

АНАЛІТИЧНА ДІАГНОСТИКА СМЕРТЕЛЬНИХ ОТРУЄНЬ ФЛУВОКСАМІНОМ

С.В.Баюрка, С.А.Карпушина

Національний фармацевтичний університет

Ключові слова: антидепресанти; флувоксамін; біологічний матеріал; кольорові реакції; тонкошарова хроматографія; УФ-спектроскопія; екстракційна спектрофотометрія

Встановлено ступінь ізолювання флувоксаміну з біологічного матеріалу за допомогою ацетону та підкисленого ацетонітрилу, який становив $9,6 \pm 1,0\%$ і $26,7 \pm 2,0\%$ відповідно. Показана можливість використання кольорових реакцій, тонкошарової хроматографії, УФ-спектроскопії для виявлення флувоксаміну, виділеного з біологічного матеріалу, після додаткової очистки витяжок від супутніх домішок за допомогою методів екстракції та ТШХ. Кількісний вміст досліджуваного антидепресанта в екстрактах встановлювали екстракційно-спектрофотометричним методом у видимій області за реакцією утворення іонного асоціату з кислотним азобарвником метиловим оранжевим. Отримані результати можуть бути використані для судово-токсикологічних досліджень біологічного матеріалу при смертельних отруєннях флувоксаміном.

Аналітична діагностика отруєнь лікарськими речовинами поряд з клінічною та патоморфологічною діагностикою мають важливе значення для встановлення причин отруєння, особливо у тих випадках, коли картина інтоксикації є нехарактерною [2, 10, 16, 18, 19].

Об'єктивність результатів аналітичної діагностики визначається, насамперед, чутливістю та специфічністю використаних хімічних та фізико-хімічних методів у процесі хіміко-токсикологічного аналізу отруйної речовини, а також ефективністю методу ізолювання досліджуваної речовини з біологічного об'єкту. Застосування таких доступних та поширених у практиці методів як хіміко-токсикологічний аналіз, кольорові експрес-тести, тонкошарова хроматографія (ТШХ), УФ-спектроскопія є доцільним у тому випадку, коли метод ізолювання забезпечує виділення достатньої кількості отруйної речовини з досліджуваного об'єкту [2, 7, 8, 16].

Класичні методи ізолювання лікарських речовин [2, 4], які перед-

бачають використання підкисленої води (методи Васильєвої О.О., Крамаренка В.П.) або підкисленого етанолу (метод Стаса-Отто), є не завжди ефективними [3, 9].

Великий інтерес як екстрагентів "лікарських" отрут з біологічного матеріалу мають апротонні розчинники, які легко проникають крізь гідрофільні та гідрофобні ділянки мембрани клітин біологічного об'єкту і тим самим сприяють більш ефективній екстракції досліджуваних отруйних речовин з внутрішніх органів [3]. Ізолювання "лікарських" отрут такими апротонними розчинниками як ацетонітрил (за методом Шведзінські І. [23]) та ацетон (за методом Карташова В.А. [3]) широко впроваджено в практику хіміко-токсикологічного аналізу лікарських речовин різних фармакологічних груп.

Останнім часом збільшилась кількість випадків смертельних отруєнь антидепресантами [11, 13, 15, 17].

Флувоксамін — ((E)-5-метокси-1-[4-(трифторметил)феніл]-1-пентанон-О-(2-аміноетил)оксиму ма-

леат) є одним з сучасних антидепресантів, який знайшов широке застосування в медичній практиці для лікування депресій різноманітної етіології [5, 6]. Препарат має досить високу токсичність і згідно з літературними даними [11, 16, 17, 19, 20, 22] неодноразово був причиною гострих та смертельних отруєнь. Таким чином, розробка методів хіміко-токсикологічного аналізу флувоксаміну в біологічних об'єктах є актуальною задачею.

В літературі містяться дані з методів хіміко-токсикологічного аналізу флувоксаміну в біологічних рідинах за допомогою газорідинної та високоефективної рідинної хроматографії [16], сполучення рідинної хроматографії з мас-спектрометрією [14, 21], капілярного електрофорезу [12]. Відомості про дослідження біологічного матеріалу на вміст флувоксаміну в літературі відсутні.

Матеріали та методи

Подрібнену печінку людини, яка загинула від травми, у кількості 5 г (при ізолюванні ацетоном) та 20 г (при ізолюванні підкисленим ацетонітрилом) вміщу-

вали у стакан, додавали 2 мл водного розчину флувоксаміну, який містив 500 мкг (при ізолюванні методом Карташова В.А.) та 2000 мкг (при ізолюванні методом Шведзінські І.) препарату. Суміш ретельно перемішували і залишали на 24 год. Паралельно ставили “холості” досліді з біологічним матеріалом.

Виділення флувоксаміну з печінки зазначеними розчинниками проводили, як описано нами раніше в роботі [1].

Отримані таким чином екстракти з біологічного матеріалу містили певну кількість супутніх домішок, які видаляли за допомогою додаткової екстракційної очистки.

За даними, отриманими нами при вивченні екстракції флувоксаміну з водних розчинів органічними розчинниками, було встановлено, що з кислого середовища (рН 1-2) вказана речовина у найменшій мірі екстрагується хлороформом (ступінь одноразової екстракції складає 13%). Найбільша кількість флувоксаміну екстрагується діетиловим етером з лужного середовища при рН 8-9 (ступінь екстракції складає близько 98%).

Видалення домішок проводили екстракційним методом. Для цього хлороформні екстракти, отримані з кислого та лужного середовища, переносили до фарфорової чашки, випаровували їх на водяній бані при температурі, не вище, ніж 40°C до видалення органічного розчинника. Потім до сухого залишку у фарфоровій чашці додавали 20 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної, вміст чашки ретельно перемішували, переносили до ділильної лійки і кислий розчин збовтували з 15 мл хлороформу, відкидаючи фазу органічного розчинника. Після цього кислий водний залишок підлугували 20% розчином натрію гідроксиду до рН 8-9 і тричі екстрагували флувоксамін діетиловим етером по 10 мл кожного разу. Органічні екстракти фільтрували через фільтр з 0,5 г безводного натрію сульфату у мірну колбу об'ємом 50 мл і доводили до позначки етером.

Паралельно проводили “холості” досліді для отримання розчинів порівняння.

Виявлення та ідентифікацію флувоксаміну в отриманих екстрактах проводили за допомогою кольорових реакцій, ТШХ та УФ-спектроскопії.

Для флувоксаміну характерна кольорова реакція з реактивом Лібермана (брудно-фіолетове забарвлення, яке переходить у сіре; чутливість — 5,0 мкг препарату в пробі). Паралельно проводили контрольні досліді зі стандартним розчином флувоксаміну в хлороформі (10 мкг/мл) та витяжкою з “холостого” досліді.

Виявлення флувоксаміну в екстрактах методом ТШХ проводили з використанням хроматографічних пластинок Сорбфіл (силікагель ПТСХ-П-А, фракція 5-17 мкм, розмір — 10x10 см) та Merck (Silica gel 60 F254, розмір — 10x20 см). Від 5 до 25 мл етерної витяжки випаровували до мінімального об'єму (0,05 мл) і наносили в одну точку на лінію старту хроматографічної пластинки. На відстані 2 см від вказаної точки наносили розчин “свідка” флувоксаміну (10 мкг у пробі). У третю точку наносили 5 мл випареної витяжки, одержаної у “холостому” досліді. Спочатку хроматограми розвивали у рухомій фазі хлороформ для відокремлення домішок від препарату (домішки переважно мігрували з фронтом розчинника до лінії фінішу, а флувоксамін залишався на лінії старту). Після ТШХ-очистки екстракти досліджували у рухомих фазах: метанол-амонію гідроксиду 25% розчин (100:1,5) та толуен-ацетон-амонію гідроксиду 25% розчин (45:45:7,5:2,5). Після розвитку хроматограм пластинки висушували на повітрі і проглядали за допомогою реактиву Драгендорфа у модифікації Мунье (жовтогарячий колір плям флувоксаміну на жовтому фоні; чутливість виявлення флувоксаміну на вказаних пластинках складала 2,0-4,0 мкг препарату у пробі, відповідно). Плями флувоксаміну, виділеного з біологічного матеріалу, та флувоксаміну-стандарту за величинами Rf співпадали та складалі у рухомих фазах: метанол-амонію гідроксиду 25% розчин

(100:1,5) 0,55±0,02 (для пластинок Сорбфіл) та 0,45±0,02 (для пластинок Merck), толуен-ацетон-етанол-амонію гідроксиду 25% розчин (45:45:7,5:2,5) 0,72±0,02 (для пластинок Сорбфіл) та 0,65±0,02 (для пластинок Merck). Витяжки з “холостих” дослідів не давали плям з вказаними значеннями Rf.

Для виявлення флувоксаміну УФ-спектроскопічним методом використовували елюати з хроматограм. Для цього з непрявленої смуги хроматограми на рівні, що відповідав місцю знаходження плями “свідка” флувоксаміну, знімали шар сорбенту, який двічі збовтували з метанолом та фільтрували. Ступінь елюювання флувоксаміну при цьому становив 98,5±1,0%. Отриманий елюат випаровували, сухий залишок розчиняли в 4 мл кислоти хлоридної 0,1 М розчині. Як розчин порівняння використовували кислоту хлоридну 0,1 М розчин. УФ-спектр елюату був аналогічним спектру стандартного розчину флувоксаміну в кислоті хлоридній 0,1 М розчині та мав смугу поглинання при довжині хвилі 246±2 нм.

Кількісне визначення флувоксаміну в витяжках проводили методом екстракційної спектрофотометрії у видимій області з використанням реакції утворення іонного асоціату з метиловим оранжевим. Вміст препарату в екстрактах розраховували за допомогою рівняння $A = 0,00421C + 0,01$ ($r = 0,99985$; $S^2 = 3 \cdot 10^{-5}$).

Градувальну залежність встановлювали з використанням стандартного розчину флувоксаміну в хлороформі, що містив 300 мкг препарату в 1 мл. У ділильні лійки вносили по 5 мл ацетатного буферного розчину з рН 4,6, по 5 мл метилового оранжевого 0,05% розчину і додавали по 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 та 0,8 мл стандартного розчину флувоксаміну та додавали хлороформ до загального об'єму 15 мл. Суміш у ділильних лійках збовтували протягом 5 хв за допомогою апарату для струшування рідин і залишали на 10 хв для розділення фаз. Збирали по 14 мл хлороформних витяжок, відкидаючи їх

Таблиця

Результати екстракційно-спектрофотометричного визначення флувоксаміну, виділеного з печінки ацетоном (за методом Карташова В.А.) та підкисленим ацетонітрилом (за методом Шведзінські І.)

Метод ізолювання	Додано флувоксаміну, мкг (до m г печінки)	Виділено флувоксаміну		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
Ацетоном (метод Карташова В.А.)	500 (m=5)	47,5	9,5	$\bar{X} = 9,6$ $S = 0,8$ $S_x = 0,4$ $\Delta X = 1,0$ $\varepsilon = 10,6$ $X \pm \Delta X = 9,6 \pm 1,0$
		51,0	10,2	
		53,5	10,7	
		45,5	9,1	
		43,0	8,6	
Підкисленим ацетонітрилом (метод Шведзінські І.)	2000 (m=20)	524,0	26,2	$\bar{X} = 26,7$ $S = 1,6$ $S_x = 0,7$ $\Delta X = 2,0$ $\varepsilon = 7,5$ $X \pm \Delta X = 26,7 \pm 2,0$
		550,0	27,5	
		562,0	28,1	
		482,0	24,1	
		552,0	27,6	

перші порції (близько 1 мл), до яких додавали по 2 мл кислоти сульфатної 1% розчину в абсолютному етанолі.

Оптичну густину отриманих розчинів, забарвлених у червоний колір, вимірювали за допомогою спектрофотометра СФ-46 (світлофільтр з $\lambda_{\max} = 540 \pm 2$ нм; кювета з товщиною шару рідини 10 мм). Як розчини порівняння використовували "холості" дослідні (метиловий оранжевий не екстрагується хлороформом в інтервалі рН від 3 до 7).

Світлопоглинання забарвлених розчинів підлягало закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 15 до 240 мкг флувоксаміну в 14 мл кінцевого об'єму. Відносна помилка кількісного визначення не перевищувала 2,6%.

Результати та їх обговорення

При розробці методів аналізу флувоксаміну в біологічному ма-

теріалі було встановлено, що після ізолювання зазначеного препарату ацетоном та підкисленим ацетонітрилом отримані біологічні екстракти вміщували велику кількість домішок, які заважали подальшому виявленню та кількісному визначенню досліджуваної лікарської речовини. Так, результати вимірювань показників оптичної густини, отримані екстракційно-спектрофотометричним методом з метиловим оранжевим для екстрактів з "холостих" дослідів за наведеними вище методами ізолювання, становили 0,058-0,088 (метод Карташова В.А.) та 0,140-0,160 (метод Шведзінські І.). Після додаткового екстракційного очищення, яке проводили за наведеною вище методикою, оптична густина екстрактів не перевищувала 0,020-0,050 та 0,026-0,045, відповідно, в області спектра, що відповідала максимуму світлопоглинання забарвлених розчинів іонних асоціатів флувоксаміну з метиловим оранжевим.

Отримані таким чином очищені екстракти використовували для виявлення в них флувоксаміну методом ТШХ та кольоровими реакціями. Ідентифікацію препарату за УФ-спектрами проводили тільки після додаткового очищення екстрактів методом ТШХ, аналізуючи елюати з хроматограм.

