

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ТИАНЕПТИНА В МОЧЕ

А. Е. Петухов^{1,2}, Г. В. Раменская², Е. А. Симонов^{1,3}, Е. Б. Морозова¹,
О. Б. Дорогокупец¹, И. А. Тюрин¹, А. В. Смирнов¹

¹ Наркологическая клиническая больница № 17 Департамента Здравоохранения г. Москвы,

² Московская медицинская академия имени И. М. Сеченова,

³ Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева,

Поступила в редакцию 07.09.2009 г.

Аннотация. Статья посвящена подбору оптимальных условий для изолирования из мочи и дальнейшего анализа тianeptine и его метаболитов методом хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС). На основе проведенных исследований предлагаются методики анализа тianeptine и его метаболитов в моче лиц, употребляющих тianeptine с немедицинским целями.

Ключевые слова: тianeptine, метаболизм тianeptine, моча, изолирование, ГХ/МС.

Abstract. This paper is devoted to selection of optimum conditions for isolation from urine both the further analysis tianeptine and its metabolites by GC/MS method. On the basis of the spent researches analysis techniques of tianeptine and its metabolites in urine from the persons used tianeptine with not medical purposes are offered.

Keywords: tianeptine, tianeptine metabolism, urine, isolation, GC/MS.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время в России отмечается значительное увеличение немедицинского использования атипичного трициклического антидепрессанта редианизмирующего действия — тianeptine (*Tianeptine*, Коаксил®) [5, 6]. В медицинской практике препараты этого вещества используются при лечении депрессивных состояний разной степени тяжести, в том числе у больных хроническим алкоголизмом в абстинентный период; тревожно-депрессивного состояния, отягченного соматическими жалобами; органических депрессивных и тревожных расстройств; неврастении, а также острой реакции на стресс и посттравматическое стрессовое расстройство.

При регулярном применении доз, в десятки раз превышающих медицинские, и исключительно при внутривенном пути введения, он вызывает тяжелую лекарственную зависимость. Как правило, с целью наркотического употребления кустарно изготавливаются инъекционные варианты таблетированных препаратов этого вещества. При этом клиническая картина интоксикации сходна с таковой при героиновой зависимости, из-за чего многие наркоманы заменяют им героин. Однако такое сход-

ство распространяется и на синдром отмены. Частое злоупотребление кустарных препаратов тianeptine приводит к тяжким последствиям: слепоте, ампутациям конечностей, быстрому летальному исходу.

Тianeptine (Коаксил®) — оригинальный трициклический антидепрессант дибензотиазепинового ряда. Согласно литературным данным, в организме человека основным путем его метаболизма является β -окисление алифатического заместителя при атоме азота, в результате которого образуются два активных метаболита: с боковой цепью из пропионовой кислоты (метаболит МС₃) и валериановой кислоты (метаболит МС₅). Кроме этого в моче могут присутствовать продукты N-деалкилирования этого вещества. За 24 часа в неизменном виде из организма выводится менее 3% поступившей дозы [2—4].

В молекуле тianeptine присутствуют химические группировки кислого и щелочного характера, а также длинный липофильный, алифатический «хвост». У него относительно высокая молекулярная масса. Все эти факторы создают затруднения при анализе биожидкостей на факт присутствия тianeptine методами газовой хроматографии и газовой хроматографии — масс спектрометрии. Для успешного исследования этими методами таких веществ обычно осуществляется дериватизации активных группировок одним или несколькими

© Петухов А. Е., Раменская Г. В., Симонов Е. А., Морозова Е. Б., Дорогокупец О. Б., Тюрин И. А., Смирнов А. В., 2009

