УДК 615.07:535.243

Лазицкая А.М. [1], Чмелевская Н.В. [1], Илларионова Е.А. [2]

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В АНАЛИЗЕ ПСИХОТРОПНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ПРИ КОМБИНИРОВАННЫХ ОТРАВЛЕНИЯХ

[1] ГБУЗ «Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы», Иркутск, Россия
[2] ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, Иркутск, Россия

Разработана унифицированная методика разделения и идентификации флуоксетина и тофизопама в комбинированных сочетаниях с психотропными лекарственными средствами методом тонкослойной хроматографии. При исследовании использовали хроматографические пластинки «Сорбфил» и «Армсорб». Обнаружение проводили с использованием УФ-осветителя и реактива Драгендорф. Выявлены оптимальные системы растворителей толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака в пропорциях 50:50:1 и 50:50:4 для идентификации комбинированных сочетаний с тофизопамом и флуоксетином соответственно.

Ключевые слова: *тофизопам, флуоксетин, система растворителей, метод тонкослойной хроматографии, комбинированные сочетания*

THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY IN THE ANALYSIS OF PSYCHOTROPIC AGENTS AT COMBINED POISONING

Lazitskaya A.M. [1], Chmelevskaya N.V. [1], Illarionova E.A. [2]

[1] Irkutsk Regional Agency of Forensic Medical Examination, Irkutsk, Russia
[2] Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia

Nowadays in chronic diseases structure mental derangement leading to disability and mortality of population comes to the front. As a result of illicit traffic of drugs extension, using psychoactive medicinal agents by drug abusers for intensification of intoxication and alleviation of abstinence syndrome has been fixed to increase. It results in occurrence of poisonings.
The main goal of the work is a development of strategy of chemical-toxicological analysis of psychoactive medical agents useable for combined poisonings via thin-layer chromatography method.
The research offers the results of studying the chromatographic behaviour of tofisopam and fluoxetine combined with psychoactive medicinal agents on chromatographic plates "Sorbfil UV-254" and "Armcorb UV-254" in general solvent systems.
It is shown that separation of psychoactive substances does not occur accurate enough. Therefore, it is necessary to develop particular chromatographic systems. A system of composition of toluol – acetone – 25% solution of ammonia is revealed and can be recommended in screening while carrying out a nondirectional analysis of tofisopam and fluoxetine. In this system, all combinations under research are detected.
A search of particular chromatographic systems was carried out by changing the quantity of toluol, acetone and ammonia. It is established that solvent systems of toluol – acetone – 25% solution of ammonia in a ratio 50:50:1 and 50:50:4 are optimal for identification of combinations with tofisopam and fluoxetine accordingly.
The developed method allows detecting tofisopam and fluoxetine in urine on a preliminary step of research both individually and in combinations with psychoactive medicinal agents.

Key words: *tofisopam, fluoxetine, eluent system, thin-layer chromatography, combined compositions*

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время психическое здоровье принадлежит к числу наиболее серьёзных проблем. Психические расстройства стоят на втором месте по распространённости после сердечно-сосудистых недугов. Это огромное количество нетрудоспособных граждан, которые нуждаются в постоянном или периодическом наблюдении врачей. Также психические расстройства составляют 40 % всех хронических заболеваний в целом.

Результаты последних исследований также подтверждают и более высокую частоту депрессий и обусловленных ими суицидов, нередко в сочетании со злоупотреблением наркотическими веществами. По данным различных авторов, от 25 до 40 % случаев отравления психотропными препаратами наблюдаются у больных с психической патологией [7].

Основными лекарственными препаратами, назначаемыми при психических расстройствах, являются вещества, действующие на центральную нервную систему, среди них широкое применение нашли производные фенилалкиламина и бензодиазепина.

Встречаются случаи отравления этими препаратами в сочетании с другими психотропными лекарственными средствами.

