

Рекомендована д.х.н., професором С.М.Коваленком

УДК 615.07:615.9:54.062

## ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА МЕТОДІВ ВИДІЛЕННЯ ФЛУОКСЕТИНУ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

В.С.Бондар, Г.О.Бур'ян

Національний фармацевтичний університет

**Вивчені умови ізолювання флуоксетину з біологічного матеріалу за допомогою методів О.О.Васильєвої, Стаса-Отто, В.П.Крамаренка. Показано, що метод Васильєвої дозволяє ізолювати до 55% препарату з модельних сумішей флуоксетину з печінкою, метод Стаса-Отто — до 42,5%, а метод Крамаренка — до 70%. Розроблений ефективний метод ізолювання флуоксетину за допомогою хлороформу, який дозволяє виділити до 75% препарату з біологічного матеріалу.**

Флуоксетин (портал, прозак, продеп, окседеп, профлузак) — ( $\pm$ )-N-метил-3 феніл-(пара-три-фторметил) феноксипропіламіну гідрохлорид — це ефективний антидепресивний засіб [5, 7], який широко застосовується в медичній практиці при лікуванні неглибоких депресій [8, 9].

Відомі випадки смертельних отруєнь цим препаратом [1, 10, 11]. Зазначеними обставинами пояснюється підвищений інтерес до хіміко-токсикологічних досліджень флуоксетину.

У зв'язку з відсутністю в доступній нам літературі даних по систематичного вивчення методів виділення флуоксетину з біологічного матеріалу ми поставили за мету в даній роботі вирішити цю задачу.

Ми вивчили можливість виділення флуоксетину з біологічного матеріалу за допомогою загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів: О.О.Васильєвої (ізолювання водою, підкисленою шавлевою кислотою), Стаса-Отто (ізолювання спиртом, підкисленим шавлевою кислотою), В.П.Крамаренка (ізолювання водою, підкисленою сірчаною кислотою) [4], а також розробили більш експресний та ефективний метод ізолювання препарату.

Одним із важливих чинників, що впливає на процес ізолювання, є ступінь екстракції препарату з водних розчинів органічними розчинниками. Попередньо ми дослідили ступінь екстракції флуоксетину з водних розчинів в залежності від рН середовища і природи органічних розчинників, які широко застосовуються в хіміко-токсикологічних аналізах. Під час досліджень було встанов-

лено, що найбільш придатним розчинником для виділення флуоксетину з водних розчинів є хлороформ, який при рН 8-9 екстрагує до 99% препарату [2].

### Експериментальна частина

Для дослідження ізолювання флуоксетину з біологічного матеріалу використовували модельні суміші печінки труп людини, яка загинула від травми, що не зазнала гнилісних змін, з флуоксетином.

До 10 г подрібненої печінки додавали 1,0 мл водного розчину флуоксетину, що містив 2000 мкг препарату, ретельно перемішували і залишали на 24 години. Паралельно ставили контрольний дослід.

Ізолювання флуоксетину з біологічного матеріалу проводили за допомогою модифікованих методів О.О.Васильєвої, Стаса-Отто, В.П.Крамаренка, а також розробленого нами методу елювання флуоксетину з біологічного матеріалу хлороформом. Модифікація методів полягала в зменшенні наважок біологічного матеріалу до 10 г. Відповідно були зменшені й об'єми органічних розчинників. При використанні зазначених вище методів екстракцію флуоксетину з підлученої водної витяжки проводили хлороформом 3 рази по 10 мл.

Ми запропонували методику ізолювання флуоксетину з біологічного матеріалу за допомогою хлороформу.

**Методика ізолювання флуоксетину з біологічного матеріалу за допомогою хлороформу.** 10 г печінки, що містить препарат, розтирають у ступці з 30 г безводного натрію сульфату і переносять отриману сипку масу у скляну колонку діаметром 17-20 мм (у вузьку нижню частину колонки поміщають ватний тампон). Над колонкою поміщають ділильну лійку, яка містить 100 мл хлороформу. Хлороформ пропускають через колонку зі швидкістю 60-80 крапель за хвилину, утримуючи "дзеркало" над біологічним матеріалом. За цих умов утворюється до 90 мл хлороформної витяжки. Вимірюють об'єм отриманої хлороформної витяжки, відбирають у ділильну лійку половину, збовтують 3 рази по 10 мл з новими порціями

Таблиця 1

Результати УФ-спектрофотометричного визначення флуоксетину в хлороформному розчині (середнє з 5 визначень)

№ п/п	Взято флуоксетину, мкг	Оптична густина	Знайдено		Метрологічні характеристики
			мкг	%	
1	40	0,108	41	102,50	$\bar{X}=99,55\%$ ; $S_{\bar{x}}=1,78$ ; $S_x=0,67$ ; $\Delta x = \pm 1,59$ ; $E=1,59$ ; $X \pm \Delta x = 99,55 \pm 1,59$
2	50	0,146	48	96,00	
3	80	0,206	81	101,25	
4	100	0,276	98	98,00	
5	200	0,530	201	100,50	
6	300	0,741	298	99,33	
7	400	0,998	397	99,25	

0,01 М кислоти хлористоводневої протягом 5-7 хвилин. У верхніх водних шарах утворюється пінна емульсія, яку руйнують за допомогою центрифуги (протягом 5 хв зі швидкістю 4000 об/хв). Кислу водну витяжку (рН $\approx$ 2) відокремлюють за допомогою ділильної лійки, двічі збовтують протягом 5 хвилин з новими порціями діетилового ефіру (по 10 мл). Ефірні шари відокремлюють і надалі не досліджують. Кислу водну витяжку підлужують 20% розчином гідроксиду натрію до рН 9-10 за універсальним індикатором і тричі збовтують з новими порціями хлороформу (по 10 мл). Лужні хлороформні витяжки об'єднують та аналізують. Паралельно проводять контрольний дослід.

Для виявлення флуоксетину у витяжках з біологічного матеріалу використовували метод хроматографії в тонких шарах сорбенту на пластинках "Sorbfil" (силікагель СТХ-1А, тип підкладки ПЕТФ).

Хроматографічні пластинки попередньо висушували та активували в сушильній шафі при 110°C протягом 30 хв. На лінію старту за допомогою скляних капілярів наносили три проби: стандартний розчин флуоксетину в хлороформі; хлороформну витяжку з біологічного матеріалу з препаратом та хлороформну витяжку з біоматеріалу, отриману в контрольному досліді.

Об'єм нанесених проб відповідав 0,5 г біологічного матеріалу при ізолюванні методами О.О.Васильєвої або Стаса-Отто та 0,2 г при ізолюванні за методом В.П.Крамаренка або хлороформом.

Системою розчинників служила суміш метанол-аміак (9:1). Пластинки хроматографували в камері об'ємом 1000 см<sup>3</sup> та зі шляхом пробігу системи розчинників 7 см і висушували на повітрі. Для проявлення плям використовували УФ-промені, пари йоду та реактив Драгендорфа.

Значення Rf флуоксетину для всіх методів ізолювання складали 0,51-0,53. У парах йоду та під

дією реактиву Драгендорфа плями флуоксетину забарвлюються у коричневий колір.

При хроматографічному дослідженні витяжок плями деяких коекстрактивних речовин мали значення Rf, близькі до значень Rf препарату.

У зв'язку з цим пластинки "Sorbfil" попередньо чистили хлороформом в хроматографічній камері. Після висушування на пластинки наносили проби та знову хроматографували в камері з хлороформом. При цьому плями флуоксетину залишались на лінії старту, а коекстрактивні речовини мігрували. Після цього пластинки хроматографували в системі метанол — аміак (9:1), висушували і проявляли парами йоду та реактивом Драгендорфа. За цих умов спостерігався задовільний поділ плям флуоксетину та коекстрактивних речовин, які залишались нижче та вище за плями флуоксетину.

