

Triciklikus antidepresszánsok fotobomlástermékeinek vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálata

Székely Pál¹, Gyéresi Árpád², Hancu Gabriel²

Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, ¹Gyógyszerészeti Marketing Tanszék, ²Gyógyszerészeti Kémiai Tanszék

Studiul produselor de fotodegradare a antidepressivelor triciclice prin cromatografie pe strat subțire

În prezenta lucrare am studiat produsele de degradare fotochimică a cinci antidepressive triciclice (clorhidrat de amitriptilină, clorhidrat de nortriptilină, clorhidrat de imipramină, clorhidrat de clomipramină, clorhidrat de doxepină), prin metoda cromatografiei pe strat subțire. Am utilizat soluțiile apoase, de concentrație 0,1%, care au fost iradiate în lumină UV, ulterior din acestea fiind prelevate probe la intervale de 30, 60, 120, 240, 360, 480 minute. Aceste soluții au fost analizate prin metoda cromatografiei pe strat subțire, prevăzută de Farmacopeea Europeană, ediția a 6-a, respectiv printr-o metodă originală, elaborată de autori. Prin aceste metode s-a reușit separarea atât a substanțelor inițiale cât și produselor de degradare formate. Prin compararea cromatogramelor obținute am elaborat un studiu comparativ asupra fotostabilității acestor compuși.

Cuvinte cheie: antidepressive triciclice, fotostabilitate, produse de degradare, cromatografie pe strat subțire.

Study of the photodegradation products of tricyclic antidepressants by thin-layer chromatography

In the present work the photodegradation products of five tricyclic antidepressants (amitriptyline hydrochloride, nortriptyline hydrochloride, imipramine hydrochloride, clomipramine hydrochloride and doxepine hydrochloride) were analyzed by thin-layer chromatography. We used aqueous solutions of 0,1% which were irradiated in UV light, and from which we took samples at well-determined periods of time (30, 60, 120, 240, 360, 480 minutes). These solutions were analyzed by thin-layer chromatographic methods according to the stipulations of the European Pharmacopoeia 6th Edition and also by an original method developed by us. During these procedures we managed the separation of the studied substances and of their photodegradation products as well. By comparing the chromatograms we established comparisons between the stability of the studied compounds.

Keywords: tricyclic antidepressants, photostability, degradation products, thin-layer chromatography.

Orvostudományi Értesítő, 2009, 82 (4): 289-293

www.orvtudert.ro

A gyógyszervegyületek fotostabilitása fontos problémakör, az Európai Gyógyszerkönyv [8] több mint 250 anyag esetében írja elő a fénytől való védelmet. A fotobomlás során a gyógyszervegyületek veszítenek hatékonyságukból, illetve a szervezetre ártalmas fototoxikus anyagok is képződhetnek akár in vivo, akár in vitro [1, 7]. A fényérzékeny vegyületek csoportjába tartoznak az általunk vizsgált triciklikus antidepresszánsok is. Összesen öt gyógyszervegyületet tanulmányoztunk, melyek három csoportba sorolhatók [2, 3, 6]:

- dibenzo-azepin származékok: imipramin-hidroklorid, klomipramin-hidroklorid;
- dibenzo-cikloheptadién származékok: amitriptilin-hidroklorid, nortriptilin-hidroklorid;
- dibenzo-oxepin származék: doxepin-hidroklorid.

Nagy lipofilitásuk következtében jó eloszlási képességgel rendelkeznek, behatolnak a központi idegrendszerbe, valamint a különböző szövetekbe. Manapság viszonylag háttérbe szorultak a mellékhatásaik következtében, de terápia szempontból még mindig a leghatékonyabb vegyületek közé tartoznak [3, 4, 5, 6].

A fent említett öt gyógyszervegyület sósavas só formájában hivatalos a 6. Európai Gyógyszerkönyvben [8], a X. Román Gyógyszerkönyvben [9], a VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben [11] valamint a 35. Martindaleben [10].

Anyag és módszer

Doxepin-hidroklorid (99,2%, Dipharma, Italy), klomipramin-hidroklorid (98%, Sigma-Aldrich, Germany),

imipramin-hidroklorid (99%, Sigma-Aldrich, Germany), amitriptilin-hidroklorid (98%, Sigma-Aldrich, Germany), nortriptilin-hidroklorid (98%, Sigma-Aldrich, Germany).

A kromatografáláshoz felhasznált anyagok: etil-acetát, 2-propanol, ammónia, dietil-amin, ciklohexán, acetone, metanol, diklór-metán, etil-metil-kezon, heptán, hidrogén-klorid, kálium-dikromát, kénsav, foszforsav, ecetsav, cink-klorid, hidrogén-peroxid.

Kromatográfiás lemez: Kieselgel 60 F254(Merck), 20x20 cm.

Az UV fénnel történő besugárzásához, a fent említett öt gyógyszervegyületből 0,1%-os koncentrációjú vizes oldatot készítettünk, majd az így készített oldatokat 20 cm távolságból, ultraibolya fényterhelésnek (20 W fénycső) vetettük alá 25°C hőmérsékleten.

Az oldatokból (0, 30, 60, 120, 240, 360, 480 perc után) kivett próbákat vékonyréteg-kromatográfiás (VRK) módszerrel vizsgáltuk. Az öt triciklikus antidepresszáns vegyület vizsgálatára kétféle VRK módszert alkalmaztunk. Az általunk kidolgozott eljárás (1. módszer) mellett az egyes gyógyszervegyületek cikkelyeinél a 6. Európai Gyógyszerkönyvben leírt eljárást (2. módszer) alkalmaztuk.

1. módszer

A módszer kidolgozása során figyelembe vettük az aminok vékonyréteg-kromatográfiás szétválasztásánál alkalmazott kifejlesztőelegyeket, végül az etil-acetátot, 2-propanolt és ammóniát tartalmazó elegyet alkalmaztuk. E komponensekből összeállított különböző arányú keverékek közül az elővizsgálatok során az etil-acetát, 2-propanol és tömény ammónia 80 + 20 + 2,5 térfogatarányú keveréke bizonyult a legmegfelelőbbnek. A kromatografálásoknál 20x20 cm-es szilikagél kromatográfiás lemezek (Kieselgel 60 F₂₅₄-Merck) a 2 cm távolságra levő startvonalra a vizsgálandó oldatokból 10 µl vittünk fel. A kifejlesztési fronttá-

Székely Pál

E-mail: szekelypal@yahoo.com

1. táblázat. A 6. Európai Gyógyszerkönyv előírásai a vizsgált vegyületek vékonyréteg-kromatográfiás vizsgálatánál

A VRK-módszer adatai	A vizsgált vegyületek				
	Amitriptilin-hidroklorid	Nortriptilin-hidroklorid	Imipramin-hidroklorid	Klomipramin-hidroklorid	Doxepin-hidroklorid
Kromatográfiás lemez	20×20 cm Kieselgel (Merck)				10×20 cm Kieselgel (Merck)
Startvonal	2 cm				
Felvitt oldatmennyiség	10 µl				
Kifejlesztőelegy (térfogatarányú keverék)	dietil-amin, etil-acetát, ciklohexán 3 + 15 + 85		tömény sósav, víz, tömény ecetsav, etil-acetát 5:5:35:55	ammónia, acetón, etil-acetát 5:25:75	a) metanol, diklór-metán 10:90 b) etil-metil-ke-ton, heptán 30:60
Kifejlesztési távolság	15 cm				5 cm
Kifejlesztés időtartama (szobahőmérsékleten)	1 óra 20 perc		2 óra	1 óra 30 perc	20 perc
Lemezek szárítása	100-105°C 10 percig		szárítás 5 percig levegőn		szárítás levegőn
Lemezek előhívása reagensekkel	formaldehid : koncentrált kénsav (4:96) v/v		kálium dikromát (5g/l): kénsav 25%		cink-klorid, ecetsav, foszforsav, hidrogén-peroxid-oldat (30g:30ml:3ml: 0,8ml)
Lemezek vizsgálata	366 nm-en	366 nm-en	azonnal értékelve		366 nm-en

volság 16,5 cm, a kifejlesztési időtartam kb. 1 óra 20 perc volt, szobahőmérsékleten. A kromatogramok értékelése UV fényben történt, 254 és 366 nm-en.

