

*Рекомендована д.х.н., професором В.В.Болотовим*

УДК 615.065:54.061/062:547.712.22:001.8

## РОЗРОБКА УМОВ ІЗОЛЮВАННЯ ФЛУОКСЕТИНУ З КРОВІ

С.В.Баюрка, С.А.Карпушна, В.С.Бондар

Національний фармацевтичний університет

**Розроблена методика рідинно-рідинної екстракції флуоксетину з крові хлороформом з лужного середовища, що дозволяє виділити з плазми крові  $22,80 \pm 1,83\%$ , а з осаду крові після відокремлення його від плазми ще додатково  $19,72 \pm 2,27\%$  флуоксетину. Виявлення та кількісне визначення препарату в екстрактах проводили за допомогою кольорових реакцій, тонкошарової хроматографії, УФ-спектроскопії, екстракційної фотометрії за реакцією утворення іонного асоціату з кислотним азобарвником метиловим оранжевим.**

Флуоксетин (( $\pm$ )-N-метил-3-феніл-3-(*пара*-трифторметил)феноксипропіламіну гідрохлорид) — новий антидепресант, за механізмом фармакологічної дії належить до селективних інгібіторів зворотнього захвату серотоніну [2], характеризується відносно невисокою токсичністю [3, 5, 10], що обумовило його широке застосування в медичній практиці [2, 9, 12].

Останнім часом зареєстровано неодноразові випадки гострих та смертельних отруєнь флуоксетином [3, 4, 5, 6, 7, 8, 11], токсичні концентрації препарату в крові при цьому становили від 1,3 до 6,8 мг/л [6, 11]. Головними симптомами отруєння флуоксетином є атаксія, загальмованість, розгубленість, відчуття неспокію, гіперфлексія, тремор, кома, можуть спостерігатися порушення серцевої діяльності [10]. Таким чином, клінічна картина отруєння флуоксетином нехарактерна, тому важливе значення для діагностики отруєнь мають результати лабораторно-токсикологічного дослідження біологічних рідин (крові, сечі) на вміст у них зазначеного препарatu. В літературі наведені дані [1] по виділенню флуоксетину з крові методом рідинно-рідинної екстракції хлороформом з лужного середовища, ефективність наведеної методики становила 38,5%.

Згідно з іншими літературними даними [6] флуоксетин характеризується високим ступенем зв'язування з білками біологічного об'єкту (до 94,5%). На наш погляд, підвищити ступінь вилучення флуоксетину з крові можна додатковим дослідженням осаду, що утворюється після відокремлення форменних елементів крові, що й стало предметом нашого дослідження.

### Матеріали та методи

**Методика ізоляції флуоксетину з крові.** До 10 мл донорської крові додавали водні розчини препарату, які містили від 50 до 200 мкг флуоксетину, перемішували і залишали на добу. Через добу до 10 мл модельної суміші флуоксетину з кров'ю додавали 10 мл 10% водного розчину кислоти трихлорацетатної і перемішували. Після цього суміш центрифугували на протязі 15 хв зі швидкістю 3000 об/хв. Центрифугат зливали, переносили до ділильної лійки та двічі екстрагували домішки діетиловим ефіром по 10 мл кожного разу. Фазу органічного розчинника відкидали і у подальшому не досліджували. Кислий центрифугат підлигували до pH 8-9 20 % розчином натрію гідроксиду і три рази екстрагували флуоксетин хлороформом. Одержані “лужні” хлороформні витяжки об'єднували, фільтрували через фільтр з 0,5 г безводного натрію сульфату та переносили до мірної колби об'ємом 50 мл і доводили до позначки хлороформом.

Для виявлення та кількісного визначення в отриманих екстрактах флуоксетину з мірної колби відбирали 10-25 мл хлороформних розчинів, випаровували органічний розчинник до об'єму 1-2 мл та чинили так, як зазначено нижче.

Враховуючи те, що флуоксетин мав порівняно невисокий вихід при його ізоляції з крові, ми досліджували окремо осад, який залишився після відокремлення надосадової рідини. Осад зі стакану для центрифугування зважували і переносили до порцелянової ступки, де його розтирали з потрійною кількістю безводного натрію сульфату до отримання однорідної сипкої маси, яку потім переносили до скляної колонки висотою 25 см з діаметром 1 см. Перед заповненням колонки в ній вміщували невеличкий ватний тампон для запобігання попадання розтертої маси у скляний кранік. Легким постукуванням по колонці сипку масу ущільнювали. Над колонкою закріплювали ділільну лійку, що вміщувала 50 мл хлороформу, який пропускали через колонку зі швидкістю 60-80 крапель за хвилину. Отриману хлороформну витяжку випаровували у порцеляновій чашці до суха на водяній бані при температурі не вище 40°C. Отриманий екстракт містив значну кількість

