© Коллектив авторов, 2014
УДК 615.214.32.015.4.07

ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЦИТАЛОПРАМА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

С.В. Баюрка, канд. фарм. наук,
С.А. Карпушина, канд. хим. наук, **М.Н. Ивашура**, канд. сельскохоз. наук
Национальный фармацевтический университет, Украина, 61002, Харьков, Пушкинская ул., 53

E-mail: sveta.karpushina63@mail.ru

Разработан эффективный метод выделения циталопрама из биологического материала, учитывающего липофильность исследуемого препарата. Метод основан на элюировании циталопрама из гомогенизированной ткани путем растирания ее с безводным натрия сульфатом и последующей экстракционной очисткой элюатов с помощью системы растворителей гексан–ацетонитрил. Разрешающая способность метода составила 60,0±6,9%.

Ключевые слова: *циталопрам, биологический материал, цветные реакции, ТСХ, УФ-спектроскопия, ВЭЖХ.*

Циталопрам (1-[3-(диметиламино) пропил]-1-(4-фторфенил)-1,3-дигидро-5-изобензофуранкарбонитрила гидробромид) – антидепрессант группы селективних ингибиторов обратного захвата серотонина (СИОЗС), один из наиболее широко применяемых препаратов при фармакотерапии депрессий. Циталопрам неоднократно был причиной смертельных отравлений, летальная концентрация препарата в печени составляла 11–12 мг/кг [4].

Методы анализа циталопрама в биологических жидкостях достаточно широко представлены в литературе [2]. Анализ биологического материала на указанный антидепрессант разработан недостаточно, отсутствуют данные об эффективности общепринятых в химико-токсикологическом анализе методов изолирования препарата. Ранее была установлена степень выделения циталопрама с помощью общих методов: А.А. Васильевой (21,9±2,5 %), Стаса-Отто (9,8±1,4 %), В.Ф. Крамаренко (15,5±1,6 %), В.А. Карташова (15,6±1,6 %,), И. Сшедзински (35,8±2,3 %) [1]. Невысокая эффективность общих методов, вероятно, связана с липофильностью циталопрама, о чем свидетельствуют достаточно высокие значения его коэффициента липофильности (log P(октанол/вода)=3,71) и объема распределения (V_d=12–16 л/кг) [2].

Целью настоящего исследования была разработка оптимальных условий выделения циталопрама из биологического материала с помощью липофильного растворителя хлороформа.

Экспериментальная часть

В работе использованы: циталопрам рабочий стандарт (≥98% HPLC), реактивы с квалификацией не ниже «ч.д.а.». Объекты исследования: модельные смеси печени трупа с субстанцией циталопрама.

Методика изолирования циталопрама из ткани печени. К 5 г модельных проб печени трупа человека, погибшего от механической травмы, добавляли водные растворы циталопрама, содержащие 500 мкг препарата, и оставляли на сутки. Ткани печени гомогенизировали и обезвоживали путем растирания с тройным количеством безводного натрия сульфата. Полученную сыпучую массу переносили в стеклянную бюретку и циталопрам элюировали 50 мл хлороформа, добавляя его по каплям из делительной воронки. Полученный элюат очищали, взбалтывая с 50 мл воды, подщелоченной 25% раствором аммония гидроксида до pH 8, водные фазы отбрасывали и элюат упаривали на водяной бане при температуре не выше 40° С. Сухой остаток растворяли в 10 мл гексана и проводили трехкратную экстракцию циталопрама ацетонитрилом по 5 мл каждый раз. Трехкратная экстракция циталопрама из гексана ацетонитрилом в модельных опытах показала, что препарат полностью экстрагируется ацетонитрилом. Далее ацетонитрил упаривали, сухой остаток растворяли в хлороформе и количественно переносили в мерную колбу на 25 мл. Идентификацию циталопрама, выделенного из биологического материала, проводили с помощью цветных реакций, методами тонкослойной хроматографии (ТСХ), УФ-спектроскопии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Для проведения цветных реакций по 1 мл экстракта наносили точечно на хроматографические пластинки. Пробы обрабатывали реактивами Манделина (зеленоватое окрашивание) и Либермана (лимонно-желтое, переходящее в коричневое окрашивание); чувствительность 3–4 мкг в пробе.