ми реактивами. Однако, как показывает практика, в случае употребления тианептина с целью получения наркотического эффекта, в моче находятся продукты его метаболизма или распада. Немаловажное значение при этом имеет тот факт, что присутствие таких продуктов устанавливается в ходе исследования мочи стандартными методами анализа, принятыми ХТА НКБ № 17 ДЗ г. Москвы. Нами уже были опубликованы результаты исследований продуктов метаболизма тианептина методами тонкослойной и газовой хроматографии [1, 7]. Основной целью данной работы являлось изучение продуктов метаболизма тианептина в организме человека, обнаруживаемых в моче в ходе исследований методом ГХ-МС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспериментальные данные, представленные в настоящей работе, получены на реальных пробах мочи — биопробы лиц, проходивших освидетельствование в кабинетах наркологической экспертизы Отделения медицинского освидетельствования на состояние опьянения (ОМОСО) НКБ № 17 ДЗ г. Москвы, а также лиц, проходящих лечение в отделениях НКБ №17 ДЗ г. Москвы. Всего за период проведения работы с мая 2008 г. по сентябрь 2009 г. из общего числа поступивших на исследование лиц было выявлено 230 образцов мочи, в которой присутствовали продукты метаболизма или распада тианептина.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Анализ проводили на газовом хроматографе Agilent 6890N с масс-селективным детектором Agilent 5973 и автоинжектором Agilent 7683 (США), оборудованном хроматографической кварцевой капиллярной колонкой FactorFOUR фирмы Varian (США) длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм, толщиной фазы 0,25 мкм. Газ-носитель — гелий, скорость потока газа-носителя через колонку 1,2 мл/мин, линейная скорость 41 см/с. Температура испарителя поддерживалась 250° С. Режим программирования температуры термостата колонки: 110° С — 1 мин, от 110° С до 290° С нагревали со скоростью 25° С/мин и выдерживали 7,8 мин при конечной температуре. Общее время анализа — 16 мин. Ввод пробы осуществляли в режиме с делением потока (split) 1:20. Объем вводимой пробы составляет 1 мкл. Температура квадруполя 150° С, температура источника ионов 230° С. Использовалась ионизация электронным ударом при 70 эВ в режиме сканирования полного ионного потока (SCAN) в диапазоне от 50 до 550 m/z .

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пробы мочи по 2 мл доводили до значений pH, находящихся в интервале 1—2; 3—4; 7 и 9—10 и добавляли по 3 мл диэтилового эфира. Для создания pH в интервале от 1 до 4 использовали 2N HCl, а для pH 9—10 — 5N KOH. После встряхивания (10 мин при 120 об/мин) и центрифугирования (10 мин при 3000 об/мин) верхний органический слой осторожно отбирали одноразовой пластиковой пипеткой и переносили для выпаривания в стеклянную коническую пробирку объемом 10 мл. Выпаривание осуществляли при комнатной температуре в токе холодного воздуха до сухого остатка. Сухой остаток смывали 200 мкл 96 % этилового спирта и переносили в стеклянные вставки на 300 мкл для виал на 2 мл. В качестве внутреннего стандарта в конечный экстракт добавляли 20 мкл 0,05 % метанольного раствора дифениламина фирмы «Sigma» (США).

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ экстрактов, полученных как при кислых, так и при щелочных значениях pH, показал наличие в них метаболита тианептина MC_5 . Интересен тот факт, что в процессе анализа детектируется метаболит MC_5 (а именно его лактонное производное), а сам тианептин и его метаболит MC_3 не детектируется.

Нами было сделано предположение о том, что процесс ввода пробы в инжектор хроматографа, а также процесс хроматографического разделения компонентов проводится при относительно высоких температурах, метаболит MC_5 в этих условиях теряет воду с образованием лактонного производного MC_5 -H₂O. Схема процесса образования лактона приведена на рис. 1.

Данная формула подтверждается тем фактом, что обработка экстрактов мочи, как кислых, так и щелочных, уксусным или трифторуксусным ангидридами, метилйодидом в щелочной среде или силилирующими реактивами не приводит к уменьшению или полному исчезновению метаболита.

Кроме основного метаболита (MC_5), в экстрактах, полученных при pH 3—4 также присутствуют дезалкилдезаминотианептин и дезалкилдезаминонортианептин, а в экстрактах, полученных при pH 9—10 — дезалкилтианептин и метаболит, структуру которого на данный момент установить не удалось. В целом выход метаболита MC_5 при использовании пробоподготовки с созданием щелочных значений pH мочи обычно больше, чем при кислых значениях. Результаты приведены в табл. 1.

