

РОЗРОБЛЕННЯ МЕТОДІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЕСЦИТАЛОПРАМУ, ПРИДАТНИХ ДЛЯ ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНОГО АНАЛІЗУ

Ключові слова: есциталопрам, тонкошарова хроматографія, кольорові реакції, УФ-спектрофотометрія, екстракційна спектрофотометрія

Отруєння антидепресантами посідають одне з перших місць у світі серед отруєнь психотропними препаратами [7]. Це зумовлено як значною поширеністю депресивних та психотичних станів (так у Сполучених Штатах Америки на лікування депресій витрачається близько 44 мільярдів доларів щорічно [10]), так і характером контингенту осіб, які вживають вказані засоби (хворі на шизофренію та наркоманію [9]). Основною причиною гострих та летальних отруєнь є спроби суїциду на фоні прийому антидепресантів [8], передозування, сумісний прийом з іншими психотропними засобами та алкоголем [9].

Особливу увагу в токсикологічному відношенні приділяють антидепресантам нової генерації з групи селективних інгібіторів зворотнього захвату серотоніну [7, 8], до яких відноситься S-енантіомер відомого антидепресанта циталопрама – есциталопрам ((1-[3-(диметиламіно)пропіл]-1-(4-фторфеніл)-1,3-дигідро-5-ізобензофуранкарбонітрилу оксалат). За даними клінічних досліджень, він має більш стабільний терапевтичний ефект, ніж циталопрам та, поряд з останнім, знайшов широке застосування в сучасній медичній практиці для лікування депресій різноманітної етіології [6].

Безумовно, есциталопрам викликає певний інтерес у хіміко-токсикологічному відношенні і розроблення методів його аналізу, придатних для хіміко-токсикологічних досліджень, є актуальним завданням.

Вже опрацьовано методи аналізу есциталопраму методом рідинної хроматографії в плазмі крові [5] та сполученням рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією у волоссі [4]. Вищеперелічені методики є високочутливими та специфічними, але їх використання вимагає ретельної пробопідготовки та спеціального вартісного обладнання, що може обмежувати їх використання.

В літературі відсутні відомості про умови виявлення есциталопраму за допомогою методу тонкошарової хроматографії, УФ-спектроскопії.

Метою нашого дослідження було встановлення умов виявлення, ідентифікації та кількісного визначення есциталопраму за допомогою доступних та широко впроваджених в практику хіміко-токсикологічного аналізу методів [2, 3]: тонкошарової хроматографії, кольорових реакцій, УФ-спектрофотометрії та екстракційної спектрофотометрії у видимій області.

Матеріали та методи дослідження

Хроматографічне дослідження здійснювали з використанням пластинок для високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) виробництва Естонії (сорбент КСКГ, фракція – 5–20 мкм, шаром завтовшки – 130±25 мкм, розмір пластинок 20x20 см), Sorbfil (силікагель СТХ-1 ВЕ, тип підложки – ПЕТФ, зв'язуюча речовина – си-

ліказоль, фракція – 8–12 мкм, шаром завтовшки – 100 мкм, розмір пластинок 10x10 см), Merck виробництва Німеччини (силікагель GF₂₅₄, розмір пластинок 10x20 см), Silufol UV-254 (силікагель, підложка – фольга, зв'язуюча речовина – крохмаль, розмір пластинок 10x10 см) та рухомих фаз, наведених в табл. 1. Як проявник есциталопраму на хроматографічних пластинках використовували реактив Драгендорфа у модифікації за Мун'є.

Реакції забарвлення здійснювали на шматочках хроматографічних пластинок з хлороформними розчинами есциталопраму (вміст речовини від 0,5 до 25 мкг у пробі). Як реагенти використовували наступні кольорові реактиви [3]: Ердмана, Манделіна, Лібермана, Фреде, Маркі, концентровані кислоти нітратну, сульфатну, хлоридну.

УФ-спектри абсорбції есциталопраму оксалату в метанолі знімали на спектрофотометрі СФ-46 (СРСР) у діапазоні довжин хвиль 200–350 нм у кюветі з шаром завтовшки 10 мм; як розчин порівняння використовували метанол.

Для УФ-спектрофотометричного визначення есциталопраму використовували абсорбцію за довжини хвилі 238 нм.

