

ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДУЛОКСЕТИНА

КИРИЧЕК Александр Васильевич

начальник судебно-химического отделения

111 Главный государственный центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз

Министерства обороны РФ

ЛЕВИНА Валерия Максимовна

студент магистратуры

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева

г. Москва, Россия

В данной статье представлена разработка методики качественного обнаружения и количественного определения антидепрессанта – дулоксетина, как объекта судебно-химического и химико-токсикологического исследования. Для качественного анализа содержимого капсул использованы методы: ТСХ, УФ, ГХ, ГХ-МС. Количественное определение дулоксетина в биологическом материале (моче) осуществлено методом ГХ-МС.

Ключевые слова: антидепрессант СИОЗСН, дулоксетин, биоматериал, газовая хроматография, масс-спектрометрия, ТСХ, УФ.

XXI век можно назвать «веком депрессии». Депрессия – психическое расстройство, проявляющееся устойчивым снижением настроения, двигательной заторможенностью и нарушением мышления. Для лечения депрессии в качестве медикаментозной помощи, кроме психотерапии, врачи назначают антидепрессанты, то есть препараты, которые способны повлиять на нейромедиаторы в мозге. Механизм действия антидепрессантов осуществляется на уровне синаптической передачи, при этом повышается количество свободных нейромедиаторов в синаптической щели.

Дулоксетин – антидепрессант из группы СИОЗСН, то есть механизм действия препарата заключается в подавлении обратного захвата серотонина и норадреналина, входит в список самых «назначаемых» антидепрессантов в США [**Ошибка! Источник ссылки не найден.**].

Ни в одном из педиатрических исследований дулоксетина случаев суицида не зарегистрировано, в то время, как у взрослых такие случаи зарегистрированы были, но их количество недостаточно для того, чтобы сделать вывод об отравлении дулоксетином с суицидальной целью, однако на территории Российской Федерации данный препарат недостаточно хорошо исследован.

Материал и методы. Для качественного обнаружения методом ТСХ были использо-

ваны следующие системы растворителей: метанол: 25% раствор аммиака (100:1,5); толуол: этанол: триэтиламин (9:1:1); толуол: ацетон: этанол: 25% раствор аммиака (45:45:7:3). Хроматографирование проводили в каждой системе растворителей трижды с усреднением результата, с использованием следующих видов пластин: алюминиевые с подложкой из силикагеля фирмы Sorbfil (ПТСХ-АФ-Ф-УФ) 100*100 мм и стеклянные Merck (25 МРТLC) 100*100 мм Silicagel 60 F₂₅₄. Детектирование пятен в УФ-свете проводили при длинах волн 254 нм и 365 нм. В качестве реагентов для окрашивания использовали общеалкалоидные осадительные реактивы в соответствии с методическими указаниями: реактив Манделина, реактив йод-платината подкисленный, реактив Марки, реактив Фреде, реактив Либермана [2].

Для исследования методом УФ-спектроскопии использовался прибор фирмы «Agilent Technologies» 8453. Толщина кюветы 1 см. 10 мг исследуемого вещества – дулоксетин – растворяли в 10 мл воды. В качестве раствора сравнения использовали дистиллированную воду.

Идентификацию дулоксетина выполняли методом хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) проводили на приборе фирмы «Agilent Technologies» 6890 – 5973N, работавшем в режиме ионизации электронным ударом при 70 эВ и оборудованном капиллярной колон-

кой HP-5MS длиной 30 м и внутренним диаметром 0,25 мм. В качестве газа-носителя использовали гелий, поток составлял 1,0 мл/мин. Температура инжектора и интерфейса составляли 280°C. Температура колонки программировалась от 90 °С до 310 °С со скоростью 35 °С/мин. Время анализа 17 мин. Ввод образцов объемом 1 мкл осуществляли как методом без деления потока газа-носителя, так и при делителе 40:1. Полученные масс-спектры сравнивали по стандартной методике с масс-спектрами, представленными в методических указаниях. [3].

Для пробоподготовки использовали метод жидкость-жидкостной экстракции при рН=11-12. Использовали метод полного ионного сканирования, а также SIM-метод, являющийся целевым и позволяющий идентифицировать вещество по основным выбранным ионам.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования методом хроматографии в тонком слое на пластинах Sorbfil (ПТСХ-АФ-Ф-УФ) и Merck (25 МРТLC) с указанием наиболее эффективных систем растворителей.

Таблица 1

ЗНАЧЕНИЯ КОЭФФИЦИЕНТА R_f ДЛЯ ДУЛОКСЕТИНА В РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМАХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ НА РАЗЛИЧНЫХ ПЛАСТИНАХ

Системы растворителей		Значения коэффициента $R_{f \pm \Delta X}$	
		«Sorbfil»	«Merck»
1	Метанол: 25% раствор аммиака (100:1,5)	$R_f=0,2 \pm 0,01$	$R_f=0,15 \pm 0,01$
2	Толуол: Этанол: Триэтиламин (9:1:1)	$R_f=0,34 \pm 0,02$	$R_f=0,26 \pm 0,02$
3	Толуол: Ацетон: Этанол: 25% раствор аммиака (45:45:7:3)	$R_f=0,38 \pm 0,01$	$R_f=0,37 \pm 0,01$
4	Гексан: Хлороформ: Триэтиламин (20:1:1)	$R_f=0$	$R_f=0$

Наиболее оптимальной системой для хроматографии в тонком слое сорбента дулоксетина является система (Толуол: Ацетон: Этанол:

25% раствор аммиака (45:45:7:3)). Идентификация дулоксетина на пластинах для ТСХ химическими методами представлена в таблица 2.

Таблица 2

ОКРАШИВАНИЕ ДУЛОКСЕТИНА РАЗЛИЧНЫМИ РЕАКТИВАМИ

Название реактива	Результат окрашивания
Реактив Драгендорфа	Нет окрашивания
Реактив Манделина	Розовое окрашивание
FPN-реактив	Нет окрашивания
Реактив йодплатината подкисленный	Оранжево-коричневое окрашивание
Реактив Эрлиха	Нет окрашивания
Реактив Прохазки	Нет окрашивания
Реактив Марки	Темно-бурая окраска
Раствор нингидрина	Нет окрашивания
Раствор Прочного синего Б	Нет окрашивания
Реактив Фреде	Буро-фиолетовое окрашивание
Реактив Либермана	Темно-коричневое окрашивание

Реактив Эрсмана

Нет окрашивания

С реактивами FPN, Эрлиха, Прохазки, с раствором нингидрина, Прочного синего Б и реактивом Эрсмана дулоксетин окрашивания не дал.

При снятии УФ-спектра с использованием в качестве бланка раствора H_2O дулоксетин имеет 3 характерных пика. Максимальное поглощение происходит при длинах волн 218 нм, 290 нм и 320 нм. В электронной библиотеке подобный спектр отсутствует.

Полученные нами значения соответствуют справочным данным Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 4th [3].

В качестве подтверждающего метода использовали метод ГХ-МС. Дулоксетин является термолabileм соединением и разрушается при данном виде исследований. Решить вопрос об идентификации этим методом можно при помощи реагентов дериватизации, при реакции с которыми вещество (дулоксетин) превращается в более неполярное соединение с лучшими хроматографическими свойствами.

Дериватизацию проводили двумя способами.

А) С трифторуксусным ангидридом (TFA) с образованием соответствующего деривата.

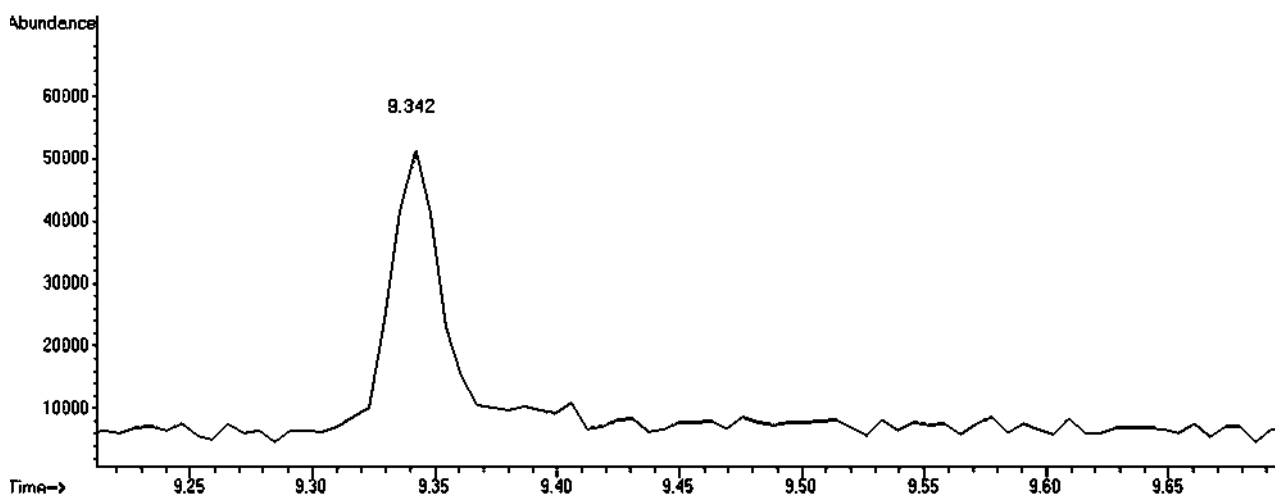


Рисунок 1. Хроматограмма полученного деривата (дулоксетин-TFA), время удерживания 9,34

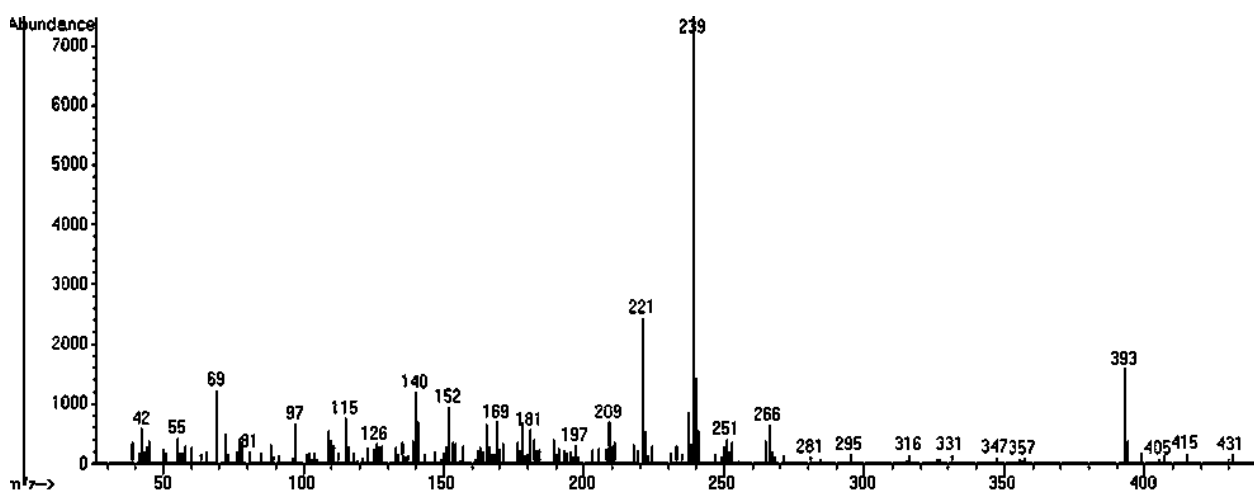


Рисунок 2. Масс-спектр полученного деривата (дулоксетин-TFA)

Б) С N,O-бис (триметилсилил) трифторацетамидом (TMS) с образованием соответствующего деривата.

Хроматографирование проводили без деления потока газа-носителя. Масс-спектры, представленные на рисунках ниже, получены

впервые и отсутствуют в известных библиотечках, поставляемых с хроматографическим оборудованием.

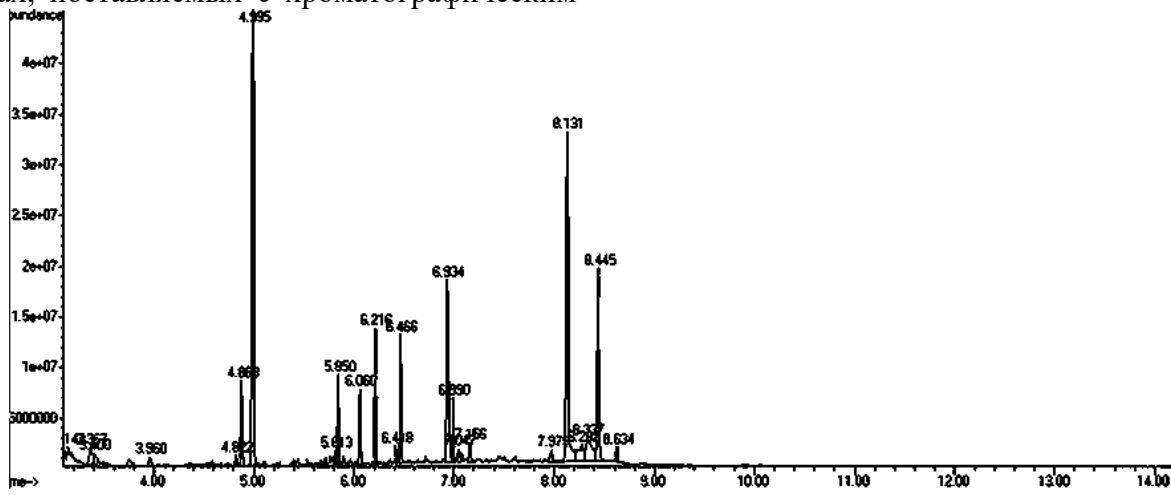


Рисунок 3. Хроматограмма полученного деривата, время удерживания 8,13

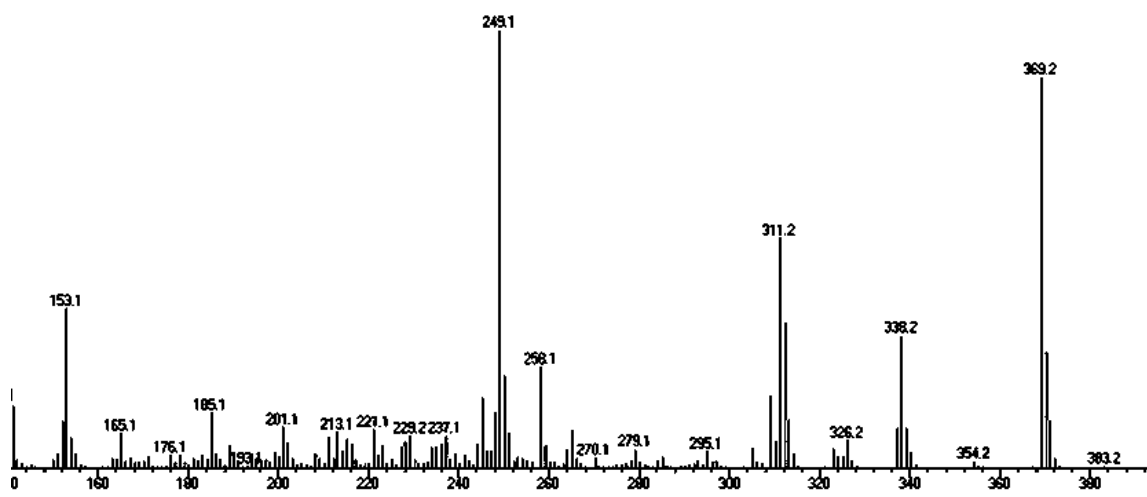


Рисунок 4. Масс-спектр полученного силильного деривата

Количественное определение дулоксетина в моче. Основным и наиболее доступным биологическим объектом для количественного определения является моча, поскольку именно с ней выводится около 70% лекарственного препарата. Исследуемый антидепрессант добавляли из расчета получения концентрации, составляющей 1 мкг в мл. К 10 мл мочи прибавляли 100 мкл раствора с концентрацией дулоксетина гидрохлорида 63,4 мг/мл. Последующие пробы были получены путем разведения.

Экстракцию исследуемой мочи с дулоксетином проводили в щелочной среде при pH=11-12, доводили pH до значения с помощью 25% раствора аммиака и экстрагировали трижды для полного извлечения.

растворы оставили выпариваться при комнатной температуре досуха, после чего их восстанавливали смесью хлороформ-этанол (1:1) до объема 0,5 мл для последующего исследования на хромато-масс-спектрометре.

Полученные спектры сравнивали с полученными нами ранее результатами.

Получить удовлетворительные результаты скан-методом не получилось, так как исследуемое вещество можно было обнаружить только при концентрациях 500, 250, 125 мг/л. Тогда было принято решение воспользоваться хроматографированием с режимом SIM-мониторинга по выбранным ионам, который является целевым и позволяет идентифицировать вещество по выбранным принципиальным ионам.

Результат SIM-хроматографии по выбранным ионам на пределе определения при концентрации дулоксетина в моче 125 мкг/мл представлен на рисунке 5.

