

ВИЯВЛЕННЯ ПРОДУКТІВ БІОТРАНСФОРМАЦІЇ МІЛНАЦИПРАНУ В СЕЧІ ЗА УМОВ ТШХ-СКРИНІНГУ

Вступ. Тонкошарова хроматографія (ТШХ) є найбільш доступним скринінговим підходом, який використовують у судовій токсикології. Для аналітичної діагностики отруєнь лікарськими препаратами методом ТШХ важливе значення має розробка умов виявлення в біологічних об'єктах як нативних сполук, так і продуктів їх біотрансформації.

Мета дослідження – розробити методику ізолювання препарату антидепресивної дії “Мілнаципран” із сечі людини за наявності продуктів його біотрансформації і встановити умови їх виявлення методом тонкошарової хроматографії, придатні для проведення аналітичної діагностики інтоксикацій тимолептиками.

Методи дослідження. Дослідження проводили з пробами сечі людини, зібраними після прийняття разової терапевтичної дози мілнаципрану. Сечу піддавали кислотному гідролізу та екстрагували антидепресант і його метаболіти з деструктату хлороформом з лужного середовища при рН 8–9. Супутні ендogenous домішки видаляли шляхом екстракції діетиловим етером з кислого середовища при рН 1. Для хроматографічного дослідження екстрактів використовували чотири рухомі фази, рекомендовані Міжнародною асоціацією судових токсикологів для ТШХ-скринінгу лікарських речовин, та хроматографічні пластини Merck. Кольорові реакції проводили на шматочках хроматографічних пластин з низкою найбільш поширених у хіміко-токсикологічному аналізі хромогенних реактивів. Метаболіти мілнаципрану ідентифікували методом мас-спектрометрії електронного удару.

Результати й обговорення. Встановлено параметри хроматографічної рухливості основного (N-дезетилмілнаципран) та мінорного (структури встановити не вдалось) метаболітів мілнаципрану, а також результати реакцій їх візуалізації хромогенними реактивами.

Висновки. Запропоновано умови ізолювання мілнаципрану та продуктів його біотрансформації із сечі людини. Розроблено методику виявлення нативної сполуки і метаболітів мілнаципрану в екстрактах із сечі методом ТШХ та кольорових реакцій після прийняття разової терапевтичної дози препарату. Методики рекомендовано для використання у практиці судової та клінічної токсикології.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мілнаципран; хіміко-токсикологічний аналіз; біоріднини; метаболіти; тонкошарова хроматографія; кольорові реакції; мас-спектрометрія.

ВСТУП. Мілнаципран – (1R, 2S)-цис-2-(амінометил)-N,N-діетил-1-фенілциклопропанкарбоксаміду гідрохлорид, є новітнім тимоаналептиком третього покоління, його фармакологічний ефект опосередковується вибіркоvim інгібуванням зворотного захоплення серотоніну та норадреналіну [1]. Мілнаципран найбільше використовують у фармакокорекції ендogenous депресій середнього і важкого ступенів. Особливістю його фармакологічної дії є відсутність помітного адренолітичного, холінолітичного та кардіотоксичного ефектів, що дає підставу віднести вказаний препарат до антидепресантів першого ряду [2]. При передозуванні мілнаципран чинить кардіотоксичну дію та здатний викликати серотоніновий синдром [3]. Перший випадок

фатального передозування препаратом було зареєстровано у 2008 р., при цьому аналітична діагностика смертельного отруєння показала надзвичайно високий рівень мілнаципрану в артеріальній і периферичній крові, який становив 20 та 21,5 мг/л відповідно [4].

У літературі наведено дані про рівень терапевтичної концентрації мілнаципрану в плазмі крові людини, що становив 679 нг/мл [5], 0,135–1,9 мг/л (нативна речовина) та 4,9 мг/л (сума нативної речовини і метаболітів) [6].

