

С. І. Мерзликін¹, Т. В. Кучер², В. І. Степаненко¹, О. Г. Погосян¹, М. Ю. Голік¹¹ Національний фармацевтичний університет, Україна

61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. E-mail: merzlikinerg07@gmail.com

² Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, Україна

Застосування тонкошарової хроматографії для аналітичної діагностики комбінованих отруєнь прохлорперазином

Неконтрольоване одночасне застосування прохлорперазину з типовими нейролептиками – похідними фенотіазину та іншими лікарськими засобами призводить до летальних отруєнь.

Мета. Оптимізація ТШХ-методик для скринінгових досліджень при комбінованих отруєннях прохлорперазином та іншими лікарськими засобами.

Результати та їх обговорення. Досліджено хроматографічну рухливість прохлорперазину, хлорпромазину, ібупрофену, трифлуоперазину та кветіапіну на двох типах пластинок (ВЕТШХ та ТШХ). Показано, що застосовані ТШХ-системи (спеціальна – для прохлорперазину, загальні – для скринінгу похідних фенотіазину та лікарських і наркотичних речовин основного характеру, рекомендовані Міжнародною асоціацією судових токсикологів) достатньо ефективно розділяють досліджувані речовини в тонкому шарі сорбенту, за винятком трифлуоперазину. Для детектування зон адсорбції речовин запропоновано реактив Лібермана, який утворює з ними різні забарвлення, реактив Драгендорфа та опромінювання хроматограм в УФ-світлі ($\lambda = 254$ нм). Чутливість виявлення становить 0,5–1,0 мкг у пробі. Здійснено валідаційну оцінку розроблених методик шляхом хроматографічного аналізу модельних сумішей прохлорперазину з кожною з досліджуваних речовин.

Експериментальна частина. Дослідження проводили на пластинках ВЕТШХ (силікагель 60G, розмір частинки 5–7 мкм, тип підложки – скло, Естонія) розміром 10×10 см та пластинках Мерск (силікагель 60G F₂₅₄, розмір частинки 10–15 мкм, тип підложки – алюмінієва фольга, Німеччина) розміром 10×10 см.

Висновки. Визначено умови ТШХ-скринінгу прохлорперазину, хлорпромазину, ібупрофену, трифлуоперазину та кветіапіну, які можуть бути рекомендовані для їх виявлення в реальних зразках біологічних об'єктів при комбінованих отруєннях.

Ключові слова: прохлорперазин; отруєння; тонкошарова хроматографія; хромогенні реактиви; системи розчинників

S. I. Merzlikin¹, T. V. Kucher², V. I. Stepanenko¹, O. H. Pogosyan¹, M. Yu. Golik¹¹ National University of Pharmacy, Ukraine² I. Ya. Gorbachevsky Ternopil National Medical University, Ukraine

Application of thin layer chromatography for the analytical diagnostics of combined prochlorperazine poisonings

The uncontrolled simultaneous application of prochlorperazine with typical phenothiazine derivatives antipsychotics and other drugs leads to fatal poisonings.

Aim. To optimize TLC procedures for the screening examinations in combined poisonings with prochlorperazine and other drugs.

Results and discussion. The chromatographic mobility of prochlorperazine, chlorpromazine, ibuprofen, trifluoperazine and quetiapine has been studied on two types of plates (HPTLC and TLC). It has been shown that the TLC-systems used (special – for prochlorperazine, general – for screening of phenothiazine derivatives, as well as drug and narcotic substances of the basic nature recommended by the International Association of Forensic Toxicologists) rather effectively separate the substances analyzed in a thin layer of a sorbent, except for trifluoperazine. To detect the adsorption zones of substances, the Lieberman reagent giving different staining, the Dragendorff reagent and irradiation of chromatograms by UV-light ($\lambda = 254$ nm) have been proposed. The detection sensitivity is 0.5–1.0 μg in the sample. The validation assessment of the methods developed has been carried out by the chromatographic analysis of prochlorperazine model mixtures with each of the substances studied.