2. módszer

A második módszer esetében a vegyületeket a 6. Európai Gyógyszerkönyv előírásainak megfelelően vizsgáltuk (1. táblázat).

Eredmények és megbeszélés

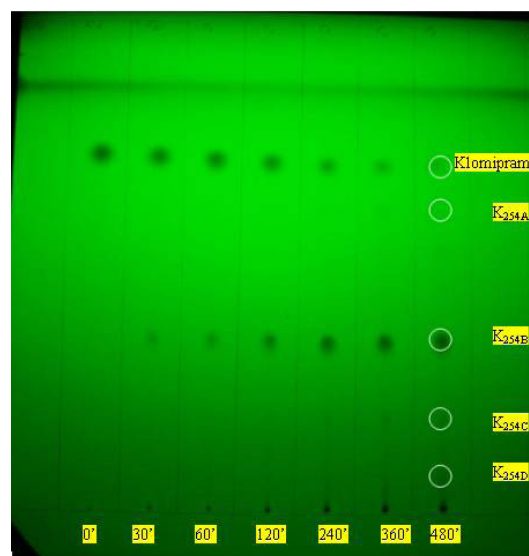
Az 1. módszerrel való vizsgálat során, 254 nm-es hullámhosszú fényen besugározva, az *amitriptilin*, *nortriptilin* és *imipramin-hidroklorid* esetében jól látható foltokat figyelhetünk meg a kromatogramokon különböző Rf értékekkel (amitriptilin-hidroklorid 0,72, nortriptilin hidroklorid 0,33, imipramin hidroklorid 0,61), ugyanakkor bomlástermékre utaló folt nem volt látható a kromatogramokon.

366 nm-en nem mutatnak elnyelést sem az eredeti gyógyszeres anyagok, sem az esetleges bomlástermékek.

A *klomipramin-hidroklorid* UV-fényben való vizsgálata során jól elkülönült foltokat figyelhetünk meg mindkét hullámhosszon. 254 nm-en 12,2 cm-es távolságra, 0,74-es Rf értékkel a klomipramin jól kivehető foltja látható a fotobontás előtti oldatból. A folt intenzitása fokozatosan csökken a besugárzási idő függvényében, a nyolc órán keresztül besugárzott oldat esetében már csak egy halvány folt látható, ami nagyfokú bomlásra utal. Ezzel párhuzamosan megfigyelhető, hogy a bomlástermékek foltjainak a nagysága és intenzitása növekszik. Összesen négy bomlásterméket figyelhetünk meg ezen a hullámhosszon. Ezeket a vizsgált anyag kezdőbetűjével, a hullámhosszal és az abc betűivel jelölük: K_{254A} , K_{254B} , K_{254C} és K_{254D} (1. ábra). A foltok Rf értékei a 2. táblázatban vannak feltüntetve.

A kromatogramot 366 nm-en vizsgálva hat bomlástermékre utaló folt figyelhető meg K_{366A} , K_{366B} , K_{366C} , K_{366D} , K_{366E} és K_{366F} (2. ábra). Megállapítható, hogy a K_{254B} vegyület foltjának Rf értéke megegyezik a K_{366B} vegyület foltjának Rf értékével, hasonlóképpen a K_{254C} a K_{366C} -el és a K_{254D} a K_{366D} -el. Ezek nagy valószínűséggel azonos bomlástermékeknek felelnek meg. Említésre méltó, hogy a startvonalon, a felviteli pontban, a kifejlesztés után maradó foltok intenzitása a besugárzás során fokozódik, ami további bomlástermékekre utalhat.