У процесі метаболічних перетворень в організмі людини мілнаципран не вступає у взаємодію із системою цитохрому P-450, що відрізняє його від інших антидепресантів. При цьому препарат не утворює активних продуктів біотрансформації, найбільша кількість виводиться

© С. В. Баюрка, С. А. Карпушина, Е. Ю. Ахмедов, 2021.

нирками, близько 85 % від прийнятої дози виводиться за 24 год. На 50–60 % мілнаципран екскретується із сечею в незміненому стані, близько 20–30 % – у вигляді кон'югату нативної речовини з кислотою глюкуроною [6], 20 % – як продукти кон'югації, переважно це мілнаципран карбамоїл-*O*-глюкуронід [5, 6] та *N*-дезетилмілнаципран (близько 8 % [5]).

Наведені в літературі біоаналітичні методи визначення мілнаципрану здебільшого ґрунтуються на використанні високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з тандемним мас-спектрометричним детектуванням (ВЕРХ-МС/МС) [7]. Однак інструментальна база методу ВЕРХ-МС/МС не завжди доступна для вітчизняних токсикологічних лабораторій. У практиці судово-токсикологічних досліджень широко застосовують систему скринінгу на основі тонкошарової хроматографії (ТШХ-скринінг). ТШХ-скринінг за універсальністю та селективністю перевершує імунохроматографічний скринінг та є більш доступним, ніж ВЕРХ-або газохроматографічний скринінг [5]. Однією з основних проблем, що виникають при токсикологічному дослідженні об'єктів біологічного походження на наявність лікарських речовин, є суттєва нестача даних щодо параметрів хроматографічної рухливості продуктів їх біотрансформації.

Мета дослідження – розробити методику ізолювання препарату антидепресивної дії “Мілнаципран” із сечі людини за наявності продуктів його біотрансформації і встановити умови їх виявлення методом тонкошарової хроматографії, придатні для проведення аналітичної діагностики інтоксикацій тимолептиками.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Мілнаципран приймав чоловік віком 46 років, який не мав захворювань, зокрема всередину 4 таблетки препарату “Іксел” (25 мг) (що відповідало разовій терапевтичній дозі препарату [2]), після споживання їжі. Сечу збирали протягом 14 год окремими порціями по 50 мл, починаючи з п'ятої години після прийняття антидепресанту. Порції біологічної рідини об'єднували та піддавали кислотному гідролізу за такою методикою.

Методика. До 20,00 мл сечі додавали кислоту хлоридну концентровану з розрахунку 0,10 мл кислоти на кожні 2,00 мл біологічної рі-

дини. Суміш нагрівали протягом 30 хв на киплячій водяній бані.

Отриманий гідролізат піддавали екстракційній очистці. Для цього його охолоджували, тричі збовтували в ділильній лійці з 7 мл діетилового етеру протягом 5 хв кожного разу. Після розділення фаз органічний розчинник відокремлювали та відкидали. Кислий гідролізат, який залишився після видалення з нього домішок, підлужували за допомогою 20 % розчину натрій гідроксиду до рН 8–9, тричі екстрагували основу мілнаципрану хлороформом по 10,00 мл кожного разу. Отримані екстракти об'єднували, фільтрували крізь складчастий паперовий фільтр, що містив 0,2 г безводного натрій сульфату, та випаровували на водяній бані при температурі 40 °С до видалення хлороформу. Сухий залишок розчиняли в 5,00 мл хлороформу, ретельно перемішували, переносили в мірну колбу місткістю 25,00 мл, доводячи тим же розчинником до зазначеного об'єму.

Під час попередніх дослідів з модельними розчинами мілнаципрану було вивчено його стійкість до обраних умов проведення кислотного гідролізу кон'югованих продуктів біотрансформації в сечі. Контроль можливої появи продуктів кислотної деструкції цього препарату здійснювали методом ТШХ. При порівнянні хроматограм гідролізату і стандартного розчину мілнаципрану жодних додаткових плям не було відмічено.

