

## ТОКСИКОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА СМЕРТЕЛЬНИХ ОТРУЄНЬ ФЛУОКСЕТИНОМ

С.В.Баюрка, С.А.Карпушина, В.С.Бондар

Національний фармацевтичний університет

*Ключові слова: антидепресанти; флуоксетин; біологічний матеріал; тонкошарова хроматографія; кольорові реакції; УФ-спектроскопія; УФ-спектрофотометрія; екстракційна фотометрія*

*Встановлено, що ізолювання флуоксетину з біологічного матеріалу нейтральним ацетоном (згідно з методом Карташова В.А.) є більш придатним для судово-токсикологічного дослідження, ніж ізолювання підкисленим ацетонітрилом (згідно з методом Сшедзінські І.). Роздільна спроможність відносно флуоксетину названих методів відповідно становила  $23,28 \pm 2,53\%$  та  $16,20 \pm 2,55\%$ . Виявлення флуоксетину, виділеного з біологічного матеріалу, проводили за допомогою тонкошарової хроматографії, кольорових реакцій, УФ-спектроскопії. Показана необхідність попередньої додаткової очистки витяжок від супутніх домішок, які були отримані за методом Карташова В.А., для чого використовували методи екстракції та ТШХ. Кількісний вміст препарату в екстрактах встановлювали екстракційно-фотометричним методом за реакцією утворення іонного асоціату з кислотним азобарвником метиловим оранжевим. Світлопоглинання забарвлених розчинів підлягало закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 10 до 120 мкг флуоксетину в 14 мл кінцевого об'єму. Відносна помилка кількісного визначення не перевищувала 2,5%.*

Флуоксетин ((±)-N-метил-3-феніл-3-(пара-трифторметил) феноксипропіламіну гідрохлорид) — новий антидепресант, що за механізмом фармакологічної дії належить до селективних інгібіторів зворотного захвату серотоніну (СІЗЗС) [3]. Широке застосування в медичній практиці лікарських речовин групи СІЗЗС, які вважаються антидепресантами “нової генерації” [13, 15], зумовлене тим, що вони є значно менш токсичними, ніж трициклічні антидепресанти (ТЦА) та інгібітори моноамінооксидази (ІМАО) [6, 8].

Однак останнім часом зареєстровано неодноразові випадки смертельних отруєнь флуоксетином [6, 7, 8, 10, 11, 12], що спостерігалось при прийомі близько 1,5 г препарату [6]. Слід зазначити, що більшість вказаних смертельних отруєнь згадується у зв'язку з прийомом СІЗЗС сумісно з іншими психотропними речовинами [7], особливо з ТЦА [8].

Тому розробка методів аналізу флуоксетину в біологічному матеріалі, в першу чергу, з використанням загальних методів ізолювання “лікарських отрут” з біологічного матеріалу [2] є актуальною задачею.

У літературі наведені дані [1] із загальних методів виділення флуоксетину з печінки водою та етанолом, підкисленими кислотою оксалатною, а також водою, підкисленою кислотою сульфатною. Але використані методики містять деякі модифікації загальноприйнятих у судово-токсикологічному аналізі методів ізолювання, що робить проблематичним використання отриманих результатів у схемі ненаправленого судово-токсикологічного аналізу “лікарських отрут”.

Останнім часом певну зацікавленість при розробці загальних схем аналізу отрут різної природи в біологічному матеріалі представляють гідроліпофільні розчин-

ники (етанол, ацетон, ацетонітрил) [4]. Вказані розчинники екстрагують відносно невеликі кількості супутніх домішок і зазвичай забезпечують досить високий вихід “лікарської отрути” з біологічного об'єкту.

Таким чином, метою наших досліджень було встановлення роздільної спроможності щодо флуоксетину таких загальних методів ізолювання лікарських речовин, як екстракція підкисленим ацетонітрилом (за методом Сшедзінські І.) [14] та нейтральним ацетоном (за методом Карташова В.А.) [5].