Результати кількісного визначення флувоксаміну, виділеного з печінки методами Карташова В.А. та Шведзінські І., наведені в таблиці. Як видно, за допомогою запропонованих методик з печінки можна виділити $9,6 \pm 1,0\%$ та $26,7 \pm 2,0\%$ флувоксаміну відповідно. Таким чином, метод ізолювання за допомогою підкисленого ацетонітрилу за Шведзінські І. є значно більш ефективним по відношенню до флувоксаміну, ніж метод Карташова В.А. з використанням ацетону як екстрагента.

ВИСНОВКИ

1. Вивчено роздільну спроможність відносно флувоксаміну методів ізолювання лікарських речовин ацетоном (за методом Карташова В.А.) та підкисленим ацетонітрилом (за методом Шведзінські І.), які дозволили виділити, відповідно, $9,6 \pm 1,0\%$ та $26,7 \pm 2,0\%$ досліджуваного антидепресанта. Встановлено, що метод Шведзінські І. є більш ефективним, ніж метод Карташова В.А.

2. Показана можливість використання методу тонкошарової хроматографії, кольорових реакцій, УФ-спектроскопії для виявлення флувоксаміну, виділеного з біологічного матеріалу, після попередньої додаткової очистки витяжок від супутніх домішок за допомогою поєднання методів екстракції та ТШХ. Отримані результати можуть бути використані для судово-токсикологічних досліджень біологічного матеріалу при смертельних отруєннях флувоксаміном.

ЛІТЕРАТУРА

1. Баюрка С.В., Карпушина С.А., Бондар В.С. //Вісник фармації. — 2009. — № 1 (57). — С. 19-22.
 2. Вергейчик Т.Х. Токсикологическая химия. — М.: МЕДпресс-информ, 2009. — 400 с.

3. Карташов В.А., Кнауб В.А., Чернова Л.В. //СМЭ. — 1988. — №1. — С. 33-35.
4. Крамаренко В.П. Токсикологічна хімія. — К.: Вища шк., 1995. — 423 с.
5. Крылов В.И. //ФАРМиндекс-Практик. — 2003. — Вып. 5. — С. 22-32.
6. Машковский М.Д. Лекарственные средства: 15-е изд. — М.: ООО "Изд-во Новая Волна", 2006. — С. 94-95.
7. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов: Учеб. пособ. / Под ред. проф. Н.И.Калетиной. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — 1016 с.
8. Токсикологическая химия: Учеб. для вузов / Т.В.Плетенева, Е.М.Саломатин, А.В.Сыроежкин и др. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. — 512 с.
9. Удалов А.В. //Лабораторн. журн. — 2003. — №1 (3). — С. 54-58.
10. Элленхорн М.Дж. Медицинская токсикология: Диагностика и лечение отравлений у человека: В 2-х т. / Пер. с англ. — М.: Медицина, 2003. — Т. 1. — 1048 с.; Т. 2. — 1044 с.
11. Bateman N.D. Antidepressants: Poisonous substances. — Amsterdam: Elsevier, 2007. — P. 587-589.
12. BJORHOUDE A., HALVORSEN G.T., RASMUSSEN K.E. et al. //Anal. chim. acta. — 2003. — Vol. 491, №2. — P. 155-161.
13. Carson H.J. //Leg. Med. — 2007. — Vol. XXX. — P. 1-4.
14. Castro A., Fernandez M.d.M.R., Laloup M. et al. //J. Chromatogr. A. — 2007. — Vol. 1160, №1. — P. 3-12.
15. Cheeta S., Schifano F., Oyefeso A. et. al. //Brit. J. Psychiatry. — 2004. — №184. — P. 41-47.
16. Clark's analysis of Drugs and Poisons. 3-rd ed. — Pharmaceutical Press, 2005 (CD).
17. Isbister G.K., Bowe S.J., Dawson A. et. al. //J. Toxicol. Clin. Toxicol. — 2004. — №42. — P. 277-285.
18. Poisoning & Drug Overdose. 4-th ed. / Ed. K.R. Olson. — Zange Medical Books, Mc Graw-Hill, 2004. — P. 88-93.
19. Randall C. Baselt. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. — California, Foster City: Chemical Toxicology Institute, 2000. — P. 476-478.
20. Reeves R.R., Mack J.E., Beddingfield J.J. //Ann. Pharmacother. — 2002. — Vol. 36. — P. 440-443.
21. Shinozuka T., Terada M., Tanaka E. //Forens. Sci. Int. — 2006. — Vol. 162. — P. 108-112.
22. Sim F.H., Massabki R.A. //Can. J. Psych. — 2000. — Vol. 45. — P. 762-763.
23. Szedzinski I. //Arch. Med. Sad. Kryminal. — 1978. — Vol. 28. — P. 199.

Адреса для листування: 61168, м. Харків,
вул. Блюхера, 4. Тел. (572) 67-91-92.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 24.05.2011 р.