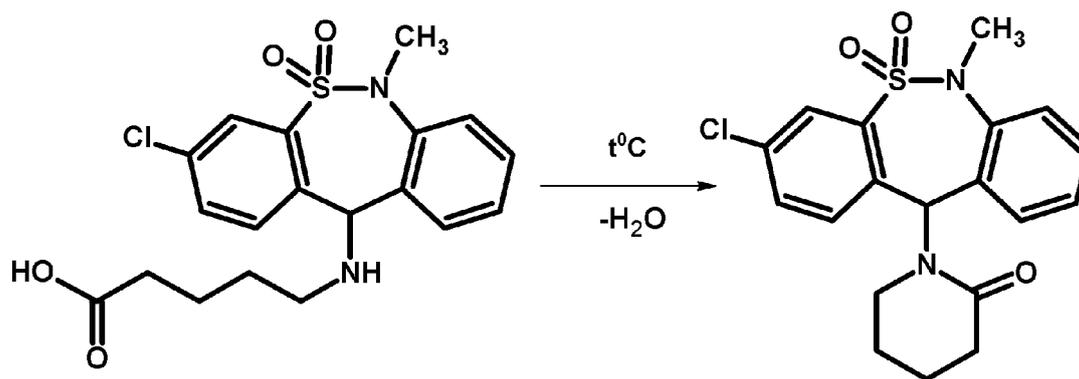


Рис. 1. Процесс образования лактона метаболита МС₅

Таблица 1

Площади пиков метаболитов тианептина при использовании различных способов пробоподготовки (анализ методом ГХ/МС)

Метаболит \ рН	1—2 (n=10)	3—4 (n=10)	7 (n=10)	9—10 (n=10)
МС ₅	52,75 ± 1,79	84,04 ± 2,44	114,79 ± 1,91	98,73 ± 1,41
Метаболит 1	0	0	0	11,61 ± 2,63
Критерий <i>t</i> Стьюдента расчетный для МС ₅ , P=0,95	<i>t</i> 2 и 3 — 9,81 <i>t</i> 2 и 4 — 21,85 <i>t</i> 2 и 5 — 18,77 <i>t</i> 3 и 4 — 9,29 <i>t</i> 3 и 5 — 5,03 <i>t</i> 4 и 5 — 6,25 Все значения достоверно отличаются			
Критерий <i>t</i> Стьюдента табличный, P=0,95	2,23			

В некоторых образцах мочи, после пробоподготовки при щелочных значениях рН, детектируется еще ряд метаболитов, структурная формула которых на сегодняшний день пока не установлена. Хроматограмма кислого экстракта мочи человека, принимавшего Коаксил®, и масс-спектры метаболитов представлены на рис. 2. Аналогично, для щелочного экстракта — на рис. 3.

На основании полученных данных нами предложена возможная схема метаболизма тианептина, которая представлена на рис. 4.

На основании того, что основной метаболит тианептина МС₅ изолируется из мочи как при кислых значениях рН (рН=3—4), так и при щелочных (рН=9—10), для хромато-масс-спектрометрического анализа его возможно использование как кислых, так и щелочных экстрактов. При этом на

практике последние экстракты используются для выявления продуктов распада тианептина методами тонкослойной и газовой хроматографии или хромато-масс-спектрометрии, а кислые, при необходимости, для подтверждения полученных результатов.

Вышеописанная методика широко используется в практике ХТЛ НКБ № 17 ДЗ г. Москвы.

ВЫВОДЫ

Показана возможность использования метода газовой хроматографии — масс спектрометрии метаболитов или продуктов тианептина, употребленного человеком с целью получения наркотического эффекта, без дериватизации.