**Методика ізолювання флуоксетину з печінки ацетонітрилом (за методом Сшедзінські І.).** 20 г подрібненої печінки людини, яка загинула від травми, до якої попередньо додавали 2000 мкг флуоксетину, заливали 100 мл ацетонітрилу, підкисленого 1 М розчином кислоти хлоридної до рН 2 (за універсальним індикатором), і настоювали протягом 30 хв при перемішуванні. Настоювання з підкисленим ацетонітрилом проводили двічі. Витяжки проціджува-

ли через марлю, об'єднували і поділяли на дві рівні частини. До половини витяжки додавали 0,5 М розчин натрію сульфату (1:2) і проводили однократну екстракцію діетиловим ефіром (50 мл). Ефірну витяжку не досліджували, а ацетонітрильну витяжку доводили насиченим розчином натрію гідроксиду до рН 9-10 (за універсальним індикатором) і проводили екстракцію хлороформом двічі (100 та 50 мл). Хлороформну витяжку частково випаровували при кімнатній температурі, переносили до мірної колби об'ємом 50 мл та доводили до позначки зазначеним органічним розчинником.

**Ізолювання флуоксетину з печінки ацетоном (метод Карташова В.А.).** 5 г гомогенізованої тканини внутрішніх органів (печінки людини, яка загинула від травми), до якої попередньо додавали 500 мкг флуоксетину, переносили до пеніцилінового флакону об'ємом 20 мл, додавали 5 мл ацетону; суміш перемішували, закривали поліетиленовим корком та струшували на апараті для струшування рідин протягом 10 хв. Потім вміст флакону центрифугували протягом 5 хв при 2500 об/хв і надосадову рідину зливали через невеличкий ватний тампон у флакон об'ємом 50 мл. Операцію настоювання повторювали ще тричі. До об'єднаних ацетонових витяжок додавали 20 мл 0,5 М розчину кислоти хлоридної та екстрагували *n*-гексаном двічі по 10 мл кожного разу. Органічну фазу відокремлювали та відкидали. З водної фази проводили екстракцію діетиловим ефіром двічі по 10 мл кожного разу. Шар органічного розчинника відокремлювали, відкидали і у подальшому не досліджували. Кислу водну витяжку, що залишилась, підлогували 10% розчином натрію гідроксиду до рН 10, додавали 5 г натрію хлориду і екстрагували флуоксетин хлороформом двічі по 10 мл кожного разу. Хлороформні витяжки об'єднували, фільтрували через паперовий фільтр, який вміщував 0,5 г безводного натрію сульфату, переносили в мірну кол-

бу на 50 мл та доводили зазначеним розчинником до позначки.

Отримані таким чином екстракти з біологічного матеріалу містили значну кількість супутніх домішок, які потім видаляли за допомогою додаткового екстракційного очищення. Для цього хлороформні екстракти переносили до фарфорової чашки, випаровували їх на водяній бані при температурі, не вищій ніж 40°C до видалення органічного розчинника. Потім до сухого залишку у фарфоровій чашці додавали 20 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної, вміст чашки ретельно перемішували, переносили до ділильної лійки і кислий розчин двічі (по 10 мл) збовтували з діетиловим ефіром, відкидаючи фазу органічного розчинника. Після цього кислий водний залишок підлогували 20% розчином натрію гідроксиду до рН 10 і тричі екстрагували флуоксетин хлороформом по 10 мл кожного разу. Хлороформні витяжки фільтрували через фільтр з 0,5 г безводного натрію сульфату у мірну колбу об'ємом 50 мл і доводили до позначки хлороформом.

Після цього проводили ідентифікацію та кількісне визначення флуоксетину в отриманих екстрактах.

Виявлення флуоксетину в екстрактах за методом ТШХ проводили з використанням скляних хроматографічних пластинок для ВЕТШХ (силікагель КСКГ, фракція 5-20 мкм, товщина шару 130±±25 мкм, розмір 20x20 см, виробництво Естонія), Сорбфіл (силікагель ПТСХ-П-А, фракція 5-17 мкм, розмір 10x10 см), Merck (Silica gel 60 F254, розмір 10x20 см). Від 10 до 30 мл хлороформної 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 розчин "свідка" флуоксетину (10 мкг у пробі). У третю точку наносили 5 мл випареної витяжки, одержаної у "холостому" досліді. Хроматограми розвивали послідовно з використанням двох систем рухомих розчинників: хлороформ і метанол — амо-

нію гідроксид 25% розчин (100:1,5). Після цього пластинки висушували на повітрі і проявляли за допомогою реактиву Драгендорфа у модифікації за Мунье (жовтогарячий колір плям флуоксетину на жовтому фоні; чутливість виявлення флуоксетину складала 0,5 мкг препарату у пробі). Плями флуоксетину, виділеного з печінки, та флуоксетину-стандарту за величинами R<sub>f</sub> співпадали та склали у системі рухомих розчинників метанол — амонію гідроксид 25% розчин (100:1,5) 0,58±0,02 (для пластинок ВЕТШХ), 0,42±0,02 (для пластинок Сорбфіл), 0,25±±0,02 (для пластинок Merck). Витяжки з "холостих" дослідів не давали плям з вказаними значеннями R<sub>f</sub>.

Підтвердження присутності флуоксетину в екстрактах проводили також УФ-спектроскопічним методом. Для цього елюювали флуоксетин з непроявленої смуги хроматограми на рівні, що відповідав місцю знаходження плями "свідка" флуоксетину, 0,1 М розчином кислоти хлоридної: УФ-спектр одержаного розчину був аналогічним спектру розчину стандарту флуоксетину в 0,1 М розчині кислоти хлоридної та мав смуги поглинання при λ<sub>max</sub>=265±2 нм та 276±2 нм.

При виявленні флуоксетину у витяжках за допомогою кольорових реакцій використовували кислоту сульфатну концентровану (спостерігали коричневе забарвлення, чутливість 20 мкг препарату у пробі), реактиви Лібермана (коричнече забарвлення, чутливість 3 мкг флуоксетину у пробі), Манделіна (синє забарвлення, чутливість 3 мкг препарату у пробі), Фреде (синє забарвлення, чутливість 4 мкг флуоксетину у пробі). Паралельно проводили контрольні досліді зі стандартним розчином флуоксетину у хлороформі (10 мкг/мл) та витяжкою з "холостого" досліді.

Кількісне визначення флуоксетину у витяжках проводили екстракційно-фотометричним методом за реакцією утворення іонних асоціатів препарату з метиловим оранжевим та розрахову-

Таблиця

**Результати екстракційно-фотометричного визначення флуоксетину, виділеного з печінки підкисленим ацетонітрилом (метод Шведзінські І.) та нейтральним ацетоном (метод Карташова В.А.)**

Метод ізолювання	Додано флуоксетину, мкг (до <i>m</i> г печінки)	Виділено флуоксетину		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
Підкисленим ацетонітрилом (метод Шведзінські І.)	2000 ( <i>m</i> =20)	334,0	16,7	$\bar{X} = 16,20$ $S = 2,05$ $S_{\bar{X}} = 0,91$ $\Delta\bar{X} = 2,55$ $\varepsilon = 15,75$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 16,20 \pm 2,55$
		264,0	13,2	
		306,0	15,3	
		372,0	18,6	
		344,0	17,2	
Нейтральним ацетоном (метод Карташова В.А.)	500 ( <i>m</i> =5)	119,5	23,9	$\bar{X} = 23,28$ $S = 2,04$ $S_{\bar{X}} = 0,91$ $\Delta\bar{X} = 2,53$ $\varepsilon = 10,89$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 23,28 \pm 2,53$
		101,0	20,2	
		112,5	22,5	
		128,0	25,6	
		121,0	24,2	

вали вміст флуоксетину в екстрактах за допомогою градувального графіка.

