УДК 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИДЕПРЕСАНТА ФЛУВОКСАМІНА В КРОВІ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ З МУЛЬТИХВИЛЬОВИМ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИМ ДЕТЕКТУВАННЯМ

Баюрка С.В., Карпушина С.А., Мороз В.П.

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

Вступ. Флувоксамін ((Е)-5-метокси-1-[4-(трифлюорметил)феніл]-1-пентанон-*О*-(2-аміноетил)оксиму малеат) – новітній антидепресант з групи селективних інгібіторів зворотнього захвату серотоніну (СІЗЗС). Він не перевершує трициклічні антидепресанти за клінічною ефективністю, але менш токсичний. Дані літератури свідчать про ефективність використання флувоксаміну для лікування депресій різної етіології. Причиною 77 % випадків гострих та смертельних отруєнь, з якими асоціюється флувоксамін, було сумісне надходженням разом з флувоксаміном бензодіазепінів, нейролептиків, етанолу або іншого антидепресанта [3]. Токсичні концентрації флувоксаміну в плазмі крові, які було зареєстровано при гострих отруєннях, становили 500 мкг/л [1], 160 – 1400 мкг/л, 115 – 746 мкг/л [2]. Смертельні концентрації флувоксаміну в крові, зареєстровані у різних випадках, становили 3,5 мг/л; 3,4 – 11 мг/л; 2,8 мг/л [1], 3554 нг/мл [3].

Більшість наведених в сучасних літературних джерелах біоаналітичних методик визначення флувоксаміну базується на використанні ВЕРХ з мас-спектрометричним та тандемним мас-спектрометричним детектуванням [4, 5]. Для пробопідготовки переважно рекомендовано метод твердофазної екстракції (ТФЕ), *on line* ТФЕ, твердофазної мікроекстракції (ТФМЕ) [4, 5]. Перелічені вище методи аналізу потребують спеціальних матеріалів та коштовного обладнання, що робить їх малодоступними.

Мета дослідження. Розробка методики визначення флувоксаміну в крові методом обернено-фазної високоефективної рідинної хроматографії з мультихвильовим УФ-спектрофотометричним детектуванням (ВЕРХ-УФД) з використанням рідинно-рідинної екстракції на етапі пробопідготовки.

Методи дослідження. Методика ізолювання флувоксаміну з крові. До 10 мл донорської крові додавали по 1 мл водного розчину флувоксаміну, що містив від 100 до 500 мкг препарату, перемішували і залишали на добу. Через добу до 10 мл модельної суміші флувоксаміну з кров'ю додавали 10 мл 10 % розчину кислоти трихлорацетатної і перемішували. Після цього суміш центрифугували на протязі 15 хв зі швидкістю 3000 об/хв. Центрифугат зливали та однократно екстрагували домішки 10 мл хлороформу і фазу органічного розчинника відокремлювали та відкидали, а потім, після підлуговування водної фази до pH 8 – 9 20 % розчином натрій гідроксиду, тричі екстрагували флувоксамін діетиловим етером по 10 мл кожного разу. Одержані «лужні» екстракти фільтрували через фільтр з 0,5 г безводного натрій сульфату у мірну колбу об'ємом 50 мл і доводили до позначки етером. Після цього проводили видалення співекстрактивних компонетів біологічної матриці методом ТШХ.

Від 5 до 15 мл екстрактів, отриманих після додаткової екстракційної очистки, випаровували до мінімального об'єму (0,05 мл) та кількісно наносили смугою на лінію старту хроматографічної пластини Merck. На відстані 2 см від досліджуваної проби екстракту наносили 10 мкл хлороформного розчину флувоксаміна-«свідка» з концентрацією 1 мг/мл. Поряд наносили смугою 5,0 – 15,0 мл випареної до мінімального об'єму витяжки, одержаної у «холостому» досліді. Спочатку хроматограми розвивали у хлороформі, висушували на повітрі та розвивали вдруге у рухомій фазі метанол – 25 %-розчин амоній гідроксиду (100 : 1,5). Хроматограму проявляли реактивом Драгендорфа, модифікованим за Мун'є. Плями флувоксаміну, виділеного з крові, та флувоксаміну-«свідка» за величинами R_f співпадали та складали у рухомій фазі метанол – 25 %-розчин амоній гідроксиду (100 : 1,5) 0,52 ± 0,03. Витяжки з «холостих» дослідів не давали плям із вказаними значеннями R_f. З непроявленої смуги хроматограми на рівні, що відповідав місцю знаходження плями флувоксаміна-«свідка», за допомогою скальпеля знімали шар сорбенту з площі 30 мм х 10 мм, який переносили до мікропробірки з притертою пробкою, двічі збовтували з метанолом (по 2 мл кожного разу) та фільтрували через паперовий фільтр, попередньо змочений елюентом, у порцелянову чашку. Розчинник випаровували на водяній бані при температурі, не вищий, ніж 40°С, сухий залишок розчиняли в 1 мл етанолу. Ступінь елюювання флувоксаміну складав 98,5 ± 1,0 %.

