УДК 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

РОЗРОБКА УМОВ АНАЛІТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ОТРУЄНЬ ПАРОКСЕТИНОМ

С.В.Баюрка, С.А.Карпушина, В.І.Степаненко, В.П.Мороз, І.А.Сокуренко*

Національний фармацевтичний університет
Інститут підвищення кваліфікації спеціалістів фармації
Національного фармацевтичного університету*

Ключові слова: пароксетин; біологічний матеріал; загальні методи ізолювання; тонкошарова хроматографія; кольорові реакції; УФ-спектрофотометрія

DEVELOPMENT OF THE ANALYTICAL DIAGNOSTICS CONDITIONS OF PAROXETINE POISONINGS

S.V.Bayurka, S.A.Karpushina, V.I.Stepanenko, V.P.Moroz, I.A.Sokurenko*

National University of Pharmacy, Institute for Continuing Education of Pharmacy Professionals at the National University of Pharmacy*

Key words: paroxetine; biological material; general isolation methods; Thin Layer Chromatography; colour reactions; UV-spectrophotometry

Resolution of the generally accepted in forensic and toxicological analysis isolation methods of drugs has been studied with relation to paroxetine according to O.O. Vasilyeva, Stas-Otto, V.F. Kramarenko; they allowed to isolate 20.7 ± 3.1%, 8.2 ± 0.9%, 11.8 ± 1.1% of the antidepressant under research, respectively. The possibility of using Thin Layer Chromatography, colour reactions, UV-spectroscopy to detect paroxetine isolated from the biological material after the previous additional purification of the extracts from concomitant admixtures with the help of back extraction and TLC has been shown. The quantitative content of the drug in the extracts was determined by the UV-spectrophotometric method by the equation of the absorbance dependence on the concentration: A = 0.0094C – 0.02 (linearity was within the range of concentrations of 10–110 μg/mL; r = 0.999; $S^2 = 1.4 \cdot 10^{-4}$; LOQ=10 μg/mL (RSD=7.4%)). The results obtained can be used in forensic and toxicological investigations of the biological material for paroxetine.

Пароксетин ((3S-транс)-3-[(1,3-бензодіоксол-5-ілокси)метил]-4-(4-фторофеніл)-піперидину гідрохлорид гемігідрат) – антидепресант з групи селективних інгібіторів зворотнього нейронального захвату серотоніну (СІЗНЗС). Широке застосування пароксетину в сучасній медичній практиці [6, 7] зумовлено його найвищим рівнем терапевтичної активності серед лікарських засобів вказаної фармакологічної групи [16]. Але для пароксетину відмічено ряд побічних ефектів: гостра гепатотоксичність [15], звикання, агресія та розвиток суїцидальної поведінки [10, 20]. Зафіксовані випадки гострих та смертельних отруєнь зазначеним антидепресантом [18, 21]. Тому розробка методів хіміко-токсикологічного аналізу пароксетину є актуальною задачею. Насамперед, практичне значення має встановлення ефективності використання загальноприйнятих у судово-токсикологічному аналізі методів ізолювання лікарських речовин з біологічного матеріалу (за Васильєвою О.О., Стасом-Отто, Крамаренком В.П.), з яких звичайно починають загальне дослідження [4, 5, 8].

Опрацьовані методики аналізу пароксетину в крові та плазмі за допомогою газорідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням (ГРХ-МС) [1, 11, 13, 16], високоефективної рідинної хроматографії з УФ- [1] та флюоресцентним детектуванням [11, 14], рідинної хроматографії (РХ) з МС-детектуванням [17, 22], а також сполучення РХ з тандемною мас-спектрометрією (РХ-МС-МС) [9, 19].

Запропоновані методики виділення пароксетину з біологічного матеріалу за допомогою підкисленої води та підкисленого етанолу [1], але вони містять ряд модифікацій відносно загальноприйнятих методів ізолювання.

Таким чином, метою наших досліджень було встановлення розрізняльної спроможності відносно пароксетину загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання з подальшим аналізом отриманих екстрактів за допомогою попередньо розроблених нами методик [2] з використанням тонкошарової хроматографії (ТШХ), кольорових реакцій та УФ-спектрофотометрії – методів, що широко застосовуються у сучасному судово-токсикологічному аналізі [4, 11, 12].

Матеріали та методи

Модельну суміш подрібненої печінки (20 г) та 2 мл водного розчину пароксетину, що містила 2000 мкг препарату, залиша-

С.В.Баюрка – канд. фармац. наук, доцент кафедри токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

І.А.Сокуренко – канд. фармац. наук, доцент кафедри промислової фармації та економіки Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

ли на 24 години. Паралельно ставили «холості» досліди.

Виділення пароксетину з печінки водою, підкисленою кислотою оксалатною, проводили за методом Васильєвої О.О; етанолом, підкисленим кислотою оксалатною – за методом Стаса-Отто; водою, підкисленою кислотою сульфатною – за методом Крамаренка В.П. [4, 5]. При виконанні досліджень наважки біологічного об'єкта зменшували в п'ять разів, а об'єми органічних розчинників – вдвічі.

Отримані таким чином екстракти з біологічного матеріалу містили значну кількість супутніх домішок, які видаляли за допомогою додаткової екстракційної очистки, як описано нами при встановленні ефективності ізолювання пароксетину за допомогою хлороформу [3].

Виявлення пароксетину в екстрактах методом ТШХ проводили з використанням скляних хроматографічних пластинок для високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) виробництва Естонії (сорбент КСКГ, фракція – 5÷20 мкм, товщина шару – 130±25 мкм, розмір пластинок 20х20 см). Від 10 до 30 мл етилацетатної 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 метанольний розчин «свідка» пароксетину (5 мкг у пробі). У третю точку наносили 10 мл випареної витяжки, одержаної у «холостому» досліді. Хроматограми розвивали послідовно з використанням двох систем рухомих розчинників: хлороформ (при цьому плями препарату залишались на старті, а домішки переважно мігрували до лінії фінішу) і хлороформ – діоксан – ацетон – амонію гідроксид 25% розчин (47,5:45:5:2,5). Після цього пластинки висушували на повітрі і проявляли за допомогою реактиву Драгендорфа у модифікації Муньє (жовтогарячий колір плям пароксетину на жовтому фоні; чутливість виявлення пароксетину складала 0,5-1,0 мкг препарату у пробі). Плями пароксетину, виділеного з печінки, та «свідка» пароксетину за величинами Rf практично співпадали та складали у системі рухомих розчинників хлороформ – діоксан – ацетон – амонію гідроксид 25% розчин (47,5:45:5:2,5) 0,50 ± 0,02. Витяжки з «холостих» дослідів не давали плям із вказаними значеннями Rf.

При виявленні пароксетину у витяжках за допомогою кольорових реакцій використовували кислоти: сульфатну концентровану (спостерігали темно-зелене забарвлення, чутливість – 6,0 мкг препарату в пробі) та нітратну концентровану (спостерігали коричневе забарвлення, що швидко зникає, чутливість – 3,0 мкг препарату в пробі), а також реактиви Лібермана (рожево-фіолетове забарвлення, що переходить у коричневе, чутливість – 1,0 мкг у пробі), Манделіна (рожево-фіолетове забарвлення, що переходить у синє, чутливість – 1,0 мкг препарату в пробі), Фреде (рожево-фіолетове забарвлення, що переходить у зелене, чутливість – 0,5 мкг у пробі), Маркі (жовте забарвлення, чутливість – 1,0 мкг у пробі) та Ердмана (рожево-фіолетове забарвлення, що переходить у буре, а потім у жовте, чутливість – 3,0 мкг у пробі). Паралельно проводили контрольні досліди зі стандартним розчином пароксетину в метанолі (10 мкг/мл) та витяжкою з «холостого» досліду.

Підтвердження присутності пароксетину в екстрактах проводили також УФ-спектроскопічним методом. Для цього елюювали пароксетин з непроявленої смуги хроматограми на рівні, що відповідав місцю знаходження плями «свідка» пароксетину, метанолом (ступінь елюювання при цьому складав 99,4%). Метанольний елюат випаровували, а сухий залишок розчиняли в 4 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної. УФ-спектр одержаного розчину був аналогічним спектру розчину стандарту пароксетину в кислоті хлоридній та мав смуги поглинання при 233 ± 2; 265 ± 2; 272 ± 2 та 293 ± 2 нм.

Для кількісного визначення пароксетину у витяжках УФ-спектрофотометричним методом використовували рівняння залежності оптичної густини від концентрації: A = 0,0094C – 0,02 (межі виконання лінійної залежності: 10-110 мкг/мл; r = 0,999; $S^2 = 1,4 \cdot 10^{-4}$; LOQ=10 мкг/мл (RSD=7,4%)). Як розчин порівняння при вимірюванні оптичної густини елюатів використовували розчин, отриманий у «холостому» досліді.