A *doxepin-hidroklorid* kromatogramján 254 nm-en, az anyavegyület foltján kívül, négy bomlástermékeknek megfelelő foltot figyeltünk meg. A doxepin-hidroklorid foltja



1. ábra. Klomipramin-hidroklorid fénybomlásának kromatogramja 254 nm-en 1. módszerrel vizsgálva

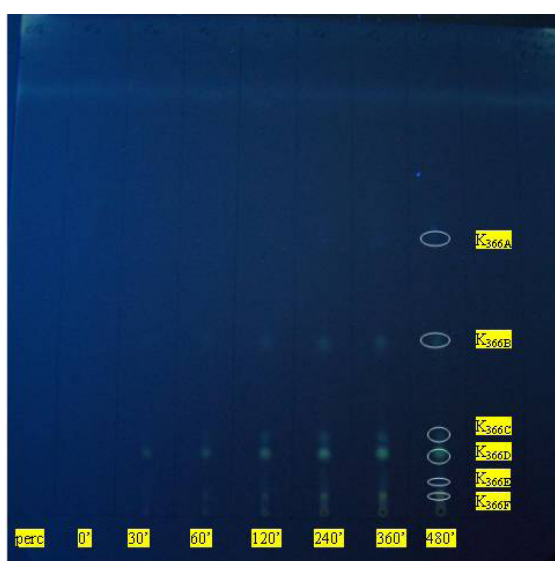
10,0 cm-es magasságban helyezkedik el 0,6 Rf értékkel, ezt követi a négy bomlástermék foltja, melyeket D_{254A} , D_{254B} , D_{254C} és D_{254D} -vel jelöltünk (3. ábra).

366 nm-en két foltot figyeltünk meg $D_{366A}=0,88$ (14,6 cm) és a $D_{366B}=0,48$ (8,0 cm) (4. ábra). A D_{366A} bomlástermék érdekessége, hogy a többi bomlástermékkel eltérően, az anyavegyület foltja előtt, a frontvonal közelében vándorolt, ami a nagyobb lipofilitására enged következtetni. A D_{366A} vegyület Rf értéke alapján a D_{366B} vegyületnek felel meg. A klomipramin-hidroklorid kromatogramjához hasonlóan a startvonalon, a felviteli pontban, a kifejlesztés után jelentkező foltok intenzitása a besugárzás során fokozódik, ami további bomlástermékekre utalhat.

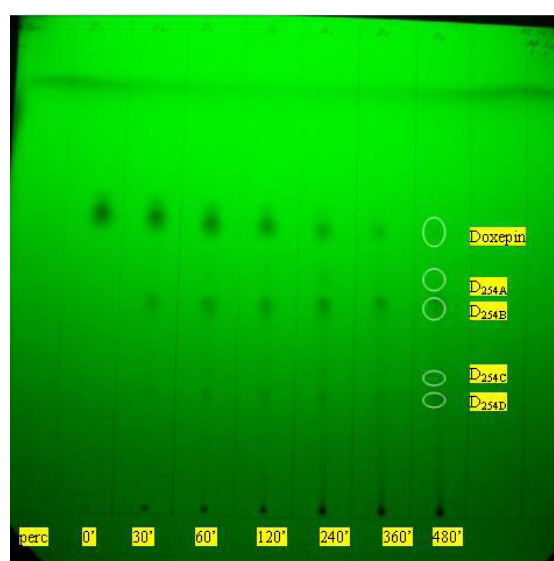
A 2. módszerrel [8] vizsgált amitriptilin-hidroklorid (Rf =0,59, táv 8,3 cm) esetében egyetlen bomlástermékre utaló

2. táblázat. Klomipramin-hidroklorid és fotobomlástermékeinek kromatográfiás adatai (1. módszer)

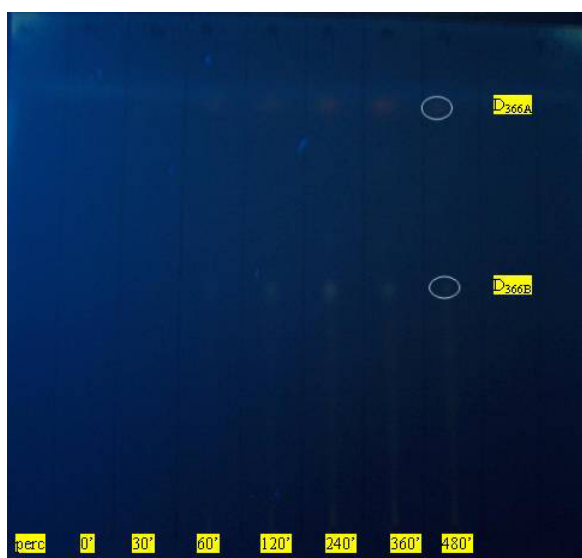
	Kifejlesztési távolság (cm)	Rf
Klomipramin	12,2	0,74
K_{254A}	10,8	0,65
K_{254B}	6,0	0,36
K_{254C}	3,3	0,2
K_{254D}	1,2	0,07
K_{366A}	9,4	0,57
K_{366B}	6,0	0,36
K_{366C}	3,3	0,2
K_{366D}	2,7	0,16
K_{366E}	2	0,12
K_{366F}	1,2	0,07