Experimental part. The studies were carried out on HPTLC plates (silica gel 60G, particle size – 5–7 μm , substrate type – glass, Estonia) with 10×10 cm in size and Merck plates (silica gel 60G F₂₅₄, particle size – 10–15 μm , substrate type – aluminum foil, Germany) with 10×10 cm in size.

Conclusions. The TLC-conditions for screening of prochlorperazine, chlorpromazine, ibuprofen, trifluoperazine and quetiapine have been determined; they can be recommended for drugs detection in real samples of biological objects in the case of combined poisoning.

Key words: prochlorperazine; poisoning; thin layer chromatography; chromogenic reagents; solvent systems

С. І. Мерзликін¹, Т. В. Кучер², В. І. Степаненко¹, О. Г. Погосян¹, М. Ю. Голік¹¹ Национальный фармацевтический университет, Украина² Тернопольский национальный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского, Украина

Применение тонкослойной хроматографии для аналитической диагностики комбинированных отравлений прохлорперазином

Неконтролируемое одновременное применение прохлорперазина с типичными нейролептиками – производными фенотиазина и другими лекарственными средствами приводит к летальным отравлениям.

Цель. Оптимизация ТСХ-методик для скрининговых исследований при комбинированных отравлениях прохлорперазином и другими лекарственными средствами.

Результаты и их обсуждение. Исследована хроматографическая подвижность прохлорперазина, хлорпромазина, ибупрофена, трифлуоперазина и кветиапина на двух типах пластинок (ВЭТСХ и ТСХ). Показано, что использованные ТСХ-системы (специальная – для прохлорперазина, общие – для скрининга производных фенотиазина и лекарственных и наркотических веществ основного характера, рекомендованные Международной ассоциацией судебных токсикологов) достаточно эффективно разделяют исследуемые вещества в тонком слое, за исключением трифлуоперазина. Для детектирования зон адсорбции веществ предложен реактив Либермана, дающий с ними различное окрашивание, реактив Драгендорфа и облучение хроматограмм в УФ-свете ($\lambda = 254$ нм). Чувствительность обнаружения составляет 0,5–1,0 мкг в пробе. Проведена валидационная оценка разработанных методик путем хроматографического анализа модельных смесей прохлорперазина с каждым из исследуемых веществ.

Экспериментальная часть. Исследования проводили на пластинках ВЭТСХ (силикагель 60G, размер частиц 5–7 мкм, тип подложки – стекло, Эстония) размером 10×10 см и пластинках Merck (силикагель 60G F₂₅₄, размер частиц 10–15 мкм, тип подложки – алюминиевая фольга, Германия) размером 10×10 см.

Выводы. Определены условия ТСХ-скрининга прохлорперазина, хлорпромазина, ибупрофена, трифлуоперазина и кветиапина, которые могут быть рекомендованы для их обнаружения в реальных образцах биологических объектов при комбинированных отравлениях.

Ключевые слова: прохлорперазин; отравление; тонкослойная хроматография; хромогенные реактивы; системы растворителей

Прохлорперазин (Prochlorperazine) – 2-хлор-10-[3-(4-метилпіперазин-1-іл)пропіл]фенотіазин за фармакологічною дією є антипсихотичним засобом, що виявляє антагоністичний вплив на дофамінергічні рецептори ЦНС та відноситься до типових нейролептиків – похідних фенотіазину. Препарат застосовують для лікування шизофренії, тривожних розладів, мігрені, а також як засіб для лікування нудоти і блювоти [1, 2].

Прохлорперазин виробляють як генеричний лікарський засіб у багатьох країнах світу в різних лікарських формах, зокрема в Україні він зареєстрований під торговельною назвою «Вертинекс» (10 мг, таблетки, Кусум Хелтхкер PVT Ltd, Індія) і відпускається без рецепта [3–5].