Ранее нами изучена хроматографическая подвижность тофизопама, флуоксетина и психотропных лекарственных веществ [5]. В данной работе было установлено, что система состава толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака (50:50:0,5) может быть рекомендована в скрининге при проведении ненаправленного анализа. Однако в этой хроматографической системе разделяются не все вещества, часто используемые в комбинированных сочетаниях с тофизопамом

и флуоксетином при одновременном их присутствии в анализируемой пробе. Например, в анализируемых пробах с тофизопамом не делятся амитриптилин и аминазин, тофизопам и хлорпротексен, а в пробах с флуоксетином не происходит разделения рисперидона и тофизопама, хлорпротексена, спитомина и амитриптилина.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Усовершенствовать унифицированную методику идентификации методом тонкослойной хроматографии тофизопама и флуоксетина в сочетании с психотропными препаратами при комбинированных отравлениях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали готовые хроматографические пластинки «Сорбфил УФ-254» (ТУ 26-11-17-89), «Армсорб УФ-254» (ТУ 6-09-37-918-88).

В качестве стандартных (контрольных) веществ были использованы фармацевтические субстанции тофизопама, флуоксетина, амитриптилина, аминазина, азалептина, алпрозолама, галоперидола, рисперидона, трифтазина, неулептила, феназепама, хлорпротексена, спитомина, сульпирида, мелипрамина содержание основного вещества в которых не ниже 99 %.

В качестве растворителей использовали воду очищенную, отвечающую требованиям Государственной фармакопеи [3], 0,1 М раствор хлористоводородной кислоты, 0,1 М раствор натрия гидроксида, хлороформ.

Детектирование веществ на хроматограммах проводили с использованием УФ-осветителя (длина волны 254 нм) и с помощью опрыскивания реактивом Драгендорфа.

При статистической обработке результатов анализа использовали методы Стьюдента и Фишера [2]. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез $p = 0{,}05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для увеличения значения ΔRf между зонами исследуемых веществ провели варьирование количеством частей подвижной фазы толуол – ацетон – 25% раствор аммиака (базовая система). Результаты экспериментальных исследований в виде диаграммы представлены на рисунке 1.

Из рисунка 1 видно, что подвижность таких лекарственных веществ, как флуоксетин, мелипрамин, спитомин, рисперидон, изменяется незначительно при варьировании количеством толуола и ацетона. Уменьшение в системе количества толуола приводит к увеличению подвижности хлорпротексена, алпрозолама и аминазина. Уменьшение количества ацетона в системе привело к снижению подвижности сульпирида, рисперидона, алпрозолама, тофизопама и аминазина. Таким образом, варьирование количества толуола и ацетона в системе не привело к существенному увеличению ΔR_f между зонами, а в некоторых случаях даже уменьшило разделяющую способность исследуемых соединений.

Учитывая тот факт, что исследуемые нами лекарственные препараты обладают основными свойствами, в ходе дальнейших исследований мы провели варьирование количества аммиака в системе.

Результаты хроматографирования комбинированных сочетаний на основе тофизопама и флуоксетина представлены на рисунках 2 и 3.

Из рисунков 2 и 3 видно, что изменение количества 25%-го раствора аммиака в системе по-разному сказывается на хроматографической подвижности исследуемых лекарственных веществ. Хроматографическая подвижность флуоксетина, алпрозолама, рисперидона, аминазина, тофизопама, мелипрамина, феназепама увеличивается при увеличении количества аммиака в системе, а галоперидола, хлорпротексена, трифтазина, амитриптилина, неулептила, наоборот, уменьшается. Всё это привело к сближению

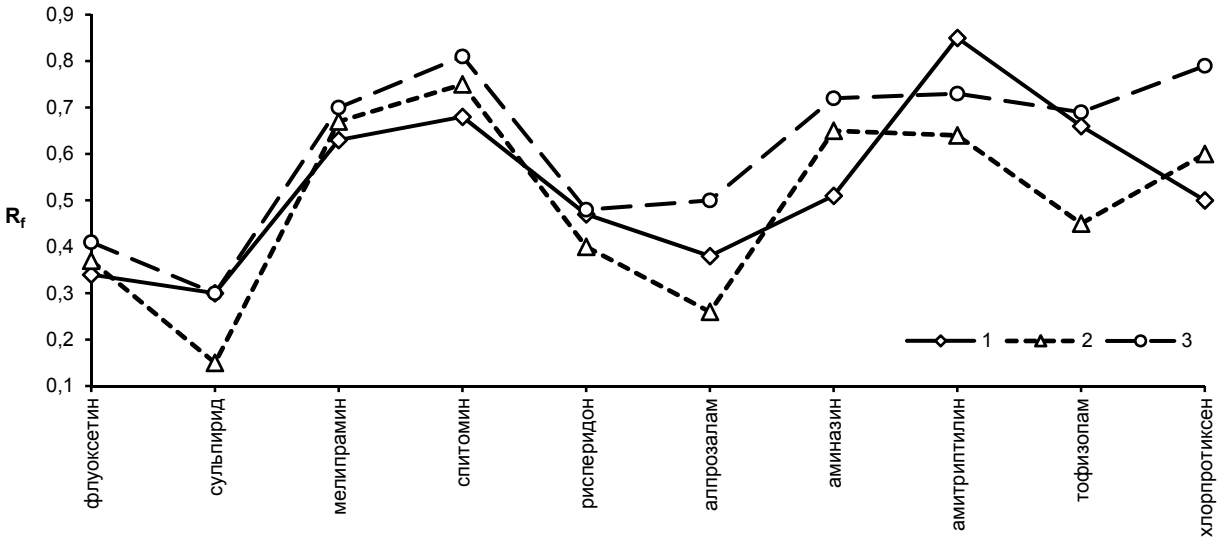

Рис. 1. Хроматографическая подвижность лекарственных веществ в системе толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака при различных соотношениях компонентов: Системы растворителей: 1 – толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака (50:50:1); 2 – толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака (50:25:1); 3 – толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака (25:50:1).

зон веществ на хроматограмме в системах толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака (50:50:2,5) и толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака (50:50:3). В этих системах не разделяются сочетания: флуоксетин – мелипрамин – хлорпротексен, флуоксетин – рисперидон – спитомин и флуоксетин – рисперидон – сульпирид.

В системе толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака (50:50:0,5) разделились тофизопам, феназепам, галоперидол, хлорпротексен, азалептил, неулептин, трифтазин, а в системах толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака (50:50:1), толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака (50:50:3,5), толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака (50:50:4) хорошо разделились флуоксетин, рисперидон, спитомин и флуоксетин, рисперидон, сульпирид. ΔRf между зонами флуоксетина, мелипрамина и хлорпротексена имеет наибольшее значение в системах толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака (50:50:0,5), толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака (50:50:1) и толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака (50:50:4). Для сочетаний флуоксетин – сульпирид – аминазин и флуоксетин – тофизопам – амитриптилин подходят практически все системы растворителей. Система растворителей толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака (50:50:4) является общей для разделения всех компонентов исследуемых комбинированных сочетаний с флуоксетином.

Система толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака (50:50:1) выбрана как оптимальная для разделения тофизопама и психотропных лекарственных веществ, а система толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака (50:50:4) – для разделения флуоксетина в комбинированных сочетаниях.