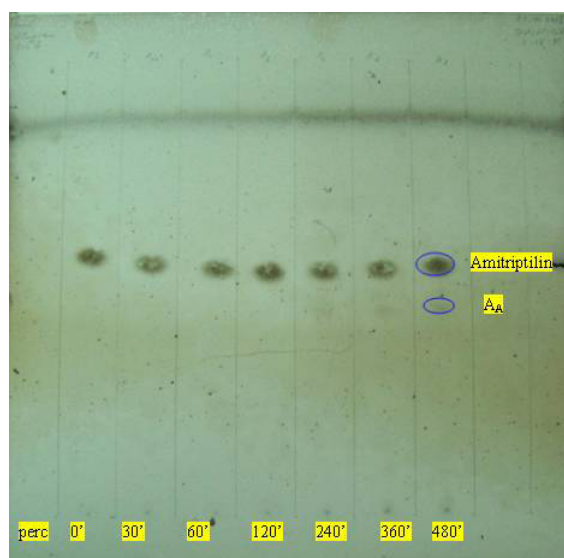
2. ábra. Klomipramin-hidroklorid fénybomlásának kromatogramja 366 nm-en 1. módszerrel vizsgálva



3. ábra. Doxepin-hidroklorid fénybomlásának kromatogramja 366 nm-en 1. módszerrel vizsgálva



4. ábra. Doxepin-hidroklorid fénybomlásának kromatogramja 254 nm-en 1. módszerrel vizsgálva



5. ábra. Amitriptilin-hidroklorid kromatogramja 6. Európai Gyógyszerkönyv szerint

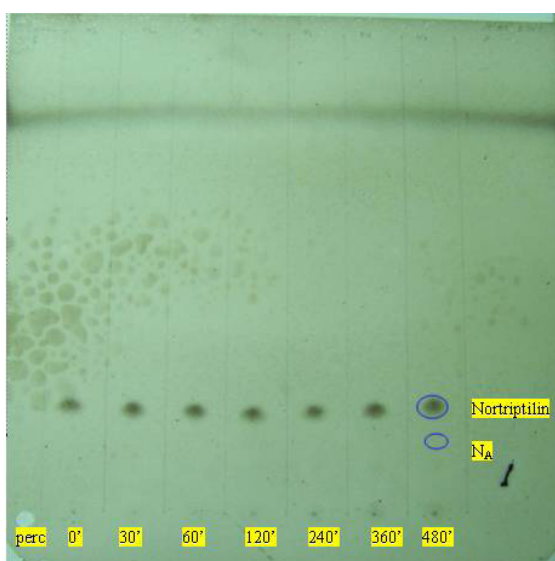
foltot észleltünk, amely négy óra besugárzás után jelent meg, R_f értéke 0,5 (7,5 cm táv) (5. ábra). A nortriptilin-hidroklorid ($R_f=0,23$ 3,5cm) kromatogramján hasonló módon az anyavegyület foltján kívül, még egy folt jelent meg, ebben az esetben is a bomlástermék (R_f 0,21 3,2 cm táv) négy óra besugárzás után vált észlelhetővé (6. ábra).

Az imipramin-hidroklorid kromatogramja az előhívás után egy intenzív kék foltot mutat (9,7 cm-es táv, R_f 0,8). Ebben az esetben is egyetlen bomlástermékre utaló – piros – foltot figyelhetünk meg, 8 cm-es távolságra ($R_f=0,66$) (7. ábra). Mivel az imipramin esetében a bomlástermék már egy óra besugárzás után megfigyelhető, ez a vegyület kisebb fokú fotostabilitását jelzi.