Методика побудови градуовального графіка для УФ-спектрофотометричного визначення есциталопраму оксалату.

Розчини есциталопраму оксалату 1–10 готували наступним чином: 0,0015 г досліджуваної речовини вносили в мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняли у метанолі та доводили об'єм розчину до мітки вказаним розчинником (стандартний розчин з концентрацією 30 мкг/мл). У мірні колби місткістю 10 мл вносили 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 та 10,0 мл стандартного розчину і доводили об'єми розчинів до мітки метанолом (розчини 1–10 відповідно, концентрація – 3,0; 6,0; 9,0; 12,0; 15,0; 18,0; 21,0; 24,0; 27,0 та 30,0 мкг/мл). Вимірювали оптичну густину і встановлювали градуовальну залежність оптичної густини від концентрації.

Методика побудови градуовального графіка для екстракційно-спектрофотометричного визначення есциталопраму оксалату.

0,0200 г есциталопраму оксалату вносили в мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняли у хлороформі та доводили об'єм розчину до мітки вказаним розчинником (стандартний розчин з концентрацією 400 мкг/мл).

У ділильну лійку вносили 5,0 мл ацетатного буферного розчину з рН 4,6, 5,0 мл 0,05% розчину метилового оранжевого та по 0,05; 0,1; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,45; 0,50; 0,55 мл стандартного розчину есциталопраму оксалату відповідно. В усіх випадках об'єм хлороформних розчинів доводили до 1 мл. До отриманої суміші додавали 15 мл хлороформу. Суміш у ділильній лійці струшували протягом 10 хв за допомогою механічного струшувача і залишали на 10 хв для розділення шарів. Збирали 14 мл хлороформного шару, відкидаючи його першу порцію (близько 1 мл), і додавали до нього 2 мл 1% розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі. Одержану суміш ретельно перемішували та визначали оптичну густину на спектрофотометрі СФ-46 за $\lambda_{\max} = 540$ нм, використовуючи кювету з шаром рідини завтовшки 10 мм. Як розчин порівняння застосовували хлороформ. Величину рН буферного розчину контролювали потенціометрично. Вимірювали оптичну густину і встановлювали градуовальну залежність оптичної густини від концентрації.

Результати дослідження та обговорення

На підставі експериментальних досліджень встановлені значення R_f есциталопраму у різних рухомих фазах та тонких шарах сорбенту, які наведені в табл. 1.

Значення R_f есциталопраму у різних рухомих фазах та тонких шарах

| № з/п | Рухомі фази | Значення R_f есциталопраму | | | |
|-------|---|------------------------------|---------|------|---------|
| | | ВЕТШХ | Сорбфіл | Мерк | Силуфол |
| 1 | Метанол–25% розчин амонію гідроксиду (100:1,5) | 0,52 | 0,52 | 0,30 | 0,25 |
| 2 | Хлороформ–метанол (90:10) | 0,28 | 0,27 | 0,12 | 0,06 |
| 3 | Етилацетат–метанол–25% розчин амонію гідроксиду (85:10:5) | 0,95 | 0,87 | 0,53 | 0,70 |
| 4 | Метанол– <i>n</i> -бутанол (60:40) | 0,08 | 0,17 | 0,13 | 0,05 |
| 5 | Метанол | 0,15 | 0,21 | 0,15 | 0,12 |
| 6 | Етилацетат | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 7 | Циклогексан–толуен–діетиламін (75:15:10) | 0,50 | 0,57 | 0,57 | 0,45 |
| 8 | Ацетон | 0,13 | 0,11 | 0,16 | 0,03 |
| 9 | Хлороформ–ацетон (80:20) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 10 | Хлороформ– <i>n</i> -бутанол–25% розчин амонію гідроксиду (70:40:5) | 0,96 | 0,94 | 0,97 | 0,97 |
| 11 | Гексан– <i>i</i> -пропанол–25% розчин амонію гідроксиду (24:6:0,3) | 0,55 | 0,61 | 0,67 | 0,38 |
| 12 | Толуен–ацетон–етанол–25% розчин амонію гідроксиду (45:45:7,5:2,5) | 0,60 | 0,55 | 0,57 | 0,47 |
| 13 | Хлороформ–діоксан–ацетон–25% розчин амонію гідроксиду (47,5:45:5:2,5) | 0,78 | 0,83 | 0,76 | 0,68 |
| 14 | Хлороформ–ацетон–25% розчин амонію гідроксиду (12:24:1) | 0,87 | 0,93 | 0,63 | 0,77 |
| 15 | <i>n</i> -Бутанол–кислота ацетатна–вода (4:0,5:1) | 0,02 | 0,05 | 0,03 | 0,02 |
| 16 | Етилацетат–ацетон–25% розчин амонію гідроксиду (50:45:5) | 0,93 | 0,96 | 0,77 | 0,67 |
| 17 | Бензен–метанол–діетиламін (90:10:10) | 0,96 | 0,91 | 0,90 | 0,87 |
| 18 | Гексан–етилацетат–етанол–25% розчин амонію гідроксиду (30:10:5:1) | 0,51 | 0,65 | 0,53 | 0,55 |
| 19 | Етанол–ацетон–вода (1:1:2) | 0,16 | 0,13 | 0,18 | 0,13 |
| 20 | Гексан–толуен–діетиламін (75:15:10) | 0,55 | 0,60 | 0,55 | 0,53 |
| 21 | Хлороформ | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 22 | Етилацетат–метанол–25% розчин амонію гідроксиду (85:10:2,5) | 0,76 | 0,82 | 0,75 | 0,60 |
| 23 | Хлороформ–ацетон–25% розчин амонію гідроксиду (25:5:0,3) | 0,55 | 0,61 | 0,57 | 0,23 |
| 24 | Хлороформ–гексан–етанол (1:1:1) | 0,17 | 0,08 | 0,08 | 0,22 |