Показано, что основной метаболит тианептина может быть изолирован из мочи при кислых, а так

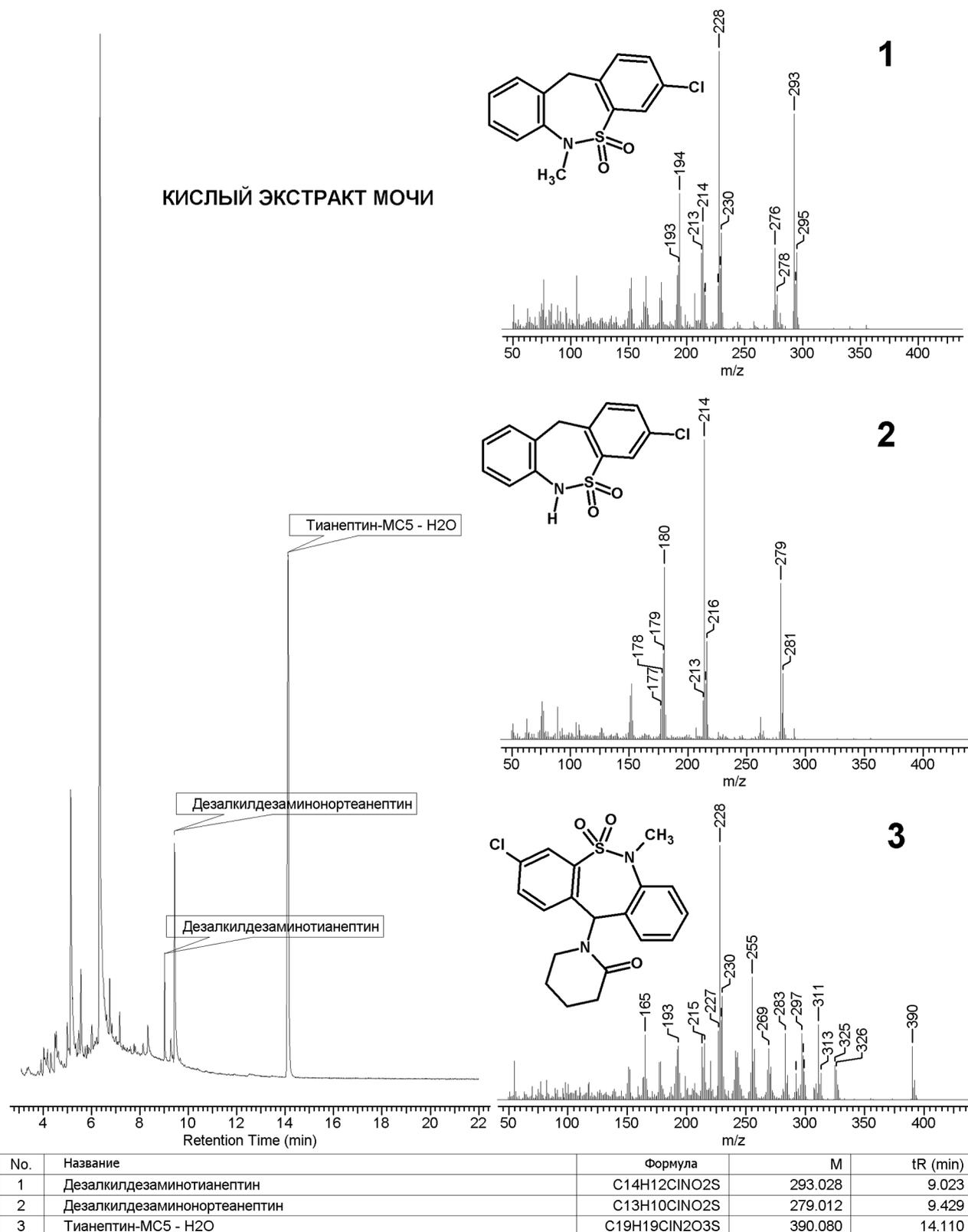


Рис. 2. Хромотограмма кислого экстракта мочи и масс-спетры метаболитов