супутніх домішок з біологічною рідини, які заважали проведенню ідентифікації та кількісного визначення флуоксетину в екстрактах. Так, при проведенні кількісного визначення флуоксетину у витяжках екстракційно- фотометричним методом утворювались стійкі емульсії, що не давало можливості провести аналіз екстракту. Для видалення співекстрактивних речовин ми проводили додаткове екстракційне очищення витяжок. Для цього сухий залишок розчиняли у 20 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної і переносили до ділильної лійки, куди додавали 10 мл діетилового ефіру і суміш збовтували протягом 5 хв, а потім органічну фазу відокремлювали і відкидали. Очистку витяжки діетиловим ефіром проводили ще раз. Після цього кислу витяжку підлагувували 10% розчином натрію гідроксиду до pH 8-9 і три рази екстрагували хлороформом по 10 мл кожного разу. Хлороформні екстракти фільтрували через паперовий фільтр, який вміщував 0,5 г безводного натрію сульфату, об'єднували і переносили до мірної колби об'ємом 50 мл.

Виявлення флуоксетину в отриманих екстрактах проводили за допомогою тонкошарової хроматографії (ТШХ), УФ-спектроскопії, кольорових реакцій.

Для хроматографування використовували хроматографічні пластинки Сорбліл (силікагель ПТСХ-П-А, фракція 5-17 мкм, розмір 10×10 см). Від 5 до 15 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 з використанням системи рухомих розчинників метанол — амонію 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 0,25 мкг препарату у пробі). Плями флуоксетину, виділеного з печінки, та флуоксетину-стандарту за величинами R<sub>f</sub> співпадали та складали 0,42±0,02. Витяжки з "холостих" дослідів не давали плям з вказаними значеннями R<sub>f</sub>.

При виявленні флуоксетину у витяжках за допомогою кольорових реакцій як реагенти використовували кислоту сульфатну концентровану (коричневе забарвлення), реактиви Лібермана (коричневе забарвлення), Манделіна (синє забарвлення), Фреде (синє забарвлення). Паралельно проводили контрольні досліди зі стандартним розчином флуоксетину в хлороформі (10 мкг/мл) та витяжкою з "холостого" досліду.

УФ-спектроскопічне дослідження флуоксетину, виділеного з крові, проводили після додатко-

вого очищення екстрактів методом ТШХ. Для цього елюювали флуоксетин метанолом з непроявленої смуги хроматограми на рівні, що відповідав місцю знаходження плями "свідка" флуоксетину. Елюат випаровували та сухий залишок розчиняли в 0,1 М розчині кислоти хлоридної. УФ-спектр одержаного розчину був аналогічним спектру розчину стандарту флуоксетину в 0,1 М розчині кислоти хлоридної та мав смуги поглинання при  $\lambda_{\text{max}} = 265 \pm 2$  нм та  $276 \pm 2$  нм.

Кількісне визначення флуоксетину у витяжках проводили екстракційно- фотометричним методом за реакцією утворення іонних асоціатів препарату з метиловим оранжевим та розраховували вміст флуоксетину в екстрактах за допомогою градуювального графіка.

Для побудови градуювального графіка використовували стандартний розчин флуоксетину в хлороформі, що містив 100 мкг препарату в 1 мл. У ділильні лійки вносили по 5 мл ацетатного буферного розчину з pH 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 ділильних 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  $\lambda_{\text{eff}} = 540 \pm 10$  нм; кювета з товщиною шару рідини 10 мм). Як розчини порівняння використовували "холости" досліди (метиловий оранжевий не екстрагується хлороформом в інтервалі pH 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

У ході розробки методики виділення флуоксетину з крові попередньо було проведено осадження еритроцитарної маси додаванням 10% розчину кислоти трихлорацетатної з наступним центрифугуванням та екстрагування залишків супутніх речовин діетиловим ефіром з кислого середовища. У разі відсутності етапу осадження форменних елементів крові під час екстракції препарату органічними розчинниками з лужного середовища утворювались стійкі емульсії.

Для аналізу флуоксетину в хлороформних екстрактах, одержаних з осаду з крові, необхідне

Таблиця 1

Результати кількісного визначення флуоксетину, виділеного з плазми крові екстракційно-фотометричним методом (середнє з п'яти визначень)

Додано флуоксетину до 10 мл крові, мкг	Виділено флуоксетину		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
50	12,25	24,50	
75	17,02	22,70	
100	24,10	24,10	
150	32,40	21,60	$\bar{X} = 22,80$ $S = 1,49$ $S_x = 0,66$ $\Delta X = 1,83$ $\varepsilon = 8,02$ $\bar{X} \pm \Delta X = 22,80 \pm 1,83$
200	42,20	21,10	

було додаткове екстракційне очищення, яке проводили як описано вище. Оптична густина розчинів, одержаних у "холостих" дослідах до та після додаткового очищення, знаходилась, відповідно, у межах 0,05-0,10 та 0,015-0,02 в області спектра, що відповідало максимуму світлопоглинання за-барвленіх розчинів іонних асоціатів флуоксетину з метиловим оранжевим).

Застосовані нами кольорові реакції, методи ТШХ та УФ-спектроскопії (останній після додаткового хроматографічного очищення) виявилися досить чутливими для виявлення досліджених нами меж концентрацій флуоксетину в біологічних рідинах.

Результати кількісних визначень флуоксетину, виділеного з плазми крові, а також з осаду крові після відокремлення його від плазми, наведені у

## ЛІТЕРАТУРА

- Бур'ян Г.О. Хіміко-токсикологічне дослідження флуоксетину: Дис. ... канд. фармац. наук: 15.00.02. — Х., 2003. — С. 115-116.
- Машковский М.Д. Лекарственные средства: 15-е изд. — М.: ООО "Издательство Новая Волна", 2006. — С. 104-105.
- Bateman N.D. Antidepressants: Poisonous substances. — Amsterdam: Elsevier, 2007. — P. 587-589.
- Carson H.J. // J. Leg. Med. — 2007. — Vol. XXX. — P. 1-4.
- Cheeta S., Schifano F., Oyefeso A. et al. // Brit. J. Psychiatry. — 2004. — №184. — P. 41-47.
- Clark's analysis of Drugs and Poisons: 3-rd Ed. — Pharmaceutical Press, 2005 (CD).
- Gross R., Dannon P.N., Lepkifker E. et al. // Am. J. Emerg. Med. — 1998. — №16. — P. 328-329.
- Isbister G.K., Bowe S.J., Dawson A. et al. // J. Toxicol. Clin. Toxicol. — 2004. — №42. — P. 277-285.
- Mann J.J. // N. Engl. J. Med. — 2005. — №353. — P. 1819.
- Poisoning & Drug Overdose. Fourth Edition / Ed. K.R.Olson. — Zange Medical Books, Mc Graw-Hill, 2004. — P. 88-93.
- Randall C. Baselt. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. — California, Foster City: Chemical Toxicology Institute, 2000. — P. 476-478.
- Yildiz A., Gonul A., Tamam L. // Bull. Clin. Psychopharmacol. — 2002. — №12. — P. 194.

Таблиця 2

Результати кількісного визначення флуоксетину, виділеного з осаду крові після відокремлення його від плазми екстракційно-фотометричним методом (середнє з п'яти визначень)

Додано флуоксетину до 10 мл крові, мкг	Виділено флуоксетину		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
50	9,60	19,20	$\bar{X} = 19,72$ $S = 1,83$ $S_x = 0,82$ $\Delta X = 2,27$ $\varepsilon = 11,84$ $\bar{X} \pm \Delta X = 19,72 \pm 2,27$
75	13,05	17,40	
100	22,20	22,20	
150	28,50	19,00	
200	41,60	20,80	

табл. 1 та 2, відповідно. Як видно, за допомогою запропонованої методики рідинно-рідинної екстракції з лужного середовища хлороформом з плазми крові можна виділити  $22,80 \pm 1,83\%$ , а з осаду крові після відокремлення його від плазми — ще додатково  $19,72 \pm 2,27\%$  флуоксетину. Таким чином, аналіз осаду з крові на вміст в ньому антидепресанта підвищує ступінь ізолювання флуоксетину з зазначененої біологічної рідини.

## ВИСНОВКИ

Розроблена методика рідинно-рідинної екстракції флуоксетину з крові хлороформом з лужного середовища, що дозволяє виділити з плазми крові  $22,80 \pm 1,83\%$ , а з осаду крові після відокремлення його від плазми — ще додатково  $19,72 \pm 2,27\%$  флуоксетину.

УДК 615.065:54.061/062:547.712.22:001.8  
РАЗРАБОТКА УСЛОВИЙ ИЗОЛИРОВАНИЯ ФЛУОКСЕТИНА ИЗ КРОВИ

С.В.Баюрка, С.А.Карпушина, В.С.Бондарь

Разработана методика жидкостно-жидкостной экстракции флуоксетина из крови хлороформом из щелочной среды, которая позволила выделить из плазмы крови  $22,80 \pm 1,83\%$ , а из осадка крови после отделения его от плазмы — еще дополнительно  $19,72 \pm 2,27\%$  флуоксетина. Обнаружение и количественное определение препарата в экстрактах проводили с помощью цветных реакций, тонкослойной хроматографии, УФ-спектроскопии, экстракционной фотометрии по реакции образования ионного ассоциата с кислотным азокрасителем метиловым оранжевым.

UDC 615.065:54.061/062:547.712.22:001.8  
DEVELOPMENT OF CONDITIONS FOR FLUOXETINE ISOLATION FROM BLOOD

S.V.Bayurka, S.A.Karpushina, V.S.Bondar

The method of liquid-liquid extraction of fluoxetine from blood by chloroform from the alkaline medium has been developed, it allowed to separate  $22.80 \pm 1.83\%$  of fluoxetine from blood serum, and additionally  $19.72 \pm 2.27\%$  of fluoxetine from blood residue after its separation from the serum. Detection and quantitative determination of fluoxetine in the extracts were carried out with the help of colour reactions, thin layer chromatography, UV-spectroscopy, extraction — photometry by the reaction of ionic associate formation with methyl orange, the acidic azodye.