Для побудови градувального графіка використовували стандартний розчин флуоксетину в хлороформі, що містив 100 мкг препарату в 1 мл. У ділительні лійки вносили по 5 мл ацетатного буферного розчину з 4,6, по 5 мл 0,05% розчину метилового оранжевого і додавали по 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,2 мл стандартного розчину флуоксетину. Додавали хлороформ до загального об'єму органічного розчинника 15 мл. Суміш у ділительних лійках збовтували протягом 5 хв за допомогою апарату для струшування рідин і залишали на 10 хв для розділення фаз. Збирали по 14 мл хлороформних витяжок, відкидаючи їх перші порції (близько 1 мл), до яких додавали по 2 мл 1% розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі.

Оптичну густину отриманих розчинів, забарвлених у червоний колір, вимірювали за допомогою фотоелектроколориметра КФК-2 (світлофільтр зелений з  $\lambda_{\text{эф}} = 540 \pm 10$  нм; кювета з товщиною шару рідини 10 мм). Як розчини порівняння використовували "холості" досліді (метиловий оранжевий не екстрагується хлороформом в інтервалі рН від 3 до 7).

Світлопоглинання забарвлених розчинів підлягало закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 10 до 120 мкг флуоксетину в 14 мл кінцевого об'єму. Відносна помилка кількісного визначення не перевищувала 2,5%.

**Результати та їх обговорення**

При ізолюванні флуоксетину з біологічного матеріалу підкисленим ацетонітрилом за методом Шведзінські І. та нейтральним ацетоном за методом Карташова В.А. було встановлено, що отримані біологічні екстракти містили деяку кількість домішок. Так, результати вимірювань показників оптичної густини, отримані екстракційно-фотометричним методом з метиловим оранжевим для екстрактів з "холостих" дослідів за наведеними вище методами ізолювання, становили, відповідно, 0,03-0,035 та 0,25-0,35. Таким чином, небажану кількість домішок, які заважали подальшому виявленню та кількісному визначенню досліджуваної "лікарської" отрути, містили лише екстракти, отримані за методом Карташова В.А.

Для видалення супутніх домішок проводили додаткове екстракційне очищення витяжок за методикою, наведеною вище. Але у

випадку, коли екстракти з біологічного матеріалу вміщували значну кількість співекстрактивних речовин, вони заважали процесу хроматографування (розтягнуті плями флуоксетину разом з співекстрактивними речовинами навіть після додаткового екстракційного очищення). У зв'язку з цим ми проводили додаткове хроматографічне очищення отриманих витяжок. Для цього хроматографічну пластинку з нанесеними екстрактами з біологічного матеріалу двічі вміщували в хроматографічну камеру з хлороформом (фронт розчинника 8 см).

Попередніми дослідями з витяжками з "холостих" проб біологічного матеріалу, а також зі стандартним розчином флуоксетину, нанесеними на хроматографічну пластинку, було встановлено, що співекстрактивні речовини при цьому мігрували до фінішу, а плями флуоксетину залишалися на лінії старту (плями співекстрактивних речовин і флуоксетину проявлялися за допомогою реактиву Драгендорфа в модифікації за Мунье). Хроматографічні пластинки з очищеними таким чином пробами флуоксетину з біологічного матеріалу далі використовували для виявлення препарату за методом ТШХ та після елювання флуоксетину з хроматографічної пластинки — за УФ-спектрами.

Додаткового екстракційного очищення було достатньо для проведення кольорових реакцій та екстракційно-фотометричного визначення флуоксетину в екстрактах, яке проводили на фоні "холостих" дослідів. Їх оптична густина після додаткового екстракційного очищення не перевищувала 0,025-0,03 в області спектра, що відповідає максимуму світлопоглинання забарвлених розчинів іонних асоціатів флуоксетину з метиловим оранжевим.