Насамперед нами була досліджена можливість виявлення есциталопраму на етапі загального ТШХ-скринінгу психотропних речовин у рухомих фазах, що рекомендовані Міжнародним комітетом з систематичного токсикологічного аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів (рухомі фази № 1–9) [3]. Використання декількох хроматографічних систем (не менше трьох) з низькою кореляцією значень R_f для досліджуваної речовини дає підставу для надійного детектування токсичних доз цієї речовини [3]. Щодо есциталопраму, комбінації систем № 1, 2, 3; 7, 8, 10 та інші відповідають вказаним вимогам. Досліджені нами інші рухомі фази (№ 10–24) також знайшли широке використання у хіміко-токсикологічному аналізі лікарських речовин основного характеру [3]. Рухомі фази, в яких значення R_f есциталопраму лежить у межах 0,3–0,7 (№ 12, 18, 20, 23), можуть бути рекомендовані для використання на підтверджуючому етапі ТШХ-скринінгу.

Під час детектування есциталопраму на хроматографічних пластинках реактивом Драгендорфа у модифікації за Мун'є спостерігали жовтогарячий колір плям препарату на жовтому фоні. Чутливість виявлення есциталопраму у цьому разі становила 1,0 мкг препарату в пробі.

Встановлено, що есциталопрам утворює забарвлення із вищезазначених кольорових реактивів лише з реактивами Фреде (коричнево-зелене, чутливість 3 мкг у пробі) та Маркі (жовтувато-коричневе, чутливість 5 мкг в пробі).

УФ-спектр абсорбції есциталопраму в метанолі характеризується наявністю шести максимумів світлопоглинання (рисунок), для яких нами були визначені питомі та молярні коефіцієнти світлопоглинання за наступних довжин хвиль (λ_{\max}): 207 ± 2 ($A_1^1 = 547,0$; $\varepsilon = 22700$), 238 ± 2 ($A_1^1 = 387,3$; $\varepsilon = 16075$), 265 ± 2 ($A_1^1 = 49,7$; $\varepsilon = 2060$), 271 ± 2 ($A_1^1 = 49,7$; $\varepsilon = 2060$), 274 ± 2 ($A_1^1 = 49,0$; $\varepsilon = 2032$) та 284 ± 2 нм ($A_1^1 = 42,2$; $\varepsilon = 1748$).

