

АПРОБИРОВАНИЕ УСЛОВИЙ ИЗОЛИРОВАНИЯ И ОБНАРУЖЕНИЯ ТРИЦИКЛИЧЕСКОГО АНТИДЕПРЕССАНТА ТИАНЕПТИНА В ЭКСПЕРИМЕНТАХ С ЛАБОРАТОРНЫМИ ЖИВОТНЫМИ

Люст Е.Н.

ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия Минздрава России», Пермь, Россия (614990, Пермь, ул. Полевая, 2), e-mail: elenalyust@mail.ru

В статье рассматривается вопрос немедицинского применения лекарственного препарата, трициклического антидепрессанта тианептина («Коаксил®»). Употребление данного средства в высоких дозировках или совместно с другими препаратами, наркотическими средствами для получения эйфории может стать причиной формирования зависимости от тианептина. Таким образом, существует необходимость идентификации вещества в биологических средах организма человека при острых и смертельных отравлениях. Разработанные ранее методики изолирования и определения тианептина на примере модельных смесей были воспроизведены в экспериментах с лабораторными животными. Показана возможность достоверного обнаружения и количественного определения тианептина методами тонкослойной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии в биологических жидкостях и тканях внутренних органов. Проведена валидационная оценка разработанной методики исследования тианептина методом ВЭЖХ.

Ключевые слова: тианептин, трициклический антидепрессант, отравление, высокоэффективная жидкостная хроматография, тонкослойная хроматография.

TEST OF CONDITIONS FOR ISOLATION AND DETECTION OF TRICYCLIC ANTIDEPRESSANTS TIANEPTINE IN THE EXPERIMENTS WITH LABORATORY ANIMALS

Lyust E.N.

¹Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia (614990, Perm, Polevaya street, 2), e-mail: elenalyust@mail.ru

The article discusses non-medical use of tricyclic antidepressant tianeptine ("Koaksil®"). The usage of this tool in high doses or in combination with other drugs, narcotics for euphoria can cause the formation depending on tianeptine. Thus, there is a need for identification of substances in biological fluids of the human body at acute and fatal poisonings. Previously developed techniques for isolation and identification tianeptine on model mixtures were reproduced in experiments with laboratory animals. It was demonstrated the possibility of reliable detection and quantification of tianeptine by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography methods in biological fluids and tissues. It was carried out the validation assessment of new techniques for the study of tianeptine by HPLC.

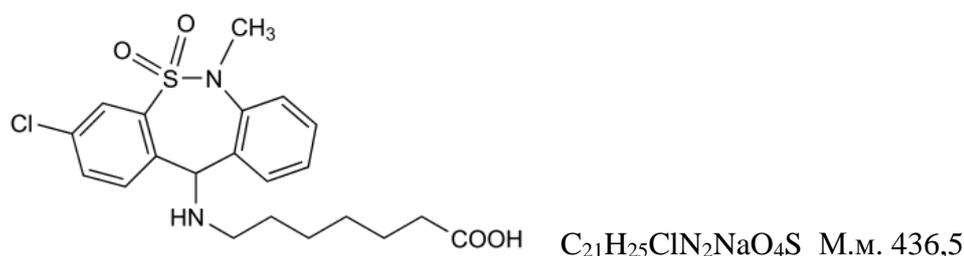
Keywords: tianeptine, tricyclic antidepressants, poisoning, high performance liquid chromatography, thin-layer chromatography.

Состояние тревоги и беспокойства, депрессия стали часто встречающимися нарушениями здоровья, что значительно снижает качество жизни современного человека. Особенно высока частота депрессии у людей, имеющих различные соматические болезни: сахарный диабет, онкологические заболевания, пациенты, перенесшие инсульт и инфаркт миокарда. Лекарственные средства, применяющиеся для лечения данных расстройств, относятся к группе антидепрессантов и на текущий момент являются наиболее востребованными лекарственными препаратами [1]. Наряду с этим антидепрессанты относятся к числу наиболее токсичных психоактивных веществ.