В данных системах хроматографирования определяли пределы обнаружения исследуемых веществ на хроматографических пластинках путём нанесения растворов рабочих стандартных образцов на линию старта в количестве от 0,05 до 50 мкг. После хроматографирования зоны адсорбции детектировали в

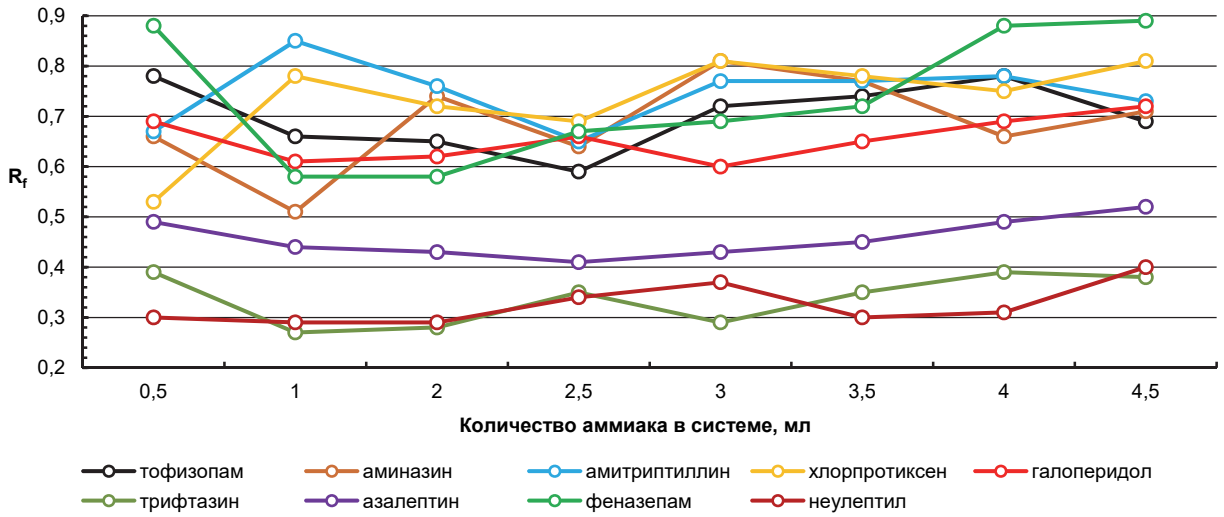

Рис. 2. Хроматографическая подвижность тофизопама и лекарственных веществ в системе толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака при различных количествах аммиака

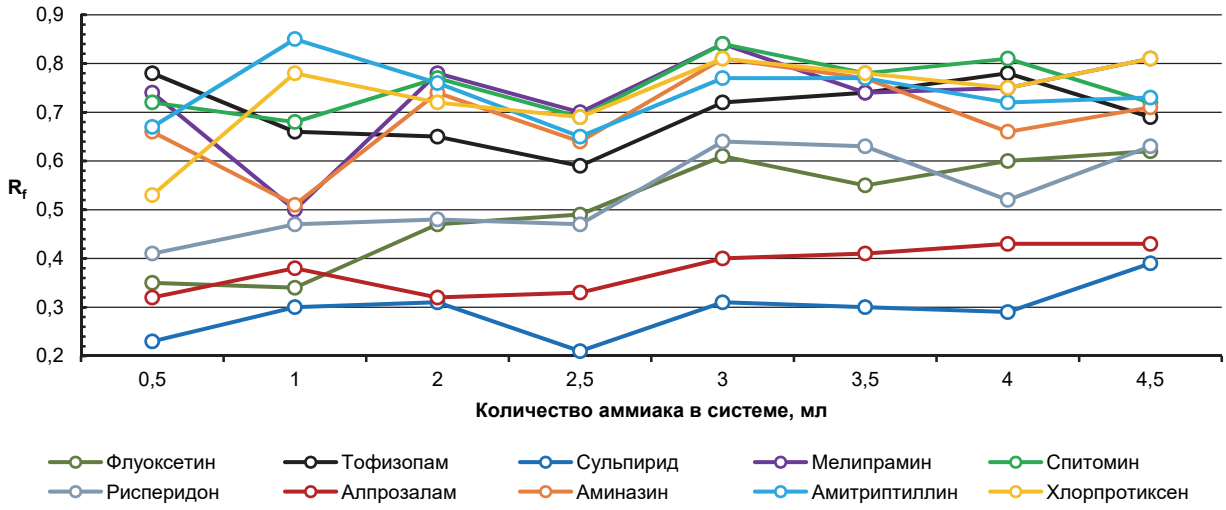

Рис. 3. Хроматографическая подвижность флуоксетина и лекарственных веществ в системе толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака при различных количествах аммиака

Таблица 1

Пределы обнаружения исследуемых веществ (мкг в пробе)

Исследуемые вещества	Проявители			
	УФ-свет (длина волны 254 нм)	реактив Драгендорфа	реактив Драгендорфа после обработки 10%-м раствором кислоты серной	пары йода
Флуоксетин	0,05	0,05	0,10	0,20
Хлорпротексен	0,05	0,06	0,12	0,30
Спитомин	0,05	0,06	0,12	0,30
Тофизопам	0,05	0,05	0,15	0,50
Сульпирид	0,08	0,10	0,20	2,00
Алпрозолам	0,05	0,05	0,10	0,20
Аминазин	0,05	0,05	0,10	0,10
Рисперидон	0,10	0,05	0,10	0,10
Амитриптилин	0,05	0,05	0,10	0,20
Мелипрамин	0,05	0,05	0,10	0,20
Трифтазин	0,05	0,05	0,15	0,50
Галоперидол	0,08	0,10	0,20	2,00
Неулептил	0,05	0,05	0,10	0,20
Феназепам	0,10	0,05	0,10	0,10
Азалептин	0,05	0,05	0,10	0,20

УФ-свете при длине волны 254 нм с помощью опрыскивания реактивом Драгендорфа; опрыскивания реактивом Драгендорфа после обработки 10%-м раствором серной кислоты; в парах йода. Результаты определения пределов обнаружения исследуемых веществ методом тонкослойного хроматографирования (ТСХ) представлены в таблице 1.

Пределы обнаружения исследуемых веществ составили от 0,05 до 2 мкг. Данные таблицы 1 свидетельствуют о том, что наиболее чувствительными проявителями для всех исследуемых веществ являются УФ-свет при длине волны 254 нм и реактив Драгендорфа.

Для валидационной оценки разработанной методики провели оценку пригодности хроматографических систем для хроматографического анализа модельных смесей тофизопама, флуоксетина и других психотропных лекарственных веществ [1].

Разработанную методику в дальнейшем использовали для анализа комбинированных сочетаний после извлечения их из мочи.

Изолирование лекарственных веществ из мочи проводили по методу А.А. Васильевой [6, 8], модифицируя условия изолирования с учётом химических свойств лекарственных веществ. Извлечение флуоксетина, тофизопама и других психотропных веществ проводили при pH = 9.0–10.0, используя в качестве экстрагента хлороформ [4, 6, 7, 8].

Методика качественного определения комбинированных сочетаний тофизопама, флуоксетина и психотропных лекарственных веществ в моче методом ТСХ

В колбу вместимостью 100 мл вносят 50 мл мочи, содержащей смесь исследуемых веществ, настаивают в течение 2 часов при комнатной температуре, периодически перемешивая шейкером S-3.08L (ELMI, Латвия). Полученный раствор переносят в делительную воронку, добавляют 0,1 М раствор натрия гидроксида до pH = 9.0–10.0, 20 мл хлороформа и затем проводят экстракцию двукратно в течение 20 минут. Хлороформные извлечения переносят в фарфоровую чашку и оставляют при комнатной температуре до удаления органического растворителя. Полученный сухой остаток растворяют в 2 мл хлороформа и перемешивают.