Відомо, що застосування типових нейролептиків створює токсикологічну ситуацію, яка з кожним роком за різних причин поширюється з адекватним збільшенням кількості летальних отруєнь. Так, у період з 2010 по 2016 рр. у світі зареєстровано 258 випадків гострих отруєнь прохлорперазином, з них 10% – летальні через передозування з суїцидальною метою. Ускладнюють ризик отруєнь такі фактори, як безрецептурний відпуск, наркоманія, вживання алкоголю, полімедикаментозна терапія тощо. Визначено лікарські засоби, що застосовували одночасно з прохлорперазином при суїцидах: клоназепам, лоразепам, алпразолам, аміназин, трифтазин, ібупрофен, напроксен, сероквель, депакот та ін. [6].

З джерел наукової літератури відомі дослідження похідних фенотіазинів, у тому числі прохлорперазину, що стосуються розробки методів хіміко-токсикологічного аналізу (ХТА) з використанням ТШХ [7–8]. Проте вони носять поодинокій характер та не стосуються систематичних хіміко-токсикологічних досліджень та методів ХТА для діагностики комбінованих отруєнь. За умов наявності таких методів в установах, де проводять судово-медичні експертизи, кількість зареєстрованих

випадків отруєнь прохлорперазином, зокрема в Україні, може бути значно більшою.

Метою роботи є оптимізація ТШХ-методик для скринінгових досліджень при комбінованих отруєннях прохлорперазином та іншими лікарськими засобами.

Незважаючи на впровадження у практику ХТА сучасних інструментальних методів аналізу, які є високочутливими та селективними, хроматографія у тонкому шарі сорбенту не втратила своєї актуальності завдяки доступності, нескладному апаратурному оснащенню та простоті виконання. Метод ТШХ є найбільш розповсюдженим методом аналізу лікарських речовин та їх метаболітів у біологічних об'єктах та на етапі скринінгу служить переважним джерелом інформації [8].

Виходячи з аналізу джерел наукової літератури щодо збільшення кількості летальних отруєнь похідними фенотіазину, у тому числі прохлорперазином, при одночасному їх застосуванні з іншими лікарськими засобами, як об'єкти дослідження використовували такі лікарські речовини: прохлорперазин, хлорпромазин, ібупрофен, трифлуоперазин та кветіапін, які попередньо було виділено з таблеток відповідних лікарських засобів. Оскільки дані речовини розчинні в етанолі, саме цей розчинник було використано для їх виділення з лікарських форм.

Для візуалізації плям досліджуваних речовин у тонкому шарі здійснено пошук проявників серед специфічних та загальних хромогенних реактивів, які зазвичай застосовують у ХТА для скринінгових досліджень похідних фенотіазину. Як тонкий шар використовували пластинки ВЕТШХ (Естонія), на які наносили робочі розчини досліджуваних речовин у зазначених концентраціях. Нанесені плями після висушування попередньо переглядали в УФ-світлі ($\lambda = 254$ нм), а потім у це ж місце наносили відповідний реактив та спостерігали наявність забарвлення. Результати досліджень наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Результати виявлення досліджуваних речовин на пластинках ВЕТШХ

Реактив	Лікарська речовина, забарвлення/чутливість, мкг				
	прохлорперазин	хлорпромазин	ібупрофен	трифлуоперазин	кветіапін
УФ-світло ($\lambda = 254$ нм)	фіолетове/0,5	фіолетове/0,5	фіолетове/0,5	фіолетове/0,5	фіолетове/0,5
FPN	рожеве/0,5	рожеве/0,5	–	оранжево-рожеве/0,5	–
FeCl ₃	рожеве/1,0	рожеве/1,0	оранжево-жовте/1,0	оранжево-жовте/1,0	–
Маркі	червоне → фіолетове/1,0	рожеве → фіолетове/1,0	–	оранжево-червоне/1,0	–
Фреде	оранжево-рожеве/1,0	червоне → фіолетове/1,0	фіолетове/1,0	оранжеве → коричневе → фіолетове/1,0	–
Манделіна	яскраво-рожеве/0,1	яскраво-рожеве/0,1	–	оранжево-червоне/0,1	–
Лібермана	рожеве/1,0	червоно-фіолетове/1,0	оранжеве → коричневе/1,0	рожево-коричневе/1,0	рожеве/1,0
Ердмана	рожеве/1,0	червоно-фіолетове/1,0	світло-коричневе/1,0	оранжево-червоне/1,0	–
Драгендорфа	темно-оранжеве/0,5	темно-оранжеве/0,5	темно-оранжеве/1,0	темно-оранжеве/0,5	темно-оранжеве/0,5