Результати та їх обговорення

При ізолюванні пароксетину з біологічного матеріалу було встановлено, що після використання загальних методів отримані біологічні екстракти вміщували значну кількість домішок, які заважали подальшому виявленню та кількісному визначенню досліджуваної лікарської речовини. Так, результати вимірювань оптичної густини для екстрактів з «холостих» дослідів, отриманих за методами Васильєвої О.О., Стаса-Отто, Крамаренка В.П., становили 0,10-0,15; 0,09-0,11; 0,18-0,33 відповідно; після додаткової екстракційної очистки витяжок значення оптичної густини дорівнювали, відповідно, 0,06-0,09; 0,05-0,07; 0,17-0,21. Отримані таким чином очищені екстракти використовували для виявлення в них пароксетину за методами ТШХ та кольорових реакцій. Ідентифікацію та кількісне визначення препарату УФ-спектрофотометричним методом проводили тільки після додаткової очистки екстрактів методом ТШХ, аналізуючи елюати з хро-

Таблиця

Результати УФ-спектрофотометричного визначення пароксетину, виділеного з печінки за методами Васильєвої О.О., Стаса-Отто, Крамаренка В.П. (середнє з п'яти визначень)

Метод ізолювання	Додано пароксетину до 20 г печінки, мкг	Виділено пароксетину		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
Настоювання з водою, підкисленою кислотою оксалатною (метод Васильєвої О.О.)	2000	394	19,7	$\overline{X} = 20,7$ $S = 2,5$ $S_{\overline{X}} = 1,1$ $\Delta\overline{X} = 3,1$
		452	22,6	
		344	17,2	
		470	23,5	
		410	20,0	
Настоювання з етанолом, підкисленим кислотою оксалатною (метод Стаса-Отто)	2000	174	8,7	$\overline{X} = 8,2$ $S = 0,7$ $S_{\overline{X}} = 0,3$ $\Delta\overline{X} = 0,9$
		146	7,3	
		150	7,5	
		180	9,0	
		168	8,4	
Настоювання з водою, підкисленою кислотою сульфатною (метод Крамаренка В.П.)	2000	224	11,2	$\overline{X} = 11,8$ $S = 0,9$ $S_{\overline{X}} = 0,4$ $\Delta\overline{X} = 1,1$ $\varepsilon = 9,4$
		236	11,8	
		216	10,8	
		262	13,1	
		244	12,2	

матограм, оптична густина яких знаходилась у межах 0,01-0,02.

Результати кількісного визначення пароксетину, виділеного з печінки за методами Васильєвої О.О., Стаса-Отто, Крамаренка В.П., наведені в таблиці. Як видно, за допомогою запропонованих методик з печінки можна виділити 20,7 ± 3,1%, 8,2 ± 0,9%, 11,8 ± 1,1% пароксетину, відповідно.

ВИСНОВКИ

1. Вивчено розрізняльну спроможність відносно пароксетину загальноприйнятих у судово-токсикологічному аналізі методів ізолювання лікарських речовин за Васильєвою О.О., Стасом-Отто, Крамаренком В.П., які дозволили виділити, відповідно, 20,7 ± 3,1%, 8,2 ± 0,9%, 11,8 ± ± 1,1% пароксетину.

2. Показана можливість використання кольорових реакцій, ТШХ, УФ-спектрофотометрії для виявлення та кількісного визначення пароксетину в екстрактах з біологічного матеріалу.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Аполлонская Я.Е. Химико-токсикологическое исследование пароксетина: Автореф. дис. ... канд. фармац. наук. – Пятигорск, 2012. – 24 с.*
2. *Баюрка С.В., Карпушина С.А., Семенов А.М. // Укр. біофармац. журн. – 2012. – №1-2 (18-19). – С. 104-108.*
3. *Баюрка С.В., Рибалка Л.І. // Укр. біофармац. журн. – 2012. – №5-6 (22-23). – С. 118-122.*
4. *Вергейчик Т.Х. Токсикологическая химия. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 400 с.*
5. *Крамаренко В.П. Токсикологічна хімія. – К.: Вища шк., 1995. – 423 с.*
6. *Крылов В.И. // ФАРМиндекс-Практик. – 2003. – Вып. 5 – С. 22-32.*
7. *Машковский М.Д. Лекарственные средства: 15-е изд. – М.: ООО «Изд-во Новая Волна», 2006. – С. 106.*
8. *Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов: Учеб. пособ. для вузов / Под ред. Н.И.Калетиной. – М.: ГОЭТАР-Медиа, 2008. – 1016 с.*
9. *Castro A., Fernandez M.d.M.R., Laloup M. et al. // J. Chromatogr. A. – 2007. – Vol. 1160, №1. – P. 3-12.*
10. *Cotton S. // Educ. Chem. – 2003. – Vol. 40, №5. – P. 117.*
11. *Clark's analysis of Drugs and Poisons: 3-rd ed. [Електронний ресурс] / Laurent Y. Galichet. – 80 Min / 700 MB. – Pharmaceutical Press, 2005. – 1 електрон. опт. диск (CD-ROM); 12 см. – Систем. вимоги: Pentium; 128 Mb RAM; CD-ROM Windows XP / Vista. – Назва з титул. екрану.*
12. *Jickells S., Negrusz A. Clarke's Analytical Forensic Toxicology. – London: Pharmaceutical Press, 2008. – 648 p.*
13. *Leis H.J., Windischhofer W., Fauler G. // J. Chrom. B. – 2002. – Vol. 779. – P. 353-357.*
14. *Mandrioli R., Mercolini L., Ferranti A. et al. // Anal. chim. acta. – 2007. – Vol. 591. – P. 141-147.*
15. *Odeh M., Misselevech I., Boss J.H. et al. // Am. J. Gastroenterol. – 2001. – Vol. 96. – P. 2494-2496.*
16. *Segura M., Roura L., de la Torre R. et al. // Bioorg. Chem. – 2003. – Vol. 31. – P. 248-258.*
17. *Shinozuka T., Terada M., Tanaka E. // Forens. Sci. Int. – 2006. – Vol. 162. – P. 108-112.*