Среди антидепрессантов важное место занимают представители трициклической структуры, к числу которых принадлежит тианептин («Коаксил®», «Stablon®»).

Зарегистрированные факты его немедицинского применения свидетельствуют о том, что постоянное или разовое преднамеренное избыточное потребление тианептина несет в себе угрозу негативных последствий для физического и психического здоровья человека. Последствиями применения завышенных доз тианептина становятся различные психические расстройства и соматические осложнения, которые усугубляются при инъекционном способе введения растертых и суспензированных с водой таблеток [2, 3].

На основании Постановления Правительства РФ № 486 от 30.06.2010 г. «О внесении изменений в некоторые акты правительства РФ, связанные с оборотом наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров» тианептин отнесен к списку психотропных веществ, оборот которых в РФ ограничен и в отношении которых допускается исключение некоторых мер контроля (список III).



7 – [(3-хлор – 6,11 – дигидро – 6-метилдибензо [с, f] [1,2] тиазепин – 11 – ил) амино] гептановой кислоты S,S – диоксид (в виде натриевой соли)

Препарат «Коаксил®» (тианептин) выпускается в лекарственной форме – таблетки покрытые оболочкой 12,5 мг (блистеры) (НД 42-10361-04), по механизму действия относится к селективным стимуляторам обратного захвата серотонина (ССОЗС).

Тианептин быстро и полностью адсорбируется из желудочно-кишечного тракта и равномерно распределяется в организме, легко проходит через гистогематические барьеры. Обладает высокой степенью связывания с белками (94 %). Вещество интенсивно метаболизируется в печени путем β-окисления боковой цепи (гептановая кислота) с образованием производных с более короткой алифатической цепочкой: МС5 с пентановой кислотой в боковой цепи (активный метаболит) и МС3 с пропионовой кислотой (неактивный метаболит), в дальнейшем препарат подвергается N-деметилованию с образованием нортианептина. Элиминация тианептина характеризуется коротким периодом полувыведения (T_{1/2} – 2,5 ч), экскрецией с мочой в основном в виде метаболитов, выведение тианептина в нативном виде составляет менее 3 % от принятой дозы. Взрослым тианептин назначают по 1 таблетке (12,5 мг) 3 раза в сутки перед едой [8, 9, 10].

Материалы и методы. Разработанные нами ранее условия экстракции и методики анализа тианептина методами тонкослойной хроматографии (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на примере рабочего стандартного образца тианептина

и модельных смесей биологических жидкостей и внутренних органов были апробированы нами в опытах *in vivo* с биологическими объектами от лабораторных животных [4, 5, 6, 7].

В качестве объекта исследования выбраны нелинейные беспородные лабораторные животные – белые крысы массой 180,0 – 220,0 г, одно животное использовалось в качестве контрольного (холостой опыт). До начала эксперимента животные содержались в условиях вивария ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, согласно правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96) на стандартной диете для лабораторных животных (ГОСТ Р 50258-92).

Для получения биологической жидкости от лабораторных животных (суточная моча) каждому животному, кроме контрольного, вводили однократно *per os* через зонд растертые и суспензированные таблетки тианептина с 2 мл воды очищенной, содержащих 37,5 мг активного вещества (3 таблетки). Доза тианептина соответствует высшей суточной дозе (37,5 мг). Через 20 минут после введения лекарственного вещества животным проводили водную нагрузку физиологическим раствором таким образом, чтобы суммарный объем жидкости, вводимой перорально, получился равным 5 мл на 100 г веса (3 мл). Животных помещали в специально оборудованную воронку для сбора суточной мочи.

Для получения биологических органов от лабораторных животных каждому животному, кроме контрольного, вводили однократно *per os* через зонд растертые и суспензированные таблетки тианептина с 3 мл воды очищенной, содержащих 100 мг активного вещества (8 таблеток). Через 2 часа у животных отбирали биологические органы – печень, почки.