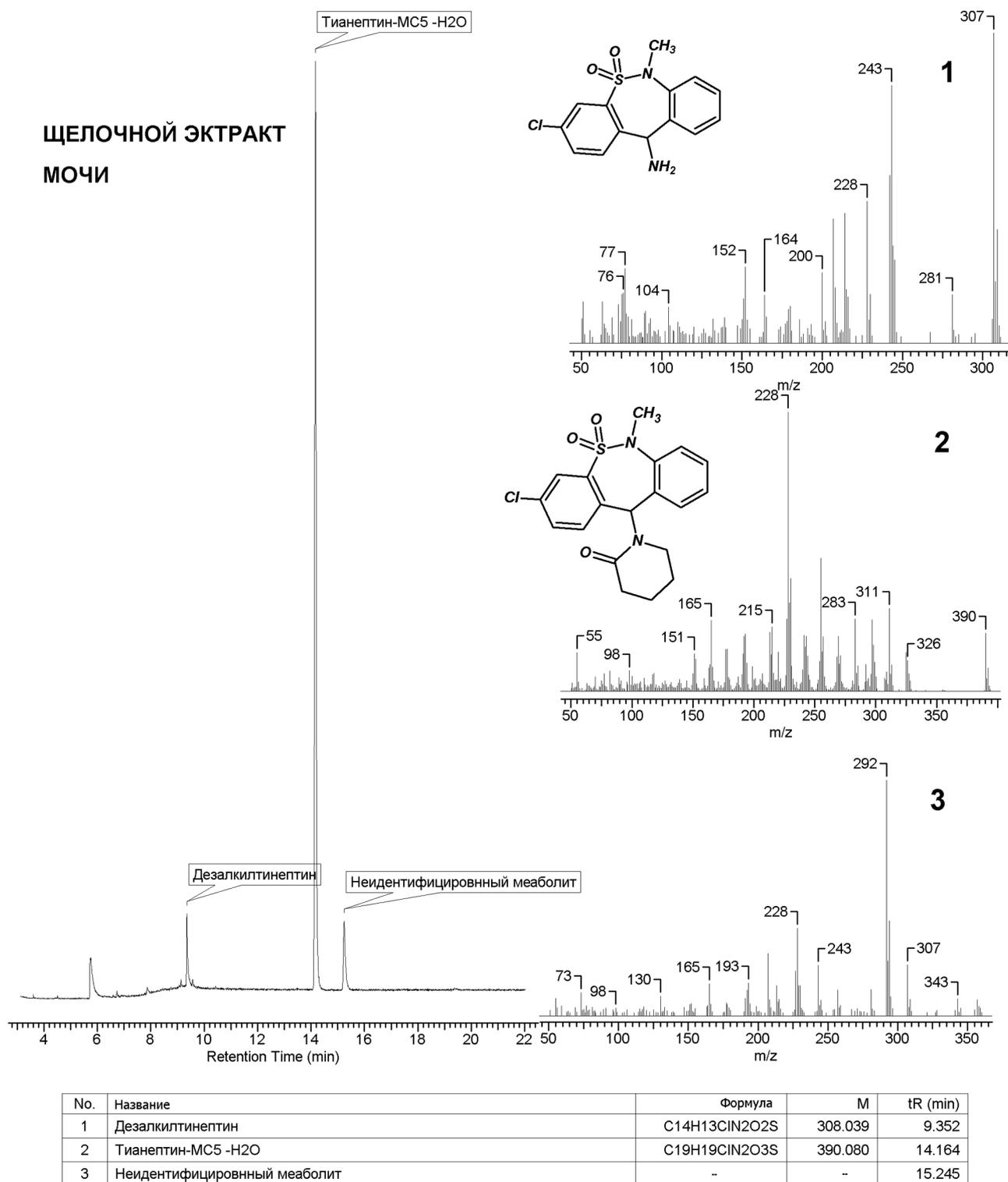


Рис. 3. Хроматограмма щелочного экстракта мочи и масс-спектры метаболитов

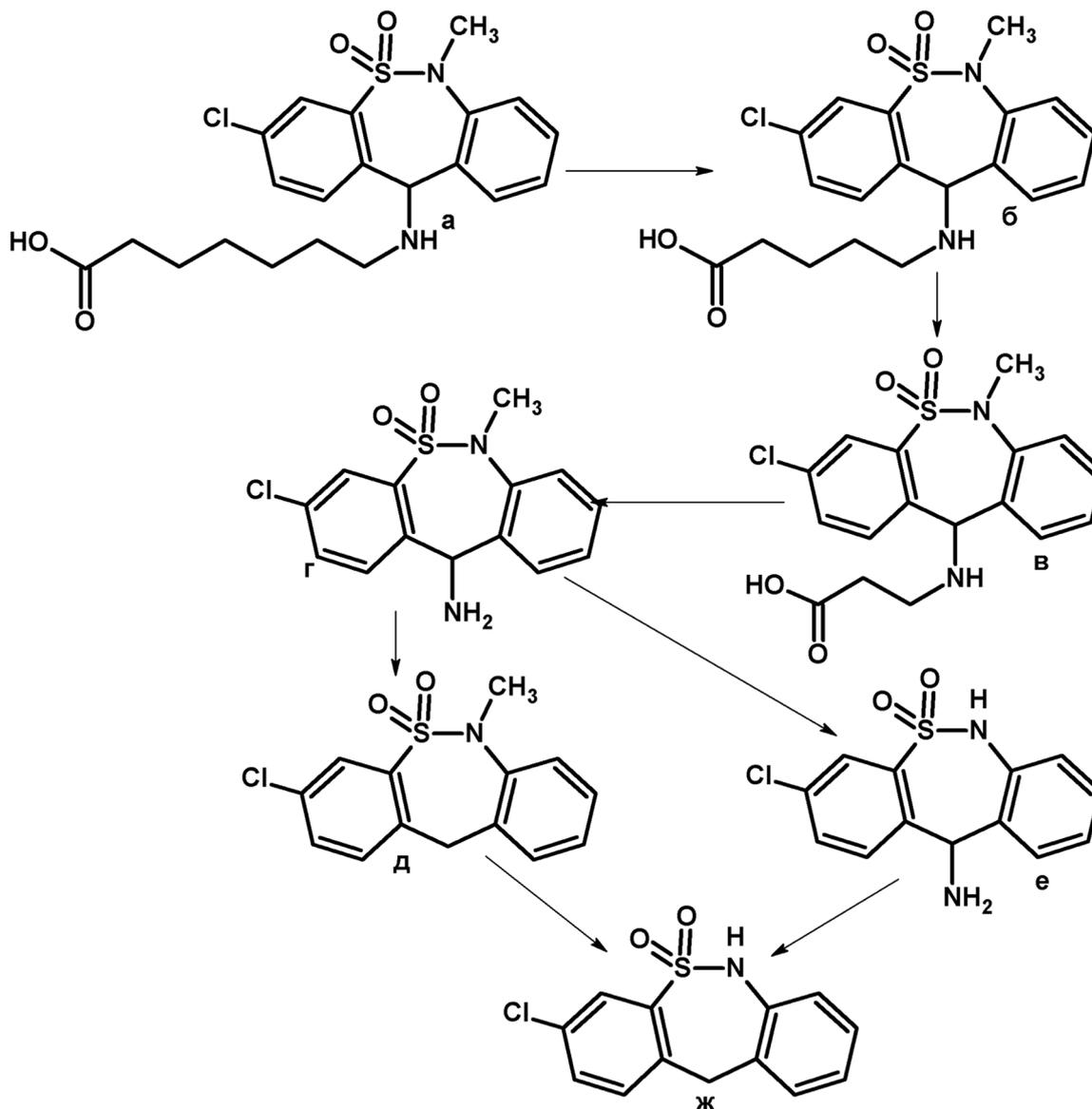


Рис. 4. Схема метаболизма тianeптина (а — тianeптин, б — метаболит MC₅, в — метаболит MC₃, г — дезалкил-тianeптин, д — дезалкилдезаминотianeптин, е — дезалкилнортianeптин, ж — дезалкилдезаминонортianeптин)