18. Singer P.P., Jones G.R. // J. Anal. Tox. – 1997. – Vol. 21. – P. 518-520.
19. Thieme D., Sachs H. // Anal. Chim. Acta. – 2003. – Vol. 492. – P. 171-186.
20. UK law firm sets up Seroxat Users Group // Scrip World Pharm. News. – 2002. – №2763. – P. 4.
21. Vermeulen T. // J. Anal. Tox. – 1998. – Vol. 22. – P. 541-544.
22. Zhu Z., Neirinck L. // J. Chrom. B. – 2002. – Vol. 780. – P. 295-300.

РОЗРОБКА УМОВ АНАЛІТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ОТРУЄНЬ ПАРОКСЕТИНОМ

С.В.Баюрка, С.А.Карпушина, В.І.Степаненко, В.П.Мороз, І.А.Сокуренко*

Національний фармацевтичний університет, Інститут підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету*

Ключові слова: пароксетин; біологічний матеріал; загальні методи ізолювання; тонкошарова хроматографія; кольорові реакції; УФ-спектрофотометрія

Вивчено розрізняльну спроможність відносно пароксетину загальноприйнятих у судово-токсикологічному аналізі методів ізолювання лікарських речовин за О.О.Васильєвою, Стасом-Отто, В.П.Крамаренком, які дозволили виділити, відповідно, 20,7 ± 3,1%, 8,2 ± 0,9%, 11,8 ± 1,1% досліджуваного антидепресанта. Показана можливість використання методу тонкошарової хроматографії, кольорових реакцій, УФ-спектроскопії для виявлення пароксетину, виділеного з біологічного матеріалу, після попередньої додаткової очистки витяжок від супутніх домішок за допомогою методів екстракції та ТШХ. Кількісний вміст препарату в екстрактах встановлювали УФ-спектрофотометричним методом за рівнянням залежності оптичної густини від концентрації: A = 0,0094C – 0,02 (межі виконання лінійної залежності у межах концентрацій 10-110 мкг/мл; r = 0,999; $S^2 = 1,4 \cdot 10^{-4}$; LOQ=10 мкг/мл (RSD=7,4%)). Отримані результати можуть бути використані для судово-токсикологічних досліджень біологічного матеріалу на пароксетин.

РАЗРАБОТКА УСЛОВИЙ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ОТРАВЛЕНИЙ ПАРОКСЕТИНОМ

С.В.Баюрка, С.А.Карпушина, В.И.Степаненко, В.П.Мороз, И.А.Сокуренко*

Национальный фармацевтический университет, Институт повышения квалификации специалистов фармации Национального фармацевтического университета*

Ключевые слова: пароксетин; биологический материал; общие методы изолирования; тонкослойная хроматография; цветные реакции; УФ-спектрофотометрия

Изучена разрешающая способность относительно пароксетина общепринятых в судебно-токсикологическом анализе методов изолирования лекарственных веществ по А.А.Васильевой, Стасу-Отто, В.Ф.Крамаренко, которые позволили выделить, соответственно, 20,7 ± 3,1%, 8,2 ± 0,9%, 11,8 ± 1,1% исследуемого антидепрессанта. Показана возможность использования метода тонкослойной хроматографии, цветных реакций, УФ-спектроскопии для обнаружения пароксетина, выделенного из биологического материала, после предварительной дополнительной очистки вытяжек от сопутствующих примесей с помощью методов экстракции и ТСХ. Количественное содержание препарата в экстрактах устанавливали УФ-спектрофотометрическим методом по уравнению зависимости оптической плотности от концентрации: A = 0,0094C – 0,02 (границы выполнения линейной зависимости в пределах концентраций 10-110 мкг/мл; r = 0,999; $S^2 = 1,4 \cdot 10^{-4}$; LOQ=10 мкг/мл (RSD=7,4%)). Полученные результаты могут быть использованы для судебно-токсикологических исследований биологического материала на пароксетин.

Адреса для листування: 61168, м. Харків,
вул. Блюхера, 4. Тел. (572) 69-91-92.
E-mail: sveta.karpushina.63@mail.ru.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 24.04.2013 р.