Хроматографічні дослідження проводили з використанням пластин Merck. Хроматограми послідовно розвивали у двох рухомих фазах: хлороформ та етилацетат – метанол – 25 % розчин амоній гідроксиду (85:10:5) (1) або метанол – 25 % розчин амоній гідроксиду (100:1,5) (2), або циклогексан – толуен – діетиламін (75:15:10) (3), або толуен – ацетон – етанол – 25 % розчин амоній гідроксиду (45:45:7,5:2,5) (4). Отримані хроматограми проявляли за допомогою реактиву Драгендорфа, модифікованого за Мун'є, або підкисленим розчином калій йодплатинату. Мілнаципран та продукти його біотрансформації елюювали з пластин метанолом. Отримані елюати використовували для проведення кольорових реакцій (табл. 1, 2). Ідентифікували метаболіти з використанням методу мас-спектрометрії: мас-спектрометр Varian 1200 L

Таблиця 1 – Показники хроматографічної рухливості мілнаципрану та продуктів його біотрансформації

Рухома фаза	Значення R _f (n=5; P=0,95)		
	мілнаципран	<i>N</i> -дезетилмілнаципран	мінорний метаболіт
1	0,32±0,03	0,91±0,03	0,11±0,03
2	0,27±0,03	0,77±0,03	0,07±0,02
3	0,06±0,02	0	0,02±0,01
4	0,41±0,02	0,71±0,02	0,16±0,03

Таблиця 2 – Результати візуалізації мілнаципрану та продуктів його біотрансформації за допомогою хромогенних реактивів

Реактив	Забарвлення		
	мілнаципран	<i>N</i> -дезетилмілнаципран	мінорний метаболіт
Драгендорфа	Оранжеве	Оранжеве	Оранжеве
Підкислений калій йодплатинат	Синьо-фіолетове	Синьо-фіолетове	Синьо-фіолетове
Ван-Урка	Жовте	Н.з.	Жовте
Нінгідрин	Рожево-фіолетове	Червоно-фіолетове	Червоно-фіолетове
Манделіна	Н.з.	Н.з.	Н.з.
Меркурій (II) нітрат	Синє	Н.з.	Н.з.
Фреде	Н.з.	Н.з.	Н.з.
Лібермана	Жовте, що змінюється на оранжеве	Оранжеве	Оранжеве
Ердмана	Н.з.	Н.з.	Н.з.
Маркі	Буро-коричневе	Коричневе	Жовто-коричневе
Кислота сульфатна концентрована	Н.з.	Н.з.	Н.з.

Примітка. Н.з. – немає забарвлення.

(Нідерланди), обладнаний подвійним квадрупольним мас-аналізатором, іонізація електронним ударом ($E_i=70$ eV). При цьому здійснювали пряме введення проби до іонної камери, а дослідження виконували в режимі повного сканування іонів. Хромато-мас-спектрометричні дослідження було проведено в науково-технологічному комплексі “Інститут монокристалів” Національної академії наук України.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Проби біорідини збирали, враховуючи дані літератури про екскреції мілнаципрану. Біотрансформація мілнаципрану переважно відбувається за 2 фазою метаболізму з утворенням глюкуронідів, певна кількість нативної речовини піддається *N*-деалілуванню [5, 6].

Для хроматографічного дослідження елюатів використовували чотири рухомі фази з переліку тих, які рекомендувала Міжнародна асоціація судових токсикологів (TIAFT) для проведення загального ТШХ-скринінгу наркотичних та сильнотоксичних речовин. За рекомендаціями TIAFT, одночасне застосування не менше трьох рухомих фаз, бажано з низькою кореляцією значень R_f , забезпечує надійне виявлення досліджуваної речовини при токсикологічному скринінгу [5]. Придатність обраних рухомих фаз для виявлення мілнаципрану в екстрактах із сечі ми показали в попередніх дослідженнях із ТШХ-скринінгу цього препарату за наявності ряду лікарських речовин антидепресивної дії [8].