Изолирование из биологической жидкости (суточной мочи) вели двукратной прямой экстракцией хлороформом порциями по 5 мл при pH 3-4 и 8-9. Время каждой экстракции составляло 2 минуты. Органические фазы отделяли в делительной воронке и фильтровали.

Изолирование из биологических органов (печень, почки) вели по методу Васильевой А.А. – измельченные ткани внутренних органов лабораторных животных смешивали с водой очищенной в соотношении 1:2, доводили pH смеси до значений 3–4 щавелевой кислотой раствором 5 % по универсальному индикатору. Смесь выдерживали в течение 2 часов, затем фильтровали через ватный тампон и дважды экстрагировали хлороформом по 10 мл. Органическую фазу отделяли. Оставшуюся водную фазу доводили до pH 8-9 аммиачным раствором 10 %, далее дважды извлекали хлороформом по 10 мл. Органическое извлечение отделяли. Полученные хлороформные экстракты фильтровали через бумажный фильтр с натрием сульфатом безводным.

Биологические органы и жидкости лабораторных животных использовали в полном объеме. В ходе последовательной экстракции получали кислую (фракция А) и щелочную

фракции (фракция Б). Хлороформные экстракты концентрировали до 1 мл, 0,5 мл из которых анализировали методом ТСХ. Сухие остатки, полученные после удаления экстрагента из второй части экстракта, растворяли в 0,5 мл этанола 96 % и анализировали методом ВЭЖХ. Параллельно основному исследованию в тех же условиях вели изолирование и анализ контрольных образцов.

Исследование методом ТСХ – экстракты из биологических объектов наносили на хроматографическую пластинку «Sorbfil ПТСХ – АФ – В – УФ», параллельно на пластинку наносили экстракты из контрольных образцов и рабочий стандартный раствор тианептина. Хроматографирование вели восходящим способом в системе растворителей этанол 96 %: метиленхлорид: аммиака раствор концентрированный 25 % (57,5: 40: 2,5), длина пробега растворителей 10 см. После высушивания пластины просматривали в УФ свете.

В данной подвижной фазе было достигнуто разделение тианептина и его метаболита, сопутствующих веществ, извлекающихся совместно с тианептином из биологических объектов, а также получение оптимальных значений Rf.

Значения Rf как для рабочего стандартного образца, так и тианептина в извлечениях составило $0,53 \pm 0,05$, для метаболита – $0,30 \pm 0,05$. Сопутствующие вещества оставались или в зоне первичной локализации, или поднимались с фронтом растворителя к линии финиша, таким образом, не препятствуя обнаружению анализируемого вещества. Для детектирования тианептина и его метаболита оптимальным является облучение пластины УФ-светом (предел обнаружения – 50 мкг) с дальнейшей обработкой реактивом Драгендорфа или парами йода (предел обнаружения – 50 мкг).

Исследование методом ВЭЖХ – анализировали экстракты из биологических объектов на жидкостном микроколоночном хроматографе «Миличром А-02» (г. Новосибирск, ЗАО Институт хроматографии «ЭКОНОВА»). Полное управление хроматографом от IBM PC под WINDOWS – 95/98. Полученные хроматограммы анализировали с помощью программы обработки данных «Мультихром».

В работе использовали универсальные хроматографические условия «База данных 2003»: колонка с обращенно-фазным сорбентом ProntoSIL-120-5-C18; подвижная фаза – А: [4М LiClO₄ – 0.1М HClO₄]: H₂O (5:95); Б: CH₃CN; скорость потока подвижной фазы – 100 мкл/мин; режим – градиентный; детекция – многоволновая; объем вводимой пробы – 4 мкл; температура колонки – 40 °С; идентификация – время удерживания, спектральные соотношения, максимальное поглощение при 210 нм.

На рис. 1 представлены хроматограммы извлечений из биологических объектов лабораторных животных (моча, печень), в табл. 1 приведены параметры идентификации тианептина и его метаболита в объектах и их метрологические характеристики.