же при щелочных значениях pH среды. Данный факт может быть использован для проведения подтверждающих исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Петухов А.Е., Раменская Г.В., Симонов Е.А. и др. Химико-токсикологический анализ тianeптина и его метаболитов в моче методом тонкослойной хроматографии // Тез. докл. науч.-практич. конф. «Фармация Казахстана. Интеграция науки, образования и производства», 30—31 окт. 2008 г. — Казакстан, Шимкент, 2008. — С. 85—86.
2. Caccia S. Metabolism of the newer antidepressants // Clin. Pharmacokinet. — 1998. — № 34 (4). — P. 292—294.
3. Clark E.G.C. Analysis of drug and poisons. Vol 1—2. — London: Pharmaceutical Press, 2004.
4. Gaulier J.-M., Marquet P., Lacassie E. High-performance liquid chromatographic determination of tianeptine in plasma applied to pharmacokinetic studies // J. Chromatogr. B. — 2000. — № 748. — P. 407—414.
5. Labrid C., Mocaer E., Kamoun A. Neurochemical and pharmacological properties of tianeptine, a novel antidepressant // Br. J. Psychiatry. — 1992. — № 160. P. 56—60.
6. Leterme L., Singlan Y.S., Auclair V. et al. Misuse of tianeptine: five cases of abuse // Ann. Med. In. — 2003. — № 2. — P. 58—63.
7. Petuhov A., Ramenskaya G., Simonov E. GC/MS analysis of tianeptine and its metabolites in human urine // Thesis from the 9th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics, 12—15th July, 2009. — Scotland, Edinburgh, 2009. — P. 254—255.

Петухов Алексей Евгеньевич — ассистент кафедры фармацевтической химии с курсом токсикологической химии Московской медицинской академии им. И. М. Сеченова, врач клинико-лабораторной диагностики Химико-токсикологической лаборатории НКБ №17 ДЗ г. Москвы; тел.: (903) 734-0613, e-mail: a-l-e-x4@yandex.ru

Раменская Галина Владиславовна — профессор, заведующая кафедрой фармацевтической химии с курсом токсикологической химии Московской медицинской академии имени И. М. Сеченова; тел.: (495) 690-4393

Симонов Евгений Анатольевич — ассистент кафедры «Экспертиза в допинг- и наркоконтроле» РХТУ имени Д. И. Менделеева, врач клинико-лабораторной диагностики Химико-токсикологической лаборатории НКБ №17 ДЗ г. Москвы; тел.: (499) 619-6049

Морозова Елена Борисовна — врач клинико-лабораторной диагностики Химико-токсикологической лаборатории НКБ №17 ДЗ г. Москвы; тел.: (499) 619-6049

Дорогокупец Ольга Борисовна — врач клинико-лабораторной диагностики Химико-токсикологической лаборатории НКБ №17 ДЗ г. Москвы; тел.: (499) 619-6049

Тюрин Игорь Александрович — врач клинико-лабораторной диагностики Химико-токсикологической лаборатории НКБ №17 ДЗ г. Москвы; тел.: (499) 619-6049

Смирнов Алексей Витальевич — заведующий Химико-токсикологической лаборатории НКБ №17 ДЗ г. Москвы; тел.: (499) 619-6049

Petuhov Alexey — the assistant to chair of pharmaceutical chemistry with a course in toxicological chemistry of Sechenov Moscow Medical Academy, the doctor of clinical laboratory diagnostics of Chemico-toxicological laboratory based at detoxication clinic #17; tel.: (903) 734-0613, e-mail: a-l-e-x4@yandex.ru

Ramenskaya Galina — professor, managing chair of pharmaceutical chemistry with a course in toxicological chemistry of Sechenov Moscow Medical Academy; tel.: (495) 690-4393

Simonov Evgeny — the assistant of chair «Examination in the doping- and the narcocontrol» of Mendeleev RCTU, the doctor of clinical laboratory diagnostics of Chemico-toxicological laboratory based at detoxication clinic #17; tel.: (499) 619-6049

Morozova Elena — the doctor of clinical laboratory diagnostics of Chemico-toxicological laboratory based at detoxication clinic #17; tel.: (499) 619-6049

Dorogokupets Olga — the doctor of clinical laboratory diagnostics of Chemico-toxicological laboratory based at detoxication clinic #17; tel.: (499) 619-6049

Tyurin Igor — the doctor of clinical laboratory diagnostics of Chemico-toxicological laboratory based at detoxication clinic #17; tel.: (499) 619-6049

Smirnov Alexey — the manager of Chemico-toxicological laboratory based at detoxication clinic #17; tel.: (499) 619-6049