На хроматограмах гідролізатів сечі ми детектували нативну речовину і два продукти метаболічних перетворень мілнаципрану: основний метаболіт – *N*-дезетилмілнаципран та мінорний метаболіт, ідентифікувати який не вдалося через низьку інтенсивність аналітичного сигналу на фоні “шуму” матричних компонентів (див. табл. 1, 2).

Як видно, продукти взаємодії мілнаципрану і його метаболітів з нінгідрином та реактивом Лібермана мали однакове забарвлення, що було селективним відносно біогенних компонентів матриці. Нативна речовина також утворювала селективне забарвлення з насиченим розчином меркурій (II) нітрату. У попередніх дослідженнях зі стандартними розчинами мілнаципрану в етанолі ми встановили чутливість виявлення препарату за допомогою хромогенних реактивів (мкг у пробі): 5,0 мкг (реактив Драгендорфа), 1,0 мкг (підкислений калій йодплатинат), 3,0 мкг (реактив Ван-Урка), 4,0 мкг (розчин нінгідрину), 6,0 мкг (насичений розчин меркурій (II) нітрату), 5,0 мкг (реактив Лібермана), 3,0 мкг (реактив Маркі).

Нативну речовину, виділену із сечі, та основний метаболіт мілнаципрану (за розміром плями на хроматограмах) ідентифікували методом мас-спектрометрії, використовуючи бібліотеку мас-спектрів NIST 08, та за молекулярною масою, яку визначали за розташуванням відповідних молекулярних піків у мас-спектрах (рис. 1, 2).

ВИСНОВКИ. Запропоновано умови детектування мілнаципрану і його метаболітів у сечі людини за допомогою методу ТШХ після прийняття разової терапевтичної дози антидепресанту. Встановлено параметри хроматографічної рухливості основного (*N*-дезетилмілнаципран) та мінорного метаболітів мілнаципрану в чотирьох скринінгових ТШХ-системах, а також результати реакцій їх візуалізації хромогенними реактивами. Методики рекомендовано для використання у практиці судової та клінічної токсикології.

Конфлікт інтересів. Автори підтверджують відсутність конфлікту інтересів у цій публікації.

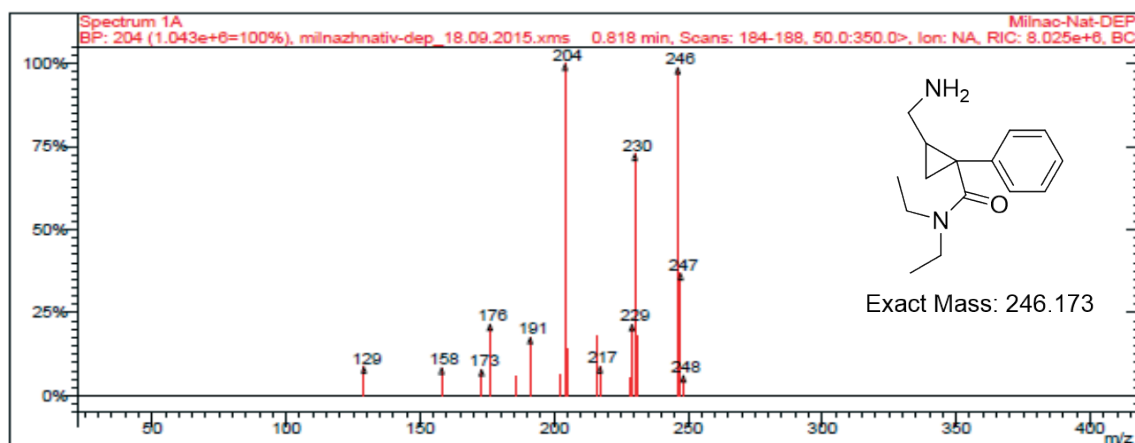


Рис. 1. Мас-спектр мілнаципрану, екстрагованого із сечі (основні іони m/z 204, 246, 230, 247, 176, 229, 191, 129, 217, 158, 179, 248).