Кількісне визначення флуоксетину проводили за допомогою розроблених нами методів УФ-спектрофотометрії та екстракційної фотометрії з використанням кислотного індикатора метилового оранжевого.

#### Методика УФ-спектрофотометричного визначення флуоксетину

Пробу хлороформної витяжки (1/2 частина отриманої хлороформної витяжки), отриману одним з вищенаведених методів, помішали у порцелянову чашку, випаровували на водяній бані (40°C), сухий залишок розчиняли в 0,5 мл хлороформу. Після цього пробу об'ємом 0,01 мл розчину наносили на хроматограму (частина А), решту розчину наносили на хроматограму у вигляді смуги (частина Б). Пластинку хроматографували в системі метанол-аміак (9:1), висушували, частину А відділяли та проявляли парами йоду. Знімали шар сорбенту на частині Б у місці знаходження плями на частині А, збовтували у 10 мл хлороформу на протязі 10 хв, фільтрували, переносили у порцелянову чашку та випаровували на водяній бані (40°C). Після цього розчиняли сухий залишок у 5 мл хлороформу та знімали значення оптичної густини на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 264 $\pm$ 2 нм. В ролі розчину порівняння використовували хлороформний розчин, одержаний при проведенні контрольного досліді. Концентрацію флуоксетину визначали за допомогою градуювального графіка. Результати кількісного визначення флуоксетину за допомогою УФ-спектрофотометрії наведені в табл. 1.

#### Методика побудови градуювального графіка для УФ-спектрофотометричного визначення флуоксетину

В мірну колбу ємкістю 5 мл вносили по 0,08; 0,1; 0,16; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 мл стандартного розчину флуоксетину в хлороформі (в 1 мл розчину містилось 500 мкг препарату), додавали хлороформ до мітки, перемішували та спектрофотометрували на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 264 $\pm$ 2 нм в

Таблиця 2

Результати екстракційно-фотометричного визначення флуоксетину (середнє з 5 визначень)

№ п/п	Взято флуоксетину, мкг	Оптична густина	Знайдено		Метрологічні характеристики
			мкг	%	
1	8	0,11	8,2	102,50	$\bar{X}=99,57\%$ ; $S=2,41$ ; $S_x=0,91$ ; $\Delta x=\pm 2,15$ ; $E=2,16$ ; $\bar{X} \pm \Delta x = 99,57 \pm 2,15$
2	10	0,13	9,5	95,00	
3	20	0,27	19,5	97,50	
4	25	0,34	25,5	102,00	
5	40	0,52	39,5	98,75	
6	50	0,66	50,0	100,00	
7	80	1,10	81,0	101,25	

кюветі з товщиною шару 10 мм [3]. Як розчин порівняння використовували хлороформ.

Паралельно проводили визначення флуоксетину в досліджуваних розчинах за допомогою методу екстракційної фотометрії.

Було встановлено, що 0,05% розчин метилового оранжевого утворює з флуоксетином в середовищі буферного розчину з рН 4,6 іонні асоціати, які екстрагуються хлороформом. Так як забарвлення розчинів іонних асоціатів виявилось малоінтенсивним, то для підсилення чутливості методу утворені асоціати руйнували додаванням до хлороформного розчину 1% розчину сірчаної кислоти в абсолютному етанолі. При цьому одержували розчини, які мали значно вищу оптичну густина. Величину рН буферного розчину контролювали за допомогою рН-метра №5123 (Польща).

**Методика побудови градувального графіка для екстракційно-фотометричного визначення флуоксетину**

В ділильні лійки вносять по 5 мл ацетатного буферного розчину [6] з рН 4,6; по 5 мл 0,05% розчину метилового оранжевого та по 0,1; 0,2; 0,25; 0,5; 1,00 мл стандартного розчину флуоксе-

тину в хлороформі, в 1 мл якого міститься 100 мкг препарату (в усіх випадках об'єм доданого стандартного розчину доводили хлороформом до 10 мл). Ділильні лійки струшували (апарат для струшування АБУ-6с, частота — 120 стр/хв) протягом 5 хв. Потім залишали на 10 хв для розділення фаз. Хлороформні шари відокремлювали та додавали до них по 2,00 мл 1% розчину сірчаної кислоти в абсолютному етанолі. Оптичну густина забарвлених розчинів вимірювали за допомогою фотокориметра КФК-2 (світлофільтр з  $\lambda = 540 \pm 10$  нм, товщина шару рідини 20 мм). Як розчин порівняння використовували розчин, отриманий в контрольному досліді.

**Методика екстракційно-фотометричного визначення флуоксетину**

1 мл хлороформної витяжки, отриманої одним із зазначених методів, доводили хлороформом до 10 мл, додавали 5 мл ацетатного буферного розчину з рН 4,6 та 5 мл 0,05% розчину кислотного індикатора метилового оранжевого. Далі робили, як зазначено у методиці побудови градувального графіка. Паралельно ставили контрольний дослід. Результати кількісного визначення флуоксетину в розчинах за допомогою градувального графіка наведені в табл. 2.

**Результати та їх обговорення**

При розробці методики кількісного визначення флуоксетину за допомогою методу УФ-спектрофотометрії було встановлено, що оптична густина розчинів підлягає основному закону світлопоглинання при вмісті від 40 до 400 мкг флуоксетину в 1 мл хлороформного розчину.

Оптична густина забарвлених розчинів флуоксетину при проведенні кількісного визначення за допомогою екстракційної фотометрії підпорядковується основному закону світлопоглинання в межах концентрацій від 7,5 до 75 мкг препарату в 12 мл кінцевого об'єму.

Результати визначень концентрації флуоксетину у витяжках з біологічного матеріалу за допомо-

Таблиця 3

Результати ізолювання флуоксетину з біологічного матеріалу (модельні суміші з печінкою) та їх метрологічні характеристики (середнє з 5 визначень)

№ п/п	Метод ізолювання	Метод аналізу			
		Екстракційна фотометрія		УФ-спектрофотометрія	
		Виділено флуоксетину, %	Метрологічні характеристики	Виділено флуоксетину, %	Метрологічні характеристики
1	О.О.Васильєвої	54,94	$\bar{X}=54,94\%$ ; $S=2,21$ ; $S_x=0,99$ ; $\Delta x=\pm 2,54$ ; $E=4,62$	51,60	$\bar{X}=51,60\%$ ; $S=1,39$ ; $S_x=0,62$ ; $\Delta x=\pm 1,59$ ; $E=3,09$
2	Стаса-Отто	42,50	$\bar{X}=42,50\%$ ; $S=1,97$ ; $S_x=0,88$ ; $\Delta x=\pm 2,27$ ; $E=5,34$	42,00	$\bar{X}=42,00\%$ ; $S=1,22$ ; $S_x=0,54$ ; $\Delta x=\pm 1,40$ ; $E=3,35$
3	В.П.Крамаренка	67,25	$\bar{X}=67,25\%$ ; $S=2,40$ ; $S_x=1,07$ ; $\Delta x=\pm 2,76$ ; $E=4,11$	70,20	$\bar{X}=70,20\%$ ; $S=1,95$ ; $S_x=0,87$ ; $\Delta x=\pm 2,24$ ; $E=3,20$
4	Ізолювання хлороформом	75,22	$\bar{X}=75,22\%$ ; $S=2,56$ ; $S_x=1,14$ ; $\Delta x=\pm 2,95$ ; $E=3,92$	74,20	$\bar{X}=74,20\%$ ; $S=1,52$ ; $S_x=0,68$ ; $\Delta x=\pm 1,75$ ; $E=2,36$

гою УФ-спектрофотометричного та екстракційно-фотометричного методів наведені в табл. 3.

Результати ізолювання флуоксетину з біологічного матеріалу свідчать про те, що за допомогою загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів можна виділити від 42 до 70% препарату. Найбільш оптимальним є запропонований нами метод ізолювання хлороформом, який дозволяє виділити до 75% препарату з біологічного матеріалу. Крім того, розроблений метод є більш експресним.