В экспериментах с контрольными холостыми пробами установлено, что балластные вещества биообъектов не мешают хроматографическому определению тианептина и его метаболита.

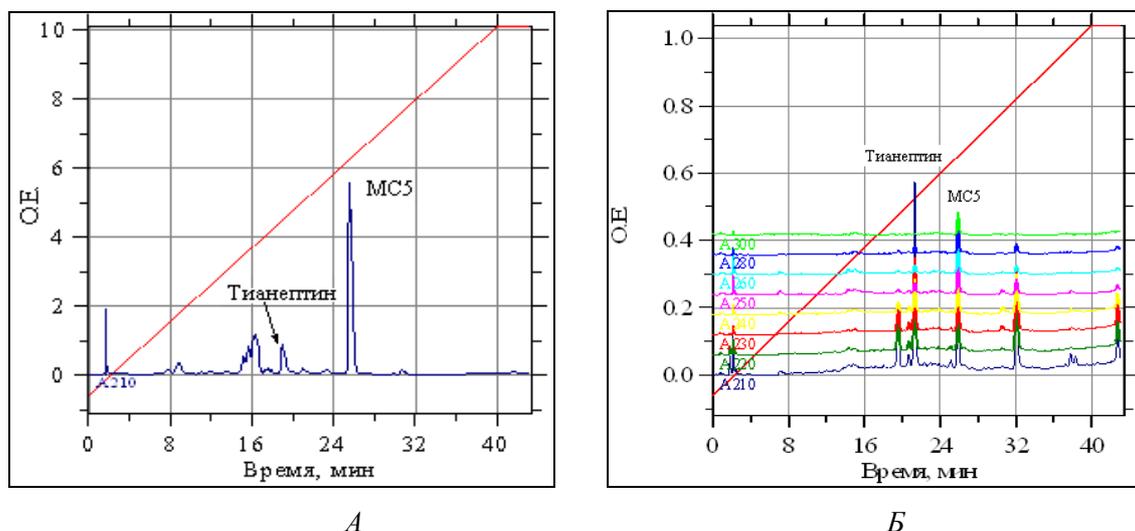


Рис.1. ВЭЖХ-хроматограммы экстрактов из биообъектов: А – моча; Б – ткани печени (детекция многоволновая)

Таблица 1

Результаты определения параметров идентификации тианептина и его метаболита в биообъектах методом ВЭЖХ, (n=5)

Соединение	Время удерживания (t_R), мин.				
	\bar{x}	SD	RSD	Δx	ε , %
Моча					
Тианептин	20,03	0,07	0,40	0,08	0,42
Метаболит МС5	26,02	0,07	0,30	0,09	0,35
Почки					
Тианептин	20,11	0,07	0,37	0,09	0,46
Метаболит МС5	25,81	0,14	0,52	0,17	0,65
Печень					
Тианептин	20,12	0,07	0,37	0,09	0,46
Метаболит МС5	25,78	0,14	0,52	0,17	0,65

Количественное содержание тианептина в биологических объектах рассчитывали с помощью метода абсолютной калибровки. Через значения градуировочных коэффициентов и полученных площадей хроматографических пиков было рассчитано содержание тианептина в образцах (рис. 2, таб. 2).

Данные табл. 2 свидетельствуют о том, что тианептин выводится в неизменном виде в незначительных концентрациях, что соответствует информации в специальной литературе.