Встановлено, що всі використані реагенти утворюють з прохлорперазином та іншими похідними фенотіазину різні забарвлення та є цілком придатними для детектування їх зон адсорбції в тонкому шарі. Проте такі реактиви, як Маркі, Манделіна та FPN не проявляють плями ібупрофену та кветіапіну на пластинці, а реактиви Фреде, Ердмана та FeCl₃ – не проявляють пляму кветіапіну. Найбільш придатними для візуалізації плям усіх досліджуваних речовин серед специфічних реагентів можна вважати реактив Лібермана, який утворює з ними різні забарвлення, а серед загальних – реактив Драгендорфа та опромінювання в УФ-світлі. Останні два проявники є вдвічі більш чутливими. Чутливість виявлення досліджуваних речовин визначено на рівні 0,5–1,0 мкг в пробі.

Хроматографічну рухливість досліджуваних речовин визначали на хроматографічних пластинках ВЕТШХ (силікагель 60G, Естонія) та Merck (силіка-

гель 60G F₂₅₄, Німеччина). Як рухомі фази використовували різні за призначенням елюенти: система 1 – спеціальна для ТШХ-досліджень прохлорперазину; системи 2–5 – загальні для ТШХ-скринінгу похідних фенотіазину (системи 2, 3 та 5) та лікарських і наркотичних речовин основного характеру (система 4), рекомендовані Міжнародною асоціацією судових токсикологів (ТІАФТ). Розділення проводили у висхідному потоці в герметичних камерах, які попередньо були насичені парами розчинників, при кімнатній температурі. Довжина шляху фронту розчинників складала 8 см. Для детектування зон адсорбції досліджуваних речовин після елюювання висушену хроматографічну пластинку переглядали в УФ-світлі ($\lambda = 254$ нм), а потім обприскували реактивом Лібермана або Драгендорфа відповідно до рекомендацій [9]. Одержані середні дані хроматографічної рухливості речовин наведено в таблицях 2 та 3.

Таблиця 2

Величини R_f досліджуваних речовин на пластинках ВЕТШХ ($n = 5$)

Система розчинників	Лікарська речовина, величина R_f				
	прохлороперазин	хлорпромазин	ібупрофен	трифлуоперазин	кветіапін
1	0,54	0,74	на старті	0,57	0,30
2	0,38	0,73	0,05	0,44	0,65
3	0,42	0,70	0,13	0,35	0,18
4	0,45	0,54	0,74	0,50	0,63
5	0,61	0,85	0,04	0,65	0,50

Таблиця 3

Величини R_f досліджуваних речовин на ТШХ пластинках Merck ($n = 5$)

Система розчинників	Лікарська речовина, величина R_f				
	прохлорперазин	хлорпромазин	ібупрофен	трифлуоперазин	кветіапін
1	0,26	0,51	на старті	0,29	0,15
2	0,20	0,55	0,15	0,23	0,63
3	0,13	0,34	0,08	0,15	0,16
4	0,21	0,26	0,65	0,25	0,62
5	0,30	0,41	на старті	0,32	0,45

Якщо одержані результати досліджень (таблиці 2 та 3) інтерпретувати у фокусі комбінованих отруєнь прохлорперазином та іншими досліджуваними речовинами, то можна зазначити, що використані хроматографічні умови не у всіх випадках виявляють достатню роздільну властивість та можуть бути застосовані у спрямованому ХТА.