Обнаружение циталопрама методом ТСХ проводили в трех хроматографических системах с низкой

корреляцией значений Rf исследуемого вещества и рекомендованных TIAFT для общего ТСХ-скрининга психотропных веществ [3]. Использовали хроматографические пластинки Merck (Silica gel 60 F254, 10×20 см) и подвижные фазы (пф): метанол (пф 1), 25% раствор метанол–аммония гидроксида (100:1,5) (пф 2), 25% раствор этилацетат–метанол–аммония гидроксида (85:10:5) (пф 3). Отбирали 3 пробы извлечения по 0,5–1,0 мл, упаривали до минимального объема (0,05 мл) и наносили в одну точку на линию старта хроматографической пластинки. На одну из хроматографических пластинок, которую затем развивали в пф 3, полосой длиной 2 см наносили 5 мл извлечения, упаренного до минимального объема; данную полосу после развития хроматограммы не обрабатывали проявителем. Детектировали циталопрам с помощью реактива Драгендорфа по Мунье (чувствительность – 1,0 мкг препарата в пробе). Значения Rf пятен циталопрама составили 0,15 ± 0,02 (пф 1), 0,38 ± 0,02 (пф 2), 0,75 ± 0,02 (пф 3). Циталопрам элюировали с непроявленной полосы хроматограммы метанолом (степень элюирования – 99,2%), элюат упаривали, остаток растворяли в 1 мл метанола, отбирали 10 мкл раствора и исследовали на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром А-02», как описано ниже. Оставшийся метанольный элюат упаривали, сухой остаток растворяли в 4 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты и снимали УФ-спектр полученного раствора на спектрофотометре СФ-46 (кювета 10 мм). УФ-спектр исследуемого раствора был аналогичным спектру раствора циталопрама-стандарта в 0,1 М хлористоводородной кислоте ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) и имел максимумы светопоглощения при следующих длинах волн: 239±2 (A^1_1=312,8), 270±2 (A^1_1=39,1), 276±2 (A^1_1=37,8), 285±2 нм (A^1_1=32,8).

Условия исследования методом ВЭЖХ: колонка 2×75 мм с обращенной фазой C_{18} (ProntoSIL-120-5-C18 AQ); элюент А – 0,2 М перхлорат лития – 0,005 М перхлорная кислота, элюент Б – ацетонитрил; режим элюирования – градиентный (от 5% Б до 100% Б за 4 мин, 100% Б в течение 3 мин); скорость подачи подвижной фазы 100 мкл/мин; температура термостата колонки – 40° С; объем вводимой пробы – 10 мкл; детектор мультиволновой УФ-спектрофотометрический. Детектировали циталопрам при 8 длинах волн: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм. Идентификацию проводили по времени удерживания (tR) и спектральным характеристикам ($R=S_\lambda/S_{210}$, где S – площадь хроматографического пика при соответствующей длине волны). Значения t_R и R для циталопрама в элюате совпадали с соответствующими параметрами, полученными для стандартного раствора циталопрама: t_R=19,95±0,08 мин (n=3, RSD=0,17 %, ε=0,43 %), значения R приведены в табл. 1. Предел обнаружения циталопрама в стандартных растворах составил 1 мкг/мл (критерий – S_s/S_n=3:1 для λ=240 нм).

Количественное содержание циталопрама в элюате устанавливали методом ВЭЖХ при длине волны, соответствующей максимальному светопоглощению препарата в метаноле (240 нм) [2]. При длине волны 240 нм отсутствует вклад в поглощение элюата примесей, которые детектировались при 210 нм. Используя стандартные растворы циталопрама в метаноле, установили градуировочную зависимость площади хроматографического пика (Y) от концентрации (X), которая описывалась уравнением: $Y=2{,}96 \cdot 10^{-3}X+7{,}9 \cdot 10^{-4}$ (r=0,999; $S^2=4{,}4 \cdot 10^{-7}$). Кроме того, были оценены некоторые валидационные характеристики методики: линейность наблюдали в пределах от 2,24 до 100 мкг/мл, LOQ=2,24 мкг/мл (критерий – «10σ»). Правильность и точность методики соответственно составили (n=5): область низких концентраций – 101,7%, RSD=1,8%; средних – 100,4%, RSD=0,6%; высоких – 100,3%, RSD=0,8%. Результаты изолирования циталопрама приведены в табл. 2. Разработанная методика позволяет выделить из биологического материала 60,0±6,9% антидепрессанта, что превышает разрешающую способность общих методов изолирования.

Таблица 1

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ОТНОШЕНИЯ ($R=S_\lambda/S_{210}$) ДЛЯ ЦИТАЛОПРАМА

λ, нм	220	230	240	250	260	280	300
$R=S\lambda/S_{210}$	0,443	0,521	0,644	0,284	0,084	0,063	0,0004
$\Delta\bar{X}$ (P=95%, υ=2)	0,006	0,007	0,009	0,009	0,001	0,007	0,0002
ε,%	1,46	1,40	1,40	3,03	1,54	11,61	53,79

Таблица 2

РЕЗУЛЬТАТЫ ВЭЖХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИТАЛОПРАМА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ПЕЧЕНИ

Добавлено циталопрама к 5 г печени, мкг	Выделено циталопрама, $\bar{X}$, %	Метрологические характеристики			
		S	$S_{\bar{x}}$	$\Delta\bar{X}$ (P=0,95%, υ=4)	ε, %
500	60,0	3,3	1,5	4,2	6,9

Вывод

Разработан эффективный метод выделения циталопрама из биологического материала, учитывающий липофильность исследуемого препарата. Разрешающая способность метода составила 60,0±6,9%.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Баюрка С.В. Ізолювання циталопраму з біологічного матеріалу підкисленою водою та підкисленим етанолом. Вісник фармації. 2011, 3 (67): 46–49.

(Baiurka S.V. Isolation of citalopram from biological material by acidified water and acidified ethanol. Visnik pharmacii, 2011; 3 (67): 46 – 49) (in Russian)

2. Clark's analysis of Drugs and Poisons: 3th ed. (электронный ресурс). Главн. ред. Laurent Y. Galichet. Электрон. текстовые, граф. дан. London: Pharmaceutical Press, 2005. 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). Загл. с экрана.

3. Clarke's Analytical Forensic Toxicology. S. Jickells, A. Negrusz. London: Pharmaceutical Press, 2008: 648.

4. Randall C. Baselt. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man: 9th ed. Seal Beach, California: Biomedical Publications, 2011: 1900.

Поступила 30 декабря 2013 г.

CHEMOTOXICOLOGICAL ANALYSIS OF CITALOPRAM IN BIOLOGICAL MATERIAL

S.V. Bayurka, PhD; **S.A. Karpushina**, PhD; **M.N. Ivashura**, PhD
National Pharmaceutical University; 53 Pushkinskaya St., Kharkov 61002, Ukraine

SUMMARY

Citalopram is one of the most-used selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants and repeatedly a cause of fatal poisoning. An effective method was developed to isolate citalopram from a biological material, which made allowance for the lipophilicity of the test drug. The method was based on the elution of citalopram from homogenized and dehydrated tissue through its grinding with anhydrous sodium sulfate, followed by the extraction and purification of eluates, by using a hexane-acetonitrile solvent system. The resolving power of the method was 60.0±4.2%. The citalopram isolated from the biological material was identified using color reactions, thin-layer chromatography, ultraviolet (UV) spectroscopy, and high performance liquid chromatography (HPLC) with multiwave UV detection. The content of citalopram in the eluates was estimated by HPLC at 240 nm. By using the standard solutions of citalopram in methanol, the investigators established the calibration relationship of the area of the chromatographic peak (Y) to the concentration (X), which is described by the following equation: $Y=2.96 \bullet 10^{-3}X+7.9 \bullet 10^{-4}$ ($r=0.999$; $S^2=4.4 \bullet 10^{-7}$). In addition, they assessed some validation characteristics of the procedure: its linearity range was 2.24 to 100 μg/ml; LOQ = 2.24 μg/ml (criterion 10 σ). The correctness and accuracy of the procedure were (n = 5): the range of low, moderate, and high concentrations was 101.7%; (RSD = 1.8%), 100.4% (RSD = 0.6%), and 100.3% (RSD = 0.8%), respectively.

Key words: citalopram, biological material, color reactions, thin-layer chromatography, ultraviolet spectroscopy, and high performance liquid chromatography with multiwave ultraviolet detection.

© Коллектив авторов, 2014
УДК 615.275.4.07

СТАНДАРТИЗАЦИЯ НОВОГО СОСТАВА ТИМОГАРА

Б.М. Холназаров[1], канд. фарм. наук, **Г.М. Бобиев**[2], докт. биол. наук, профессор,
Н.Д. Бунятян[3], докт. фарм. наук, **А.Н. Шахматов**[4], канд. хим. наук
[1]Таджикский национальный университет, 734025, Республика Таджикистан, Душанбе, пр. Рудаки, 17
[2]Таджикский государственный педагогический университет им. С. Айни, 734003, Республика Таджикистан, Душанбе, пр. Рудаки, 121
[3]Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8
[4]ООО «Занд», 734005, Республика Таджикистан, Душанбе, ул. А. Каххарова, 111

E-mail: bobievgm@rambler.ru

Разработаны методики количественного определения новокаина гидрохлорида и дипептида изолейцил-триптофан при их совместном присутствии в растворе спектрофотометрическим методом. Определены параметры и методы стандартизации нового состава иммуномодулирующего препарата «Тимогар» (тимогарнов) по следующим показателям: описание, подлинность, прозрачность раствора, цветность раствора, pH раствора, механические включения, количественное содержание новокаина гидрохлорида и дипептида изолейцил-триптофан, стерильность, пирогенность, токсичность.

Ключевые слова: *новокаин, дипептид, изолейцил-триптофан, спектрофотометрия, количественное определение.*

Значение иммуномодулирующих препаратов в составе комплексной терапии различных заболеваний постоянно возрастает. Активно разрабатываются иммуномодулирующие препараты пептидной природы.Так, для нового инъекционного препарата «Тимодепрессин» были предложены лекарственные формы спрей и суппозитории [1, 2, 3].

В Таджикистане был разработан новый иммуномодулирующий препарат «Тимогар» [4], представляющий собой 0,01% водный раствор дипептида изолейцил-триптофан. Тимогар зарекомендовал себя как высокоэффективный иммуномодулирующий