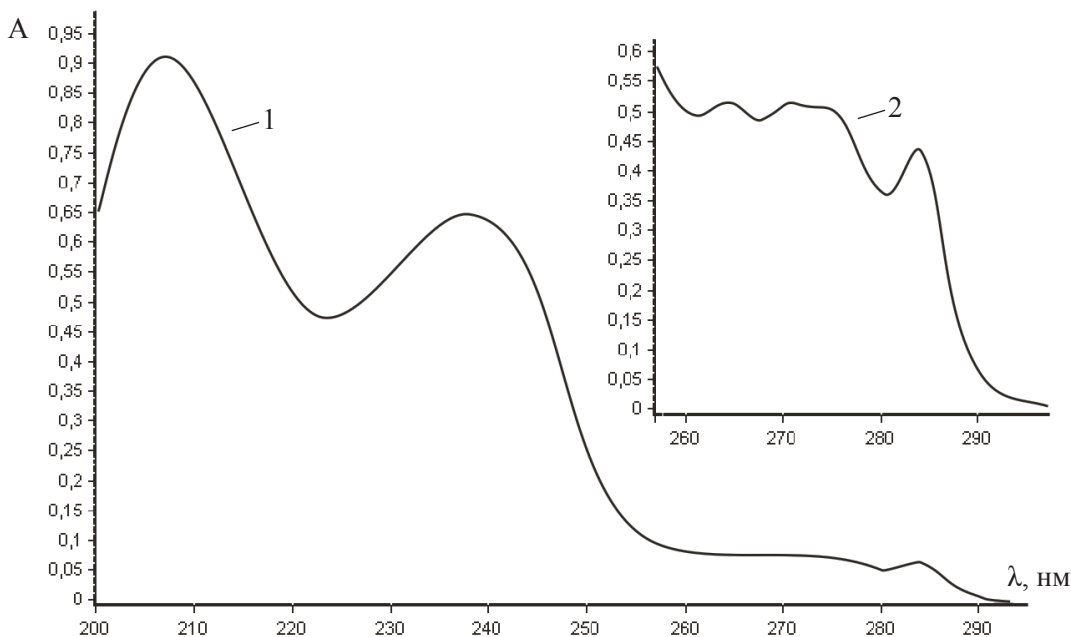


Рис. УФ-спектр світлопоглинання есциталопраму оксалату в метанолі (1 – концентрація $4 \cdot 10^{-5}$ моль/л; 2 – концентрація $2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л)

Для розроблення методики екстракційно-спектрофотометричного визначення есциталопраму попередньо нами було встановлено, що кислотний азобарвник – метиловий оранжевий (0,05% водний розчин) утворює з есциталопрамом у середовищі ацетатного буферного розчину з рН 4,6 іонний асоціат, який екстрагується хлороформом. Забарвлення розчинів іонних асоціатів виявилось малоінтенсивним, тому для підсилення чутливості методу утворені іонні асоціати руйнували додаванням до їх хлороформних розчинів 1% розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі. У цьому разі одержували розчини, що мали значно вищу оптичну густину.

Було встановлено також оптимальні умови екстракційно-спектрофотометричного визначення есциталопраму: об'єми розчину метилового оранжевого, ацетатного буферного розчину та хлороформу, кількість екстракцій іонного асоціату відповідним органічним розчинником, а також оптимальне значення рН буферного розчину, для чого нами було виготовлено ряд ацетатних буферних розчинів з рН від 3,0 до 6,0. Отримані результати було покладено в основу вищенаведеної методики екстракційно-спектрофотометричного визначення есциталопраму, згідно з якою була встанов-

лена відповідна градувальна залежність.

Для розрахунку вмісту есциталопраму в модельних розчинах УФ-спектрофотометричним та екстракційно-спектрофотометричним методами використовували рівняння (1) та (2) градувальних залежностей, відповідно, які мали вигляд:

$$A = 0,417C - 0,03 \quad (1)$$

$$A = 0,00512C, \quad (2)$$

де A – оптична густина;

C – концентрація розчину есциталопраму, відповідно, мкг/мл та мкг в пробі.

Загальний вигляд вищенаведених рівнянь відповідає лінійній регресії виду: $y = bx + a$. Значення параметрів a та b розраховували за методом найменших квадратів [1]. Метрологічні характеристики отриманих градувальних залежностей наведено в табл. 2. Після перевірки значущості параметру a у рівнянні (2) [1] було зроблено висновок про можливість переходу до рівняння виду: $y = b'x$.