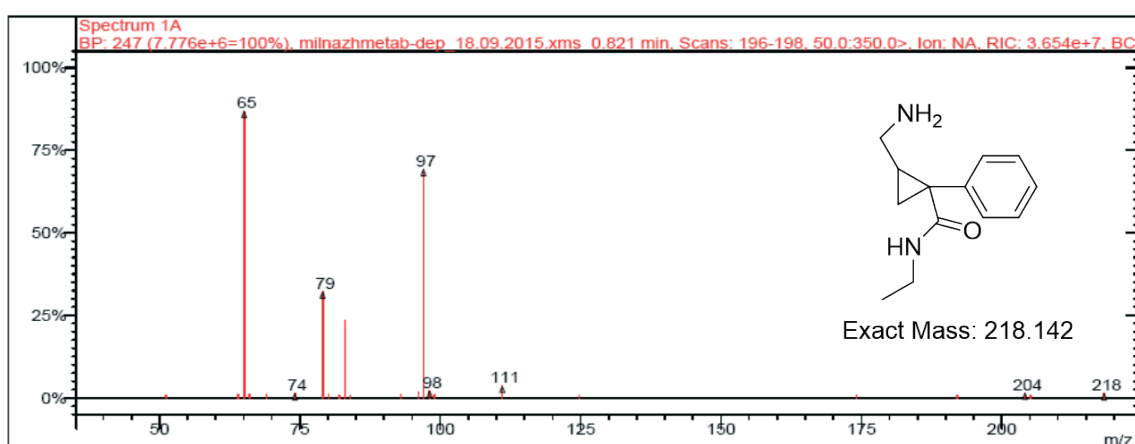


Рис. 2. Мас-спектр основного метаболіту мілнаципрану – *N*-дезетилмілнаципрану (основні іони m/z 65, 97, 79, 83, 111, 98, 74, 204, 218).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors and the influence of binding affinity (K_i) on analgesia / M. Raouf, A. J. Glogowski, J. J. Bettinger, J. Fudin // *J. Clin. Pharm. Ther.* – 2017. – **42**. – P. 513–517.
2. Машковский М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. – 16-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая Волна, 2020. – 1216 с.
3. Levine M. Cardiotoxicity and serotonin syndrome complicating a Milnacipran overdose / M. Levine, A. T. Carry, A. Connor // *J. Med. Toxicol.* – 2011. – **7**, No. 4. – P. 312–316.
4. Fanton L. Fatal intoxication with milnacipran / L. Fanton, F. Bevalot, H. Grait // *J. Forensic Leg. Med.* – 2008. – **15**, No. 6. – P. 388–390.
5. Moffat A. C. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material / A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop. – 4-th ed. – London, Chicago: Pharmaceutical Press, 2011. – 2736 p.
6. Excretion and metabolism of milnacipran in humans after oral administration of milnacipran hydrochloride / F. Li, C. Chin, J. Wangsa, J. Ho // *Drug. Metab. Dispos.* – 2012. – **40**, No. 9. – P. 1723–1735.
7. Kanalaria K. Bioanalytical method development and validation of milnacipran in rat plasma by LC–MS/MS detection and its application to a pharmacokinetic study / K. Kanalaria, N. T. Hwisac, B. R. Chanduc // *J. Pharm. Anal.* – 2013. – **3**, No. 6. – P. 481–488.
8. Баюрка С. В. Аналітична діагностика отруєнь мілнаципраном / С. В. Баюрка, С. А. Карпушина, В. П. Мороз // *Клініч. фармація.* – 2016. – **20**, № 4. – С. 62–65.

REFERENCES

1. Raouf, M., Glogowski, A.J., Bettinger, J.J., & Fudin, J. (2017). Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors and the influence of binding affinity (K_i) on analgesia. *J. Clin. Pharm. Ther.*, 42, 513-517.
2. Mashkovskii, M.D. (2020). *Medicines*. Moscow: Izdatelstvo Novaya Volna [in Russian].
3. Levine, M., Carry, A.T., & Connor, A. (2011). Cardiotoxicity and serotonin syndrome complicating a Milnacipran overdose. *J. Med. Toxicol.*, 7 (4), 312-316.
4. Fanton, L., Bevalot, F., & Grait, H. (2008). Fatal intoxication with milnacipran. *J. Forensic Leg. Med.*, 15 (6), 388-390.
5. Moffat, A.C., Osselton, M.D., & Widdop, B. (2011). *Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. (4-th ed.)*. London, Chicago: Pharmaceutical Press.
6. Li, F., Chin, C., Wangsa, J., & Ho, J. (2012). Excretion and metabolism of milnacipran in humans after oral administration of milnacipran hydrochloride. *Drug. Metab. Dispos.*, 40 (9), 1723-1735.
7. Kanalaa, K., Hwisac, N.T., & Chanduc, B.R. (2013). Bioanalytical method development and validation of milnacipran in rat plasma by LC-MS/MS detection and its application to a pharmacokinetic study. *J. Pharm. Anal.*, 3 (6), 481-488.
8. Baiurka, S.V., Karpushyna, S.A., & Moroz, V.P. (2016). Analytical diagnosis of milnacipran poisoning. *Clin. Pharmacy*, 20 (4), 62-65.

S. V. Baiurka, S. A. Karpushyna, E. Yu. Akhmedov
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

DETECTION OF MILNACIPRAN BIOTRANSFORMATION PRODUCTS IN URINE UNDER TLC-SCREENING

Summary

Introduction. Thin layer chromatography screening is the most accessible type of screening procedure that is used in forensic toxicology. For the analytical diagnosis of drug poisoning by the TLC method, it is important to develop conditions for the detection of both native compounds and products of their biotransformation in the biological samples.

The aim of the study – to develop a method for isolating the antidepressant drug milnacipran from human urine in the presence of its biotransformation products and determine the conditions for their detection by thin layer chromatography, suitable for analytical diagnostics of thymoleptic intoxication.

Research Methods. The study was carried out with human urine samples collected after taking a single therapeutic dose of milnacipran. The urine was subjected to the acid hydrolysis and the antidepressant and its metabolites were extracted from the destructure with chloroform from an alkaline medium at pH 8–9. Concomitant endogenous admixtures were removed by extraction with diethyl ether from an acidic medium at pH 1. For the chromatographic study of the extracts, four mobile phases recommended by the International Association of Forensic Toxicologists for TLC screening of drugs, and Merk chromatographic plates were used. Colour reactions were carried out on pieces of chromatographic plates with a range of chromogenic reagents most common used in chemical-toxicological analysis. Metabolites were identified by electron impact mass spectrometry.

Results and Discussion. The parameters of the chromatographic mobility of the main (N-desethylmilnacipran) and minor (the structure could not be established) metabolites of milnacipran were determined, as well as the results of the reactions of their visualization with chromogenic reagents.

Conclusions. Isolation conditions for milnacipran and its biotransformation products from human urine have been proposed. The method of the detection of the native compound and milnacipran metabolites in the extracts from urine by TLC and colour reactions after taking a single therapeutic dose of the drug has been developed. The methods are recommended for use in the practice of forensic and clinical toxicology.

KEY WORDS: milnacipran; chemical-toxicological analysis; biofluids; metabolites; thin layer chromatography; color reactions; mass spectrometry.

Отримано 08.11.21

Адреса для листування: С. А. Карпушина, Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України, вул. Пушкінська, 53, Харків, 61002, Україна, e-mail: svitkr@gmail.com.