На линию старта пластинки «Армсорб» или «Сорбфил» размером 7,5 × 15 см микропипеткой наносят по 0,4 мл щелочных извлечений раствора смеси. Рядом наносят по 0,4 мл растворов стандартных образцов веществ-свидетелей (СОВС), содержащихся в смеси. Пластинку сушат на воздухе в течение 5 минут, а затем помещают в камеру со смесью растворителей: толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака в соотношении 50:50:1 – в случае комбинированных сочетаний с тофизопамом; толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака в соотношении 50:50:4 – в случае комбинированных сочетаний с флуоксетином, – и хроматографируют восходящим методом. Когда фронт растворителя пройдёт почти до конца пластинки, её вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 20 минут и проявляют в УФ-свете при длине волны 254 нм и путём опрыскивания реактивом Драгендорфа.

В таблице 2 представлены результаты хроматографирования в выбранных условиях тофизопама, флуоксетина и психотропных лекарственных веществ после извлечения их из мочи.

Таблица 2

Результаты хроматографирования с использованием метода тонкослойной хроматографии флуоксетина, тофизопама и психотропных лекарственных веществ в моче

Название вещества	R_f
толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака (50:50:1)	
Тофизопам	0,69 ± 0,01
Азалептин	0,46 ± 0,01
Трифтазин	0,21 ± 0,01
Неулептил	0,32 ± 0,02
Амитриптилин	0,86 ± 0,01
Галоперидол	0,64 ± 0,01
Аминазин	0,51 ± 0,012
Хлорпротиксен	0,88 ± 0,01
толуол – ацетон – 25%-й раствор аммиака (50:50:4)	
Флуоксетин	0,66 ± 0,01
Мелипрамин	0,70 ± 0,01
Хлопротиксен	0,91 ± 0,01
Алпрозолам	0,44 ± 0,02
Рисперидон	0,53 ± 0,01
Спитомин	0,83 ± 0,02
Сульпирид	0,23 ± 0,01
Амитриптилин	0,6 ± 0,01
Тофизопам	0,76 ± 0,02
Флуоксетин	0,66 ± 0,01
Аминазин	0,66 ± 0,01

ВЫВОДЫ

На основании проведённых исследований можно сделать вывод о том, что разработанная методика позволяет идентифицировать тофизопам и флуоксетин в комбинированных сочетаниях с психотропными лекарственными веществами (амитриптилин, аминазин, азалептин, алпрозолам, галоперидол, рисперидон, трифтазин, неулептил, феназепам, хлорпротексен, спитомин, сульпирид, мелипрамин) после извлечения их из мочи при их одновременном присутствии в анализируемой пробе.

Разработанная унифицированная методика разделения и идентификации флуоксетина и тофизопама в комбинированных сочетаниях с психотропными лекарственными средствами методом тонкослойной хроматографии внедрена в практику работы химического отделения Иркутского областного бюро судебно-медицинской экспертизы и Республиканского бюро судебно-медицинской экспертизы Республики Бурятия (г. Улан-Удэ).

ЛИТЕРАТУРА

REFERENCES

1. Арзамазцев А.П., Садчикова Н.П., Харитонов Ю.Я. Валидация аналитических методов // Фармация. – 2006. – № 4. – С. 8–12.

Arzamastsev AP, Sadchikova NP, Kharitonov YY. (2006). Validation of analytical methods [Validatsiya analiticheskikh metodov]. *Farmatsiya*, (4), 8-12.

2. Государственная фармакопея; 13-е. изд. – 2015. – Т. 1. – 1470 с.

State pharmacopoeia (2015). [*Gosudarstvennaya farmakopeya*], 1, 1470 p.

3. Государственная фармакопея; 13-е. изд. – 2015. – Т. 3. – 1294 с.

State pharmacopoeia (2015). [*Gosudarstvennaya farmakopeya*], 3, 1294 p.

4. Илларионова Е.А., Чмелевская Н.В., Муравьева Г.М. Разработка методик обнаружения пикамилона и циннаризина в комбинированных сочетаниях с психотропными лекарственными средствами // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2015. – № 4. – С. 68–71.