Т а б л и ц я 2

Метрологічні характеристики градувальної залежності оптичної густини, отриманої спектральними методами, від вмісту есциталопраму ($y = bx + a$)

| Метод | r | b | a | S^2 | Δb | Δa |
|-----------------------------------|--------|---------|-------|-------------------|-------------------|------------|
| УФ-спектрофотометричний | 0,9998 | 0,417 | -0,03 | $2 \cdot 10^{-4}$ | $6 \cdot 10^{-4}$ | 0,01 |
| Екстракційно-спектрофотометричний | 0,9990 | 0,00512 | - | $2 \cdot 10^{-4}$ | $5 \cdot 10^{-5}$ | - |

Світлопоглинання розчинів підлягало закону Бугера–Ламберта–Бера в межах концентрацій від 3 до 30 мкг/мл (УФ-спектрофотометричний метод) та від 20 до 220 мкг есциталопраму у пробі в 15 мл кінцевого об'єму (екстракційно-спектрофотометричний метод).

Результати кількісного визначення есциталопраму у модельних розчинах УФ-спектрофотометричним та екстракційно-спектрофотометричним методами наведено в табл. 3 та 4 відповідно.

Т а б л и ц я 3

Результати УФ-спектрофотометричного визначення есциталопраму в модельних розчинах ($n=5$)

| Взято есциталопраму, мкг | Оптична густина | Знайдено есциталопраму | | Метрологічні характеристики |
|--------------------------|-----------------|------------------------|-------|---|
| | | мкг | % | |
| 3 | 0,094 | 2,9 | 95,7 | $\bar{X} = 99,5$ $S = 3,2$ $S_{\bar{x}} = 1,0$ $\Delta \bar{X} = 2,1 \quad \varepsilon = 2,1$ $\bar{X} \pm \Delta \bar{X} = 99,5 \pm 2,1$ |
| 6 | 0,204 | 5,8 | 97,2 | |
| 9 | 0,331 | 9,3 | 103,5 | |
| 12 | 0,452 | 11,7 | 98,1 | |
| 15 | 0,583 | 14,6 | 97,5 | |
| 18 | 0,711 | 17,3 | 96,2 | |
| 21 | 0,842 | 21,5 | 102,3 | |
| 24 | 0,974 | 24,9 | 103,7 | |
| 27 | 1,091 | 26,5 | 98,1 | |
| 30 | 1,222 | 30,8 | 102,8 | |

**Результати екстракційно-спектрофотометричного визначення
есциталопраму за реакцією утворення іонного асоціату з метиловим
оранжевим у модельних розчинах (n=5)**

| Взято есциталопраму, мкг | Оптична густина | Знайдено есциталопраму | | Метрологічні характе- ристики |
|--------------------------------|--------------------|------------------------|-------|---|
| | | мкг | % | |
| 20 | 0,101 | 20,5 | 102,4 | $\bar{X} = 99,5$ $S = 2,4$ $S_{\bar{x}} = 0,8$ $\Delta\bar{X} = 1,6 \quad \varepsilon = 1,6$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 99,5 \pm 1,6$ |
| 40 | 0,198 | 39,0 | 97,5 | |
| 60 | 0,313 | 59,0 | 98,3 | |
| 80 | 0,420 | 82,7 | 103,2 | |
| 100 | 0,507 | 96,1 | 96,1 | |
| 120 | 0,605 | 122,6 | 102,2 | |
| 140 | 0,711 | 136,2 | 97,3 | |
| 160 | 0,826 | 157,4 | 98,4 | |
| 180 | 0,922 | 182,2 | 101,2 | |
| 200 | 1,025 | 195,6 | 97,8 | |
| 220 | 1,113 | 221,3 | 100,6 | |

Як видно, відносна невизначеність середнього результату для УФ-спектрофотометричного методу становила $\pm 2,1\%$, для екстракційно-спектрофотометричного – $\pm 1,6\%$.

В и с н о в к и

1. Вивчено хроматографічну поведінку, кольорові реакції виявлення есциталопраму у загальних та деяких часткових рухомих фазах, загальноприйнятих у токсикологічному скринінгу речовин основного характеру з використанням чотирьох типів тонких шарів, які дають змогу використання отриманих даних в практиці хіміко-токсикологічного дослідження на есциталопрямі, та УФ-спектри поглинання есциталопраму в метанолі.

2. Розроблено методики УФ-спектрофотометричного та екстракційно-спектрофотометричного (за реакцією з метиловим оранжевим) визначення есциталопраму. Встановлено, що світлопоглинання розчинів підлягає закону Бугера–Ламберта–Бера в межах концентрацій від 3 до 30 мкг/мл (УФ-спектрофотометричний метод) та від 20 до 220 мкг есциталопраму у пробі в 15 мл кінцевого об'єму (екстракційно-спектрофотометричний метод). Відносна невизначеність середнього результату становила для запропонованих методів $\pm 2,1\%$ та $\pm 1,6\%$ відповідно.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Болотов В. В., Свєтнікова О. М., Колісник С. В. Аналітична хімія: Навч. посіб. для фармац. вузів та ф-тів III–IV рівня акредитації та ін. – Харків: Вид-во НФаУ «Оригінал», 2004. – 480 с.
2. Вергейчик Т. Х. Токсикологическая химия. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 400 с.
3. Jickells S., Negrusz A. Clarke's Analytical Forensic Toxicology. – London: Pharmaceutical Press, 2008. – 648 p.
4. Frison G., Favretto D., Vogliardi S. et al. Quantification of citalopram or escitalopram and their demethylated metabolites in neonatal hair samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // Ther. Drug Monit. – 2008. – V. 30, N 4. – P. 467–473.
5. Haupt D. Determination of citalopram enantiomers in human plasma by liquid chromatographic separation on a chiral-AGP column. // J. Chrom. B. – 1996. – V. 685. – P. 299–305.

6. Kennedy S. H., Andersen H. F., Thase M. E. Escitalopram in the treatment of major depressive disorder: A meta-analysis // *Curr. Med. Res. Opin.* – 2009. – V. 25, N 1. – P. 161–175.

7. McKenzie M. S., McFarland B. H. Trends in antidepressant overdoses. // *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* – 2007. – V. 16, N 5. – P. 513–523.

8. Rahme E., Dasgupta K., Turecki G. et al. Risks of suicide and poisoning among elderly patients prescribed selective serotonin reuptake inhibitors: A retrospective cohort study // *J. Clin Psychiatry.* – 2008. – V. 69, N 3. – P. 349–357.

9. Sankaranarayanan J., Puumala S. E. Epidemiology and characteristics of emergency department visits by US adults with psychiatric disorder and antipsychotic 2000 to 2004 // *Curr. Med. Res. Opin.* – 2007. – V. 23, N 6. – P. 1375–1385.

10. Sclar D. A. Epidemiology of depression and the prescribing of antidepressant pharmacotherapy // *ASHP Midyear Clinical Meeting.* – 2000. – V. 35. – P. 81.

Надійшла до редакції 20.09.2012.

C. B. Байурка, В. В. Болотов, С. А. Карпушина, М. Н. Ивашюра

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭСЦИТАЛОПРАМА, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ ХИМИКО-
ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Ключевые слова: эсциталопрам, тонкослойная хроматография, цветные реакции, УФ-спектрофотометрия, экстракционная спектрофотометрия

Р Е З Ю М Е

Изучены условия идентификации эсциталопрама с помощью тонкослойной хроматографии, цветных реакций, УФ-спектроскопии. Разработаны методики УФ-спектрофотометрического и экстракционно-спектрофотометрического (по реакции с метиловым оранжевым) определения эсциталопрама. Относительная неопределенность среднего результата для предложенных методов составляла $\pm 2,1\%$ и $\pm 1,6\%$ соответственно.

S. V. Baiurka, V. V. Bolotov, S. A. Karpushina, M. N. Ivashura

DEVELOPMENT OF IDENTIFICATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION METHODS
OF ESCITALOPRAM SUITABLE
FOR THE CHEMICAL AND TOXICOLOGICAL ANALYSIS

Key words: escitalopram, Thin Layer Chromatography, colour reactions, UV-spectrophotometry, extraction spectrophotometry

S U M M A R Y

The conditions of escitalopram identification by means of the Thin Layer Chromatography, colour reactions, UV-spectroscopy have been studied. The methods of UV-spectrophotometry and extraction spectrophotometry (by the reaction with methyl orange) of escitalopram quantitative determination have been developed. The relative error of the proposed methods was $\pm 2.1\%$ and $\pm 1.6\%$ respectively.