Хроматографування елюатів проводили на мікроколоночному хроматографі з мультихвильовим УФ-спектрофотометричним детектором. Використовували колонку розміром 2 х 75 мм з оберненою фазою C_{18}; елюент А: 0,2 М перхлорат літію – 0,005 М перхлорна кислота, елюент Б: ацетонітрил, режим елюювання – градієнтний (від 5 % Б до 100 % Б за 4 хв, 100 % Б протягом 3 хв); швидкість подачі елюента 100 мкл/хв; температура термостата колонки 40º С. Детектування проводили при 8 довжинах хвиль: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм. Для побудови калібрувального графіку готовили стандартний розчин (СР) та робочі стандартні розчини (РСР) флувоксаміну в етанолі. Для цього 0,0068 г флувоксаміну малеату, що в перерахунку відповідало 0,0050 г основи флувоксаміну, вносили до мірної колби місткістю 50,00 мл, розчиняли в етанолі та доводили об'єм розчину до мітки вказаним розчинником (СР з концентрацією 100,0 мкг/мл). Для приготування РСР у мірні колби місткістю 10,00 мл вносили по 0,30; 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 7,00; 8,00 та 9,00 мл СР і доводили об'єми розчинів до мітки етанолом (РСР 1 – 8 відповідно, концентрація – 3,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 70,0; 80,0 та 90,0 мкг/мл). За допомогою автосамплеру до хроматографу вводили по 10 мкл СР та РСР. Кількісне визначення проводили при довжині хвилі 250 нм.

Основні результати. Аналіз флувоксаміну проводили за уніфікованою методикою в хроматографічній системі, що призначена для ВЕРХ-скринінгу лікарських речовин і відповідає базі даних «ВЕРХ-УФ» для хроматографа «Міліхром А-02» (БД-2003-500). Такі бази даних з параметрів утримування і спектральних характеристик речовин в теперішній час досить популярні, оскільки дозволяють використовувати метод ВЕРХ-УФД як на

підтверджуючому етапі ідентифікації, так і в токсикологічному скринінгу. Час утримування для флувоксаміну становив t_R = 21,86 ± 0,04 хв (RSD = 0,08 %, ε = 0,20 %, P = 95 %, ν = 2); спектральні відношення ($R = S_\lambda/S_{210}$) при зазначених вище довжинах хвиль дорівнювали, відповідно, 0,539 ± 0,009; 0,534 ±0,008; 0,763 ± 0,009; 0,908 ± 0,004; 0,861 ± 0,008; 0,322 ± 0,008; 0,031 ± 0,006. LOD = 0,6 мкг/мл при λ=250 нм ($LOD = 3{,}3S_a/b$). Кількісне визначення проводили за залежністю площі піку від концентрації (мкг/мл). Градуювальна залежність описувалась рівнянням: $y = (1{,}41\cdot10^{-3} \pm 1\cdot10^{-5})x$; r = 0,999; LOQ = 2,0 мкг/мл ($LOQ = 10S_a/b$). Лінійність спостерігали в межах концентрацій флувоксаміну 3,0 – 100 мкг/мл. Правильність розробленої методики складала 101,7 % (RSD = 1,5 %) на низькому концентраційному рівні, 100,8 % (RSD = 0,9 %) на середньому концентраційному рівні, 100,1 % (RSD = 0,7 %) на високому концентраційному рівні.

За результатами кількісного визначення флувоксаміну в елюатах з хроматограм встановлено, що ефективність розробленої методики рідинно-рідинної екстракції вказаного антидепресанта з крові становила 19 ± 1 % (ε = 6,9 %, P = 95 %, ν = 4)

Висновки. Розроблена ефективна методика рідинно-рідинної екстракції флувоксаміну з крові діетиловим етером з лужного середовища з наступною додатковою екстракційною та ТШХ-очисткою, яка дозволила виділити 19 ± 1 % антидепресанта. Поєднання параметрів утримування і спектральних характеристик дозволяє провести ідентифікацію флувоксаміну методом ВЕРХ з мультихвильовим УФ-спектрофотометричним детектуванням в умовах токсикологічного скринінгу. Розроблена методика кількісного визначення флувоксаміну методом ВЕРХ-УФД характеризується досить низькими значеннями меж виявлення та кількісного визначення, допустимою лінійністю, правильністю та прецизійністю, що робить її придатною для цілей судово-токсикологічних досліджень.

Список літератури

1. Baselt, C. R. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man / Randall C. Baselt. – [9-th ed.]. – Seal Beach, California : Biomedical Publications, 2011. – 1900 p.
2. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material: 4-th edition / A. C. Moffat; M.D. Osselton; B. Widdop [et al.]. – London, Chicago: Pharmaceutical Press, 2011. – 2736 p.
3. First death case of serotonin syndrome in Japan induced by fluvoxamine and tandospirone / T. Kawano, T. Kosuge, S. Takagi [et al.] // Chudoku Kenkyu. – 2011. – 24 (4). – P. 305–310.
4. Kollroser, M. An on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of citalopram, fluvoxamine, and paroxetine in human plasma / M. Kollroser, C. Schober // Chromatographia. – 2003. – V. 57 (3–4). – P. 133–138.
5. Simultaneous analysis of fluoxetine, norfluoxetine, citalopram, and haloperidol in plasma by LC–ESI-IT-MS / A. W. El-Rjoob, M. Tahtamouni, Y. R. Tahboub // Chromatographia. 2010. – V. 71 (5–6). – P. 423–430.