теперішній час є досить популярними [1], дає можливість використовувати метод ВЕРХ-УФ як для заключної ідентифікації, так і на етапі скринінгу токсичних речовин.

Метою нашого дослідження була розробка методики виявлення та визначення мілнаципрану за допомогою методу ВЕРХ з мультихвильовим детектуванням. Аналіз проводили в уніфікованій хроматографічній системі для скринінгу лікарських речовин, що відповідає базі даних «ВЭЖХ-УФ» для хроматографа «Милихром А-02»(БД-2003-500) [1]. Використовували колонку розміром 2х75 мм з оберненою фазою C_{18}; елюент А: 0,2 М перхлорат літію - 0,005 М перхлорна кислота, елюент Б: ацетонітрил, режим елюювання – градієнтний (від 5 % Б до 100 % Б за 4 хв, 100 % Б протягом 3 хв); швидкість подачі елюента 100 мкл/хв; температура термостата колонки 40º С. Детектування проводили при 8 довжинах хвиль: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм. Об'єм проби становив 10 мкл. Ідентифікацію проводили за часом утримування та спектральними відношеннями ($R=S_{\lambda}/S_{210}$), які, відповідно, складали 17,00±0,06 хв (n=3, RSD=0,15 %, ε=0,37 %) та 0,811±0,007; 0,291±0,004; 0,030±0,002; 0,012±0,002; 0,014±0,002; 0,0021±0,0002; 0,0014±0,0003. Кількісне визначення проводили за рівнянням калібрувального графіку залежності площі піку від концентрації при довжині хвилі 262 нм, яке після перевірки статистичної значущості вільного члену в рівнянні лінійної регресії мало вигляд: $Y = 5{,}14 \cdot 10^{-5} X$. Діапазон лінійності методики був у межах 24,2–500 мкг/мл, LOD та LOQ було розраховано на основі параметрів калібрувального графіку і становили, відповідно, 8,0 та 24,2 мкг/мл. Правильність та прецизійність розробленої методики в області низьких концентрацій становила 101,8 % (RSD=1,4 %), в області середніх та високих концентрацій – 100,8 та 100,5 %, відповідно, (RSD=1,0 %), що задовільняє вимогам до методик, рекомендованих для використання в судовій токсикології [5].

Література

1. Стрельникова Е.С. Практические аспекты использования базы данных «БД-2003» в проведении скрининга методом высокоэффективной жидкостной хроматографи [Електронний ресурс] / Е.С. Стрельникова // Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики. – Барнаул-Новосибирск, 2012. – Вып. 18. – Режим доступу: http://journal.forens-lit.ru/node/825.
2. Blood concentration of milnacipran in a case of a fatal automobile accident / P.P. Rop, M.H. Sournac, J. Burle [et al.] // J. Anal. Toxicol. – 2002. – V. 26 (2). – P. 123–126.
3. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material: 4-th edition / A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop [et al.]. – London, Chicago: Pharmaceutical Press, 2011. – 2736 p.
4. Fatal intoxication with milnacipran / L. Fanton, F. Bévalot, H. Grait [et al.] // J. Forensic Leg. Med. – 2008. – V. 15 (6). – P. 388–390.
5. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens (United Nations Office on Drugs and Crime, Vienna). – New York, 2009. – 67 p.