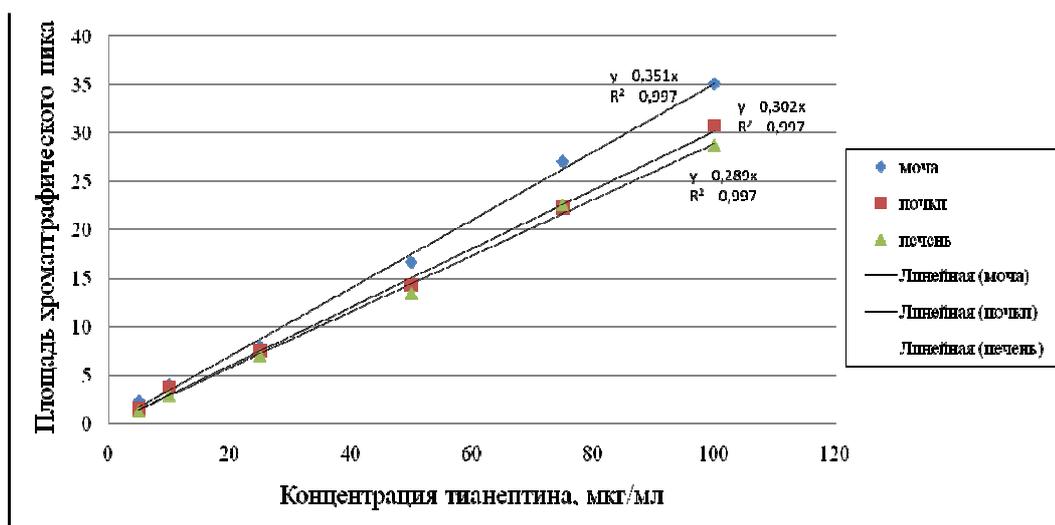


Рис.2. Градуировочные графики определения тианептина методом ВЭЖХ в образцах биообъектов (моча, печень, почки)

Таблица 2

Концентрации тианептина, обнаруженные в биообъектах (n = 5)

Наименование биообъекта	Фракция А, мг	Площадь пика, фр. А	Фракция Б, мг	Площадь пика, фр. Б	Суммарная конц-ция тианептина, мг	Процент от введенной дозы, %
Печень	0,65	249,70	0,35	132,26	1,00	1,00
Почки	0,07	25,33	0,03	8,62	0,10	0,10
Моча (через 24 ч)	0,10	38,12	0,04	13,48	0,14	0,37

Нами проведена валидационная оценка пригодности разработанной методики определения тианептина в биологических объектах методом ВЭЖХ.

Специфичность методики оценивалась при сравнении хроматограмм, полученных при анализе экстрактов из модельных смесей биообъектов, холостых проб и раствора стандартного образца тианептина. Данная методика отличается специфичностью, так как возможно однозначно определить испытуемое вещество в присутствии других соединений, находящихся в исследуемом образце.

Предел обнаружения тианептина в модельных смесях оценивался как количество вещества, которое может быть обнаружено в пробе без точного определения его количественного содержания. Для установления данной характеристики использовали визуальную оценку на образцах с известной концентрацией тианептина. Таким образом, предел обнаружения тианептина составил в образцах мочи – 0,3 мкг, печени – 0,5 мкг.

Предел количественного определения имеет большое значение для судебно-химического анализа при оценке малых количеств вещества в пробе. Наименьшее количество тианептина, которое может быть количественно определено с заданной точностью в образцах, составило 5,0 мкг.

Разработанная методика обладает необходимой правильностью, точностью и

линейностью. Линейная зависимость аналитического сигнала от концентрации тианептина в пробах наблюдается во всем интервале выбранных концентраций (от 5 до 100 мкг), коэффициент корреляции стремится к единице. При оценке правильности и точности проводили определение степени близости времен удерживания по отношению к времени удерживания раствора стандартного образца тианептина (таб. 3).

Метрологические характеристики определения тианептина в различных биологических объектах после изолирования приведены в табл. 4.