Результати кількісного визначення флуоксетину, виділеного з печінки за методами Шведзінські І. та Карташова В.А., наведені в таблиці.

Отже, за допомогою запропонованих методик з печінки можна виділити  $16,20 \pm 2,55\%$  та  $23,28 \pm$

$\pm 2,53\%$  флуоксетину, відповідно. Таким чином, нейтральний ацетон є більш ефективним екстрагентом флуоксетину з біологічного матеріалу (за методом Карташова В.А.) у порівнянні з підкисленим ацетонітрилом (за методом Шведзінські І). Загальна невисока роздільна спроможність апробованих методик ізольовання вказаними гідроліпофільними розчинниками відносно флуоксетину вірогідно пов'язана з високим ступенем (до  $94,5\%$  [9]) зв'язування

флуоксетину з білками біологічного об'єкту.

#### ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що ізольовання флуоксетину з біологічного матеріалу нейтральним ацетоном (згідно з методом Карташова В.А.) є більш придатним для судово-токсикологічного дослідження, ніж підкисленим ацетонітрилом (за методом Шведзінські І.). Роздільна спроможність відносно флуоксетину названих методів відповідно становила  $23,28 \pm 2,53\%$  та  $16,20 \pm 2,55\%$ .

2. Показана можливість використання методу тонкошарової хроматографії, кольорових реакцій, УФ-спектроскопії для виявлення флуоксетину, виділеного з біологічного матеріалу, після попередньої додаткової очистки втяжок від супутніх домішок за допомогою методів екстракції та ТШХ. Отримані результати можуть бути використані для судово-токсикологічних досліджень біологічного матеріалу при смертельних отруєннях флуоксетином.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Бондар В.С., Бур'ян Г.О. // *Вісник фармації*. — 2002. — №4 (32). — С. 15-18.
2. Крамаренко В.П. *Токсикологічна хімія*. — К.: Вища шк., 1995. — 423 с.
3. Машковский М.Д. *Лекарственные средства: 15-е изд.* — М.: ООО "Изд-во Новая Волна", 2006. — С. 104-105.
4. Удалов А.В. // *Лабораторный журн.* — 2003. — №1 (3). — С. 54-58.
5. Чернова Л.В., Карташов В.А. // *СМЭ*. — 1989. — №2. — С. 56-57.
6. Bateman N.D. *Antidepressants: Poisonous substances*. — Amsterdam: Elsevier, 2007. — P. 587-589.
7. Carson H.J. // *J. Leg. Med.* — 2007. — Vol. XXX. — P. 1-4.
8. Cheeta S., Schifano F., Oyefeso A. et al. // *Brit. J. Psychiatry*. — 2004. — №184. — P. 41-47.
9. *Clark's analysis of Drugs and Poisons*. — 3-rd Ed. — Pharmaceutical Press, 2005 (CD).
10. Gross R., Dannon P.N., Lepkifker E. et al. // *Am. J. Emerg. Med.* — 1998. — № 16. — P. 328-329.
11. Isbister G.K., Bowe S.J., Dawson A. et al. // *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* — 2004. — №42. — P. 277-285.
12. Jonsson A., Holmgren P., Ahlner J. // *Forens. Sci. Int.* — 2004. — Vol. 143. — P. 53-59.
13. Mann J.J. // *N. Engl. J. Med.* — 2005. — № 353. — P. 1819.
14. Szczydzinski I. // *Arch. Med. Sad. Krymin.* — 1978. — Vol. 28. — P. 199.
15. Yildiz A., Gonul A., Tamam L. // *Bull. Clin. Psychopharmacol.* — 2002. — №12. — P. 194.

Адреса для листування: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. Тел. (0572) 67-91-92. Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 29.09.2008 р.