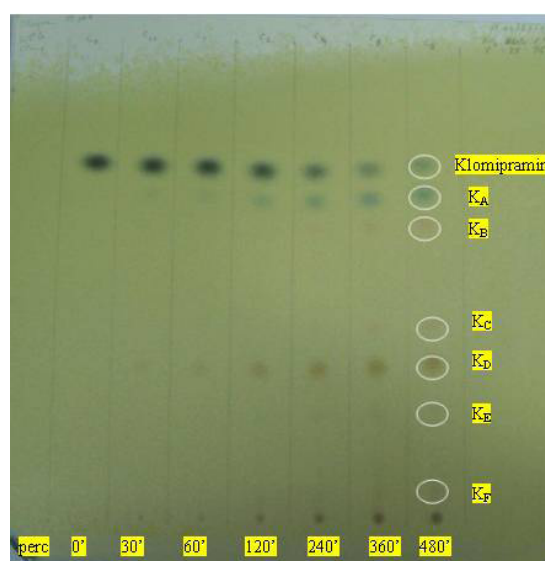
A 6. Európai Gyógyszerkönyv módszerével vizsgálva a klomipramin-hidroklorid fotostabilitását akárcsak az 1.

3. táblázat. Doxepin-hidroklorid és fotobomlástermékeinek kromatográfiás adatai (1. módszer)

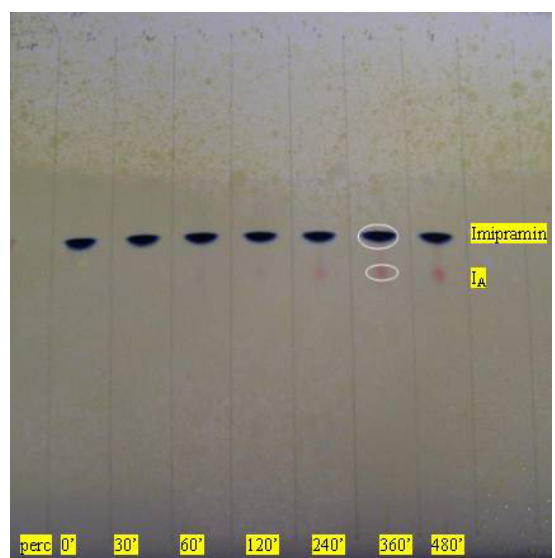
	Kifejlesztési távolság (cm)	R_f
Doxepin	10,0	0,6
D _{254A}	8,0	0,48
D _{254B}	7,2	0,43
D _{254C}	5,0	0,3
D _{254D}	4,0	0,24
D _{366A}	14,5	0,88
D _{366B}	8,0	0,48



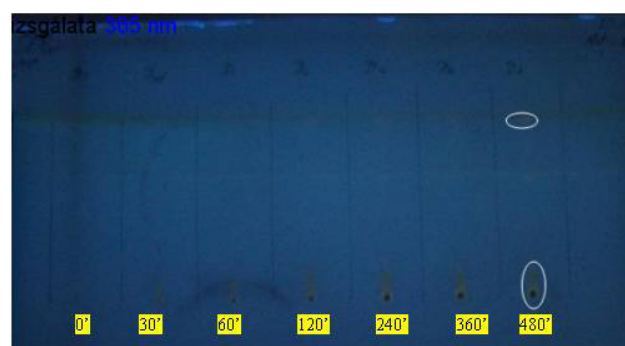
6. ábra. Nortriptilin-hidroklorid kromatogramja 6. Európai Gyógyszerkönyv szerint



8. ábra. Klomipramin-hidroklorid kromatogramja 6. Európai Gyógyszerkönyv szerint



7. ábra. Imipramin-hidroklorid kromatogramja 6. Európai Gyógyszerkönyv szerint



9. ábra. Doxepin-hidroklorid kromatogramja 6. Európai Gyógyszerkönyv szerint

4. táblázat. Klomipramin-hidroklorid és foto-bomlástermékeinek kromatográfiás adatai (2. módszer)