Співставлення результатів кількісного визначення флуоксетину у витяжках з біологічного матеріалу за допомогою УФ-спектрофотометричного та екстракційно-фотометричного методів дозволяє зробити висновок, що обидва методи можуть використовуватись з цією метою. Але метод екстракційної фотометрії дозволяє визначити флуоксетин безпосередньо у витяжках із біологічного

матеріалу без застосування додаткової очистки методом ТШХ. Різниця в результатах визначень за допомогою обох методів не перевищує  $\pm 3,5\%$ .

#### ВИСНОВКИ

1. Вивчені умови ізолювання флуоксетину з біологічного матеріалу в модельних сумішах із печінкою за допомогою модифікованих методів О.О.Васильєвої, В.П.Крамаренка, Стаса-Отто. Визначено, що найбільш оптимальним методом є метод В.П.Крамаренка, який дозволяє ізолювати до 70% препарату.

2. Розроблений ефективний і експресний метод ізолювання флуоксетину хлороформом, який дозволяє виділити до 75% препарату.

3. Встановлено, що для визначення вмісту флуоксетину у витяжках з біологічного матеріалу можуть бути використані УФ-спектрофотометричний та екстракційно-фотометричний методи.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Бертрам Г. Катцунг. *Базисная и клиническая фармакология*. — М.: Бином, 1998. — Т. 1. — С. 545-557.
2. Бур'ян Г.О., Бондар В.С. // *Фізіологічно активні речовини*. — 2001. — №2 (32). — С. 44-46.
3. Бур'ян Г.О., Бондар В.С., Погосян О.Г. // *Вісник фармації*. — 2001. — №2 (26). — С. 15-18.
4. Крамаренко В.П. *Хіміко-токсикологічний аналіз*. — К.: Вища школа, 1995. — 423 с.
5. Лурье Ю.Ю. *Справочник по аналитической химии*. — М.: Химия, 1979. — 312 с.
6. Машковский М.Д. *Лекарственные средства*. — Х.: Торсинг, 1997. — Т. 1. — С. 108.
7. Appleby L., Warner R., Whitton A. // *BMJ*. — 1997. — Vol. 314. — P. 932-936.
8. Dorosz Ph. *Guide pratique des medicaments. 16-eme edition*. — Maloigne, 1996. — P. 1157.
9. Neudeck B.L., Taddonio T.E., Garner W.L. // *Pharmacotherapy*. — 1998. — Vol. 18, №4. — P. 851-855.
10. Nierenberg A.A., Keefe B.R., Leslie V.C. // *J. Clin. Psychiatry*. — 1999. — Vol. 60, №4. — P. 221-225.
11. Taddio A., Koren L. // *J. Clin. Pharmacol.* — 1996. — Vol. 36, №1. — P. 42-47.

УДК 615.07:615.9:54.062

#### СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ФЛУОКСЕТИНА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

В.С.Бондарь, А.А.Бурьян

Изучены условия изолирования флуоксетина из биологического материала с помощью модифицированных методов А.А.Васильевой, Стаса-Отто, В.Ф.Крамаренко. Показано, что метод Стаса-Отто позволяет изолировать до 42,5% препарата, метод Васильевой — до 55%, метод Крамаренко — до 70%. Разработан эффективный метод изолирования флуоксетина с помощью хлороформа, который позволяет изолировать до 75% препарата.

UDC 615.07:615.9:54.062

#### COMPARATIVE ESTIMATION OF FLUOXETINE ISOLATION METHODS FROM A BIOLOGICAL MATERIAL

V.S.Bondar, A.A.Buryan

The conditions of fluoxetine isolation from a biological material with the help of modified methods by A.A.Vasilyeva, Stas-Otto, V.F.Kramarenko have been investigated. It is shown that Stas-Otto's method allows to isolate up to 42,5% of preparation, Vasilyeva's method up to 55% and Kramarenko's method about 70%. The effective method of fluoxetine isolation by means of chloroform has been elaborated. It allows to isolate up to 75% of the preparation.