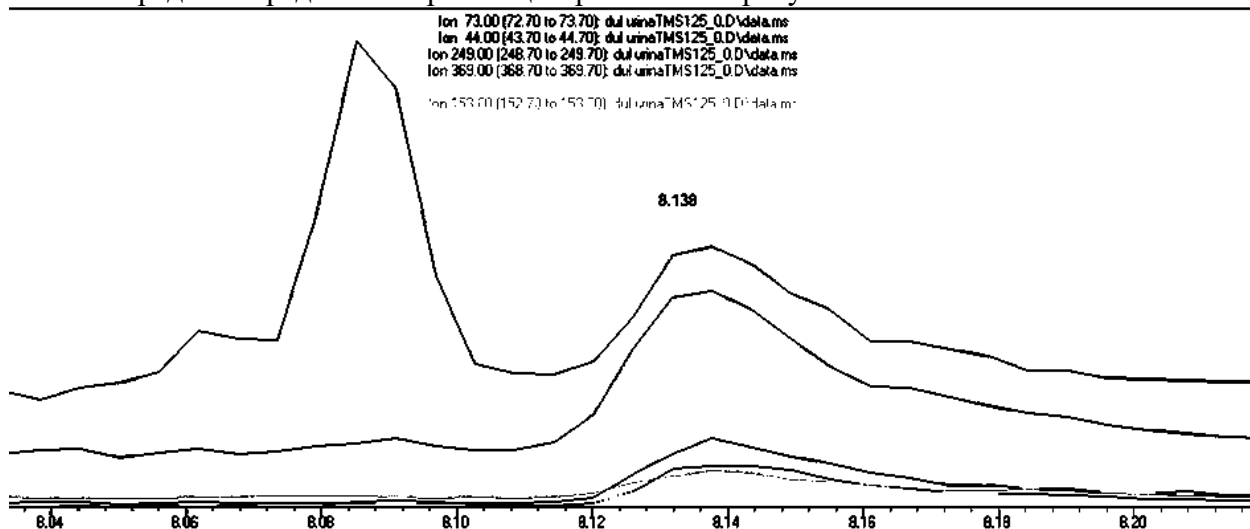


Рисунок 5. Дулоксетин-TMS по выбранным ионам на пределе определения при конц. в моче 125 мкг/мл

Построение калибровочного графика с такой высокой концентрацией нецелесообразно, так как при терапевтическом приеме препарата концентрация в моче будет намного ниже предела обнаружения. Однако исследование данным методом может быть реализовано для дулоксетина, находящегося в виде вещественного доказательства.

Выводы. В ходе работы была усовершенствована методика исследования дулоксети-

на методом ГХ-МС. Подобраны наиболее эффективные хроматографические системы и реагенты для детектирования дулоксетина методом ТСХ. Определен коэффициент хроматографической подвижности дулоксетина в разных системах растворителей. Подобраны условия проведения УФ-спектроскопии для дулоксетина. Метод ГХ-МС не подходит для качественного обнаружения и количественного определения дулоксетина в моче.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методические рекомендации по использованию метода тонкослойной хроматографии при исследовании наркотических средств и психотропных веществ. – М.: Экспертно-криминалистическое управление – 2004. – С. 12-15.
2. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 4th Ed. A. Moffat, Et Al., (Pharma. Press, 2011) BBS
3. Hrenchir T. 10 Most-Prescribed Antidepressant Medications. Retrieved from. – URL:<https://www.newsmax.com/health/health-wire/most-prescribed-antidepressant-medications/2015/09/02/id/673123/>.

CHEMICAL AND TOXICOLOGICAL EXAMINATION OF DULOXETINE

KIRICHEK Alexander Vasilievich

Head of the Forensic Chemistry Department
111 Main State Center for Forensic Medical and Forensic Examinations of
the Ministry of Defense of the Russian Federation

LEVINA Valeria Maksimovna

Undergraduate Student
Mendeleev University of chemical technology of Russia
Moscow, Russia

This article presents the development of a methodology for the qualitative detection and quantitative determination of the antidepressant duloxetine as an object of forensic chemical and chemical toxicological research. For the qualitative analysis of the contents of the capsules, the following methods were used: TLC, UV, GC, GC-MS. Quantitative determination of duloxetine in biological material (urine) was carried out by GC-MS method.

Keywords: SSRIS antidepressant, duloxetine, biomaterial, gas chromatography, mass spectrometry, TLC, UV.