	Kifejlesztési távolság (cm)	R _f
Klomipramin	12,1	0,8
K _A	11,0	0,73
K _B	10,5	0,7
K _C	6,5	0,43
K _D	5,1	0,34
K _E	3,7	0,25
K _F	0,8	0,05

módszer esetén több bomlástermék foltot észleltünk. A kromatogramon az anyavegyület R_f értéke (0,8, 12,1 cm táv) a legnagyobb, ezt követi a hat bomlástermék foltja (**8. ábra**). Ezeket ugyancsak a vizsgált anyag kezdőbetűjével és az abc kezdőbetűivel jelöltük. (**4. táblázat**)

A vegyület fokozott fényérzékenységet jelzi, hogy a K_A bomlástermék (kék színű) és K_D bomlástermék (barna színű) foltja már harminc perc besugárzás után észlelhető, majd hat óra UV besugárzás után megjelennek a K_B és K_C bomlástermékek (vörös színű) foltjai, illetve a K_E és K_F bomlástermékek (barna színű) foltjai. Itt is megfigyelhető a startvonalon, a felviteli pontban, a kifejlesztés után visszamaradó foltok intenzitásának növekedése.

A 6. Európai Gyógyszerkönyv A módszerének (mely előírja, hogy a vizsgált vegyület maradjon a startvonalon) megfelelően vizsgált *doxepin-hidroklorid*, kromatogramja egy a frontvonallal vándorló vörös színű foltot (D_A vegyület R_f = 0,98) és startvonalától 0,6 cm-re futó – több vegyületet magába foglaló – sávot mutatott. A startvonal közelében levő bomlástermékek jelenléte, már harminc perc után megfigyelhető, míg a D_A vegyület foltja négy órai besugárzás után jelenik meg (**9. ábra**). Az Európai Gyógyszerkönyv B módszerével vizsgált kromatogramon négy órai besugárzás után megjelenik a D_A vegyület vörös színű foltja, R_f értéke azonban 0,78. Mind az A, mind a B módszer esetében a startvonalon a felviteli pontban maradó foltok színe erősödik.

Következtetések

A vizsgált öt triciklikus antidepresszáns vegyület közül a klomipramin és a doxepin-hidroklorid mutatta a legnagyobb fotobomlási hajlamot.

A klomipramin 3-as helyzetben levő klór atomja aktiválja a molekulát és ennek következtében több kromatográfiás módszerrel kimutatható bomlástermék keletkezik.

A doxepin héttagú gyűrűjének oxigén atomja következtében a molekula kisebb fotostabilitással rendelkezik és könnyebben bomlik.

Az amitriptilin-, nortriptilin- és imipramin-hidroklorid oldatok a vizsgált körülmények között viszonylag stabilak voltak, eseteikben bomlástermék csak több órás besugárzás után mutatható ki.

Irodalom

1. Beijersbergen van Henegouwen G.M.J. – *Photochemistry of drugs in vitro and in vivo*, Topics in Pharmaceutical Sciences, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1997, 233-256.
2. Bernáth G. – *Gyógyszerkémia III*, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem, Szeged, 1998, 47-80.
3. Cristea A.N. (red.) – *Tratat de farmacologie*, Ediția I., Ed. Medicală, București, 2005, 84-106.
4. Fürst Zs. (szerk.) – *Farmakológia*, Medicina könyvkiadó Rt., Budapest, 2006, 370-377.
5. Palage M., Mureșan A. – *Medicația afecțiunilor sistemului nervos central*, Ed. Medicală Universitară "Juliu Hațieganu", Cluj-Napoca, 2006, 155-165.
6. Takácsné Novák K., Szász Gy. – *Az antidepresszív szerek gyógyszerészeti kémiája*, Acta Pharm. Hung., 2005, 75(2):93-108.
7. Tonnensen H.H. (ed.) – *Photostability of Drugs and Drug Formulations*, CRC Press. London, 2004.
8. *** *European Pharmacopoeia 6th edition*, Council of Europe, Strasbourg, vol.2, 2007, 1757-1759.
9. *** *Farmacopeea Română*, ediția a X-a, Editura Medicală, București, 1993, 383-384.
10. *** *Martindale. The Complete Drug Reference 35th ed.*, Pharmaceutical Press, London-Chicago, 2007, 333-389.
11. *** *Pharmacopoea Hungarica ed. VIII*, II. k., Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2004, 1757-1758.