Так, системи 1–5 (пластинки ВЕТШХ) та системи 1–3 та 5 (пластинки Merck) достатньо ефективно розділяють прохлорперазин та хлорпромазин на хроматограмах та є цілком придатними для їх застосування у спрямованому ХТА на дані речовини при комбінованому отруєнні. При дослідженні хроматографічної рухливості в тонкому шарі прохлорперазину та кветіапіну найбільші роздільні властивості виявили системи 1–5 (пластинки ВЕТШХ) та системи 1, 2, 4, 5 (пластинки Merck). При хроматографуванні прохлорперазину та ібупрофену позитивну роздільну здатність показали системи 3, 4 (пластинки ВЕТШХ) та система 4 (пластинки Merck). Одержані дані також свідчать, що зазначені елюенти можуть бути застосовані у спрямованому ХТА при комбінованих отруєннях прохлорперазином та кветіапіном або ібупрофеном. Проте при дослідженні хроматографічної рухливості прохлорперазину та трифлуоперазину найбільш придатною для зазначених цілей є тільки система 2 (пластинки ВЕТШХ) з урахуванням того, що реактив Лібермана утворює з даними речовинами дещо різні забарвлення.

Здійснено валідаційну оцінку застосованих методик. Результати хроматографування вважаються достовірними, якщо виконуються умови придатності хроматографічної системи. Для перевірки придатності хроматографічної системи було проведено дослідження відтворюваності розроблених методик шляхом хроматографічного аналізу модельних сумішей прохлорперазину з кожною з досліджуваних речовин.

Експериментальна частина

У дослідженнях використовували лікарські речовини: прохлорперазин, хлорпромазин, ібупрофен, трифлуоперазин та кветіапін, які були виділені з відповідних лікарських форм (таблеток):

Вертинекс (прохлорперазину малеат) 10 мг, серія VE 8002, Кусум Хелтхкер PVT Ltd (Індія); Аміназин-Здоров'я (хлорпромазину гідрохлорид) 25 мг, серія 30218; Ібупрофен-Дарниця (ібупрофен) 200 мг, серія EM 501018; Трифтазин-Здоров'я (трифлуоперазин) 5 мг, серія 50418; Сероквель XR (кветіапіну фумарат) 50 мг, серія PF 303, виробник Astra Zeneka PO (Велика Британія).

Для приготування рухомих фаз та виділення досліджуваних речовин з лікарських форм застосовували такі органічні розчинники: ацетон для ВЕРХ (ГОСТ 2603-79, Merck, Німеччина), гексан (х. ч., ТУ 2631-025-4449-3179-98), етилацетат (ч. д. а., ГОСТ 8981-78, Labscan, Ірландія), етанол (ГОСТ 18300-87), метанол (Merck, Німеччина).

Методика виділення досліджуваних речовин з лікарських форм. Необхідну кількість таблеток певного лікарського засобу подрібнювали у порцеляновій ступці, заливали 10 мл етанолу, настоювали впродовж 1 години та відфільтровували. З одержаних фільтратів готували робочі розчини досліджуваних речовин у приблизних концентраціях 2,5–20 мг/мл.

Для виявлення досліджуваних речовин у тонких шарах сорбенту використовували такі хромогенні реактиви: Маркі, Фреде, Манделіна, Лібермана, Ердмана, Драгендорфа, FPN та $FeCl_3$.

Експериментальні дослідження проводили на пластинках ВЕТШХ (силікагель 60G, розмір частинок 5–7 мкм, тип підложки – скло, Естонія) розміром 10 × 10 см та пластинках Merck (силікагель 60G F₂₅₄, розмір частинок 10–15 мкм, тип підложки – алюмінієва фольга, Німеччина) розміром 10 × 10 см.

Методика визначення чутливості. Різні аліквоти (0,1–30 мкл) випробуваних розчинів досліджуваних речовин (концентрація 0,05–2,0 мкг в пробі) скляним капіляром наносили на ТШХ-пластинку розміром 10 × 10 см. Після висушування плями пластинку переглядали в УФ-світлі ($\lambda = 254$ нм), а потім у місце нанесення речовини по краплях наносили відповідний реактив та спостерігали за забарвленням.