Таблица 3

Метрологические характеристики параметров идентификации тианептина в модельных смесях

Тианептин	Абсолютное время удерживания, мин				
	\bar{x}	SD	RSD	Δx	$\epsilon, \%$
Раствор стандартного образца тианептина	20,20	0,08	0,38	0,10	0,47
Модельные смеси мочи	20,18	0,09	0,48	0,12	0,60
Модельные смеси печени	20,21	0,10	0,53	0,13	0,66

Таблица 4

Метрологические характеристики результатов изолирования тианептина из модельных смесей (моча, печень, n=3)

Биообъект	Найденная концентрация тианептина, мг			
Концентрация тианептина, мг	Моча		Печень	
	0,5	0,28 0,26 \bar{x} сп = 0,26 0,24	SD = 0,02 RSD = 7,69 Δx = 0,05 $\epsilon, \%$ = 19,10	0,16 0,17 \bar{x} сп = 0,15 0,13
1,0	0,51 0,55 \bar{x} сп = 0,53 0,54	SD = 0,02 RSD = 3,90 Δx = 0,05 $\epsilon, \%$ = 9,69	0,32 0,28 \bar{x} сп = 0,30 0,31	SD = 0,02 RSD = 6,86 Δx = 0,05 $\epsilon, \%$ = 17,04
2,0	1,42 1,35 \bar{x} сп = 1,39 1,39	SD = 0,04 RSD = 2,53 Δx = 0,09 $\epsilon, \%$ = 6,29	0,95 0,97 \bar{x} сп = 0,98 1,02	SD = 0,04 RSD = 3,68 Δx = 0,09 $\epsilon, \%$ = 9,13

Проведенная валидационная оценка разработанной методики определения тианептина в биообъектах методом ВЭЖХ показала, что она отличается специфичностью, линейной зависимостью, чувствительностью, правильностью, повторяемостью и внутрिलाбораторной прецизионностью полученных результатов.

Выводы. С положительным результатом апробированы методики изолирования и определения тианептина с использованием методом ТСХ и ВЭЖХ в опытах с биологическими объектами от лабораторных животных, разработана схема анализа. Установлено, что в данных условиях возможно достоверное определение тианептина и его метаболита МС5. Относительная погрешность обнаружения в биообъектах методом ВЭЖХ не превышает для тианептина 0,47 %, для метаболита 0,65 %.

Список литературы

1. Аведисова А.С. История создания антидепрессантов и перспективы применения новых лекарственных препаратов этого класса // Фарматека. – 2006. – № 7. – С. 14–18.
2. Богинская Д.Д., Мохначев С.О. Зависимость от тианептина (коаксила) // Наркология. – 2012. – № 3. – С.32-42.
3. Люст Е.Н., Малкова Т.Л. Токсикологическое значение тианептина и актуальность экспертного исследования с целью его обнаружения в биологическом материале // Медицинская экспертиза и право. – 2011. – № 5. – С. 10-12.
4. Люст Е.Н. Обнаружение ряда антидепрессантов методами ТСХ и ВЭЖХ // Закономерности и тенденции развития науки в современном обществе: сб. статей междунаро. науч.-практ. конф. – Уфа: РИЦ БашГУ, 2013. – С. 22-25.
5. Люст Е.Н. Обнаружение тианептина и морфина в биологической жидкости хроматографическими методами при совместном присутствии // Бутлеровские сообщения. – 2013. – Т. 34 – № 4. – С.123-128.
6. Люст Е.Н. Разработка методик изолирования и определения тианептина в биоматериале для целей судебно-химического и химико-токсикологического анализа : автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук. – Пермь, 2012. – 24 с.
7. Люст Е.Н., Терёхин Г.А. Изучение условий обнаружения тианептина в биологических органах крыс // Материалы науч.-практич. конф. с междунаро. уч. «Морфология критических и терминальных состояний». – М. : ЮрИнфоЗдрав, 2011. – С. 120-124.
8. Петухов А.Е. Химико-токсикологический анализ тианептина и его метаболитов в биологических объектах : автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук. – М., 2010. – 24 с.
9. Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons [Electronic Edition]. – London : Pharmaceutical Press, 2004.
10. Petuhov. A. GC/MS analysis of tianeptine and its metabolites in human urine // Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology – 2009. – № 105. – P.121.

Рецензенты:

Малкова Т.Л., д.фарм.н., заведующая кафедрой токсикологической химии ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, г. Пермь;
Михайловский А.Г., д.фарм.н., профессор кафедры общей и органической химии ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России, г. Пермь.