Illarionova EA, Chmelevskaya NV, Muravyova GM. (2015). Development of the methods for the detection of picamilon and cinnarizine in combinations with psychotropic agents [Razrabotka metodik obnaruzheniya pikamilona i tsinnarizina v kombinirovannykh sochetaniyakh s psikhotropnymi lekarstvennymi sredstvami]. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)*, (4), 68-71.

5. Лазицкая А.М., Илларионова Е.А. Химико-токсикологический анализ психотропных лекарственных средств при комбинированных отравлениях // Инновационные технологии в фармации: Сб. науч. тр. – Иркутск, 2016. – Вып. 3. – С. 146–152.

Lazitskaya AM, Illarionov EA. (2016). Chemical and toxicological analysis of psychotropic agnets in combined poisoning [Khimiko-toksikologicheskiy analiz psikhotropnykh lekarstvennykh sredstv pri kombinirovannykh otravleniyakh]. *Innovatsionnye tekhnologii v farmatsii: Sbornik nauchnykh trudov*, (3), 146-152

6. Саломатин Е.М., Николаева Э.Г. Судебно-химический анализ трупного материала на наличие лекарственных и наркотических соединений // Судебно-медицинская экспертиза. – 1999. – № 3. – С. 21–22.

Salomatin EM, Nikolaeva EG. (1999). Forensic chemical analysis of cadaveric material for drug and narcotic compounds [Sudebno-khimicheskiy analiz trupnogo materiala na nalichie lekarstvennykh i narkoticheskikh soedineniy]. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*, (3), 21-22.

7. Спивак Л.И., Райский В.А., Виленский Б. С. Осложнение психофармакологической терапии. – Л.: Медицина, 1988. – 168 с.

Spivak LI, Raiskiy VA, Vilensky BS. (1988). Complication of psychopharmacological therapy. [*Oslozhnenie psikhofarmakologicheskoy terapii*]. Leningrad, 168 p.

8. Чернова Л.В. Применение скрининговых методов и их сочетаний в химико-токсикологическом

анализе лекарственных веществ кислотного и основного характера // Актуальные вопросы и экспертной практики: Сб. науч. тр. – Новосибирск, 1998. – Вып. 3. – С. 211–214.

Chernova LV. (1998). Using screening methods and their combinations in chemical and toxicological analysis of medicinal substances of acid and basic nature [Primenenie skriningovykh metodov i ikh sochetaniy v khimiko-toksikologicheskom analize lekarstvennykh veshchestv kislotnogo i osnovnogo kharaktera]. *Aktual'nye voprosy i ekspertnoy praktiki: Sbornik nauchnykh trudov,* (3), 211-214.

Сведения об авторах
Information about the authors

Лазицкая Анна Марковна – судебно-медицинский эксперт ГБУЗ «Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы» (664022, г. Иркутск, б-р Гагарина, 4; тел. (3952) 22-93-90; e-mail: anlaz2005@yandex.ru)
Lazitskaya Anna Markovna – Forensic Medical Examiner at Irkutsk Regional Agency of Forensic Medical Examination (664022, Irkutsk, bulv. Gagarina, 4; тел. (3952) 22-93-90; e-mail: anlaz2005@yandex.ru)

Чмелевская Наталья Владимировна – кандидат фармацевтических наук, заведующая судебно-химическим отделением ГБУЗ «Иркутское областное бюро судебно-медицинской экспертизы»
Chmelevskaya Natalia Vladimirovna – Candidate of Pharmaceutical Sciences, Head of Forensic Chemical Department of Irkutsk Regional Agency of Forensic Medical Examination

Илларионова Елена Анатольевна – доктор химических наук, профессор, заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1; e-mail: lllelena24@rambler.ru)
Illarionova Elena Anatolievna – Doctor of Chemical Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry of Irkutsk State Medical University (664003, Irkutsk, ul. Krasnogo Vosstaniya, 1; e-mail: lllelena24@rambler.ru)