Як рухомі фази використовували системи розчинників: 1) гексан–ацетон–діетиламін (50:20:2);

2) гексан–ацетон–25% розчин амоніаку (60:40:2); 3) ацетон–25% розчин амоніаку (100:1); 4) метанол–25% розчин амоніаку (100:1,5); 5) гексан–ацетон–25% розчин амоніаку (50:45:5).

Методика хроматографування. Перед елююванням хроматографічні пластинки попередньо імпрегнують метанолом та активують у сушильній шафі за температури 110–120°C впродовж 30 хв. Хроматографування досліджуваних зразків проводять у герметичній камері об'ємом 500 см³, в яку вносять 50 мл елюенту. Камеру попередньо насичують парами елюенту впродовж 30 хв. На лінію старту хроматографічної пластинки скляним капіляром наносять від 5 до 20 мкл відповідних робочих розчинів досліджуваних речовин. Пластинку поміщають у камеру із відповідною сумішшю розчинників та елюють. Коли фронт розчинників пройде відстань 8 см від лінії стар-

ту, пластинку виймають із камери, висушують на повітрі при кімнатній температурі, переглядають в УФ-світлі ($\lambda = 254$ нм) та обприскують відповідним реактивом.

Висновки

За результатами проведених експериментальних досліджень визначено склади систем для елюювання в тонкому шарі сорбенту, типи хроматографічних пластинок та реагенти для детектування зон адсорбції прохлорперазину, хлорпромазину, ібупрофену, трифлуоперазину та кветіапіну, які можуть бути рекомендовані для виявлення досліджуваних речовин в реальних зразках біологічних об'єктів при комбінованих отруєннях прохлорперазином та зазначеними лікарськими засобами.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Перелік використаних джерел інформації

- Orr, S. L.; Friedman, B. W.; Christie, S.; Minen, M. T.; Bamford, C.; Kelley, N. E.; Tepper, D. Management of Adults with Acute Migraine in the Emergency Department: The American Headache Society Evidence Assessment of Parenteral Pharmacotherapies. *Headache* **2016**, *56* (6), 911–940. <https://doi.org/10.1111/head.12835>.
- Jaszczyszyn, A.; Gasiorowski, K.; Swiatek, P.; Malinka, W.; Cieslik-Boczula, K.; Petrus, J.; Czarnik-Matusiewicz, B. Chemical structure of phenothiazines and their biological activity. *Pharmacol. Rep.* **2012**, *64* (1), 16–23. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70726-0](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70726-0).
- Vertyneks. Kusum Khelthkher. <https://compendium.com.ua/info/220097/vertineks-sup-sup-> (accessed 5 May 2020).
- Prochlorperazine. <https://www.drugs.com/international/prochlorperazine.html> (accessed 5 May 2020).
- Prochlorperazine. Dosage. <https://www.drugs.com/dosage/prochlorperazine.html> (accessed 5 May 2020).
- Merzlikin, S. I.; Kucher, T. V.; Stepanenko, V. I.; Pohosian, O. H. Analytical review of prochlorperazine side effects and acute poisonings. *Ukr. Biopharm. J.* **2019**, *2* (59), 14–20. <https://doi.org/10.24959/ubphj.19.214>.
- Tanaka, E.; Nakamura, T.; Terada, M.; Shinozuka, T.; Hashimoto, C.; Kurihara, K.; Honda, K. Simple and simultaneous determination for 12 phenothiazines in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *854* (1–2), 116–120. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.04.004>.
- Remezova I. P.; Lazaryan D. S.; Maksimenko T. I.; Sanzhieva D. Y.; Rybasova A. Y. Methods elaboration on detection of some atypical neurolytic agents for chemical and toxicological analysis. *Pharmacy and Pharmacology* **2014**, *2* (6(7)), 54–58. [https://doi.org/10.19163/2307-9266-2014-2-6\(7\)-54-58](https://doi.org/10.19163/2307-9266-2014-2-6(7)-54-58).
- Moffat A.C.; Osselton M.D.; Widdop B. *Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. 4 ed.; Pharmaceutical Press: London, 2011.

Received: 17. 02. 2020

Revised: 15. 04. 2020

Accepted: 29. 05. 2020