

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

УДК 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

ІЗОЛЮВАННЯ ДЕЯКИХ АНТИДЕПРЕСАНТІВ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ЗА ДОПОМОГОЮ ХЛОРОФОРМУ

С.В.Баюрка, С.А.Карпушина

Національний фармацевтичний університет

Встановлено ефективність відносно деяких антидепресантів методу ізоляції лікарських речовин їх елююванням хлороформом з біологічної тканини, гомогенізованої розтиранням з натрію сульфатом безводним, який дозволив виділити: амітроптиліну — $13,24 \pm 1,19\%$, флуоксетину — $10,54 \pm 1,42\%$, піразидолу — $8,5 \pm 1,05\%$. Показана можливість використання кольорових експрес-тестів, тонкошарової хроматографії, УФ-спектроскопії та екстракційної фотоколориметрії для виявлення та кількісного визначення досліджуваних антидепресантів, виділених з біологічного матеріалу зазначеним методом. Одержані результати можуть бути використані для судово-токсикологічних досліджень біологічного матеріалу при смертельних отруєннях амітроптиліном, флуоксетином та піразидолом.

Пробопідготовка, яка включає виділення токсичної речовини з об'єкту дослідження та очищення її від супутніх ендогенних домішок, значною мірою визначає достовірність результатів хіміко-токсикологічного дослідження, отриманих на наступних етапах ідентифікації та кількісного визначення токсиканта.

Застосування таких доступних та поширених у практиці хіміко-токсикологічного аналізу методів як кольорові експрес-тести, тонкошарова хроматографія (ТШХ), УФ-спектроскопія є доцільним у тому випадку, коли метод ізоляції забезпечує виділення достатньої кількості отруйної речовини з досліджуваного об'єкту [8, 16].

Класичні методи ізоляції лікарських речовин з біологічного матеріалу [8] передбачають використання підкисленої води (методи О.О.Васильєвої, В.П.Крамаренка) або підкисленого етанолу (метод Стаса-Отто). Ці методи є не завжди ефективними по відношенню до ряду ліпофільних речовин [11], наприклад, антидепресантів, які накопичуються у тканинах, легко проникаючи крізь клітинні мембрани.

У зв'язку з цим, великий інтерес представляє метод ізоляції лікарських речовин, заснова-

ний на елююванні токсиканту хлороформом з наважки біологічного об'єкту, гомогенізованого за допомогою його розтирання з натрію сульфатом безводним. Цей метод впроваджено в практику хіміко-токсикологічного аналізу лікарських речовин різних фармакологічних груп [3, 4].

Значний інтерес у хіміко-токсикологічному відношенні становлять антидепресанти, кількість отруєнь якими останнім часом різко збільшилась [12-15, 17].

Таким чином, мета нашої роботи полягала у встановленні ефективності методу ізоляції за допомогою хлороформу для таких широко застосовуваних у медичній практиці антидепресантів [10] як амітроптилін, флуоксетин та піразидол.

Згідно з літературними даними, ефективність ізоляції зазначених речовин з біологічного матеріалу за методами О.О.Васильєвої, В.П.Крамаренка та Стаса-Отто, відповідно, становила: для амітроптиліну [2] — 15%, 9%, 11%; для флуоксетину [1] — 9%, 17%, 18%; для піразидолу [7] — 6%, 8,5%, 11,5%.

Невисока ефективність цих методів, як вказувалось вище, може бути пов'язана з високою ліпофільністю антидепресантів, про що свідчать значні величини їх коефіцієнтів розподілу (V_d), наприклад, для амітроптиліну — 20 л/кг [8], для флуоксетину — 27 л/кг [16], а для групи антидепресантів в цілому — 5-10 л/кг [18].

Дані ізоляції амітроптиліну та піразидолу елююванням хлороформом з біологічної тканини, гомогенізованої за допомогою розтирання її з натрію сульфатом безводним, у літературі відсутні. Результати, отримані вказаним методом для флуоксетину [5], потребують деталізації та систематизації з урахуванням високої ліпофільноти зазначеного антидепресанта.

Матеріали та методи

До проб печінки (5 г) людини, яка загинула від травми, окрім додавали водні розчини, що містили 100 мкг амітроптиліну та 2000 мкг флуоксетину або піразидолу. Об'єкти залишали на добу при кімнатній температурі, а потім виділяли препарати за наступною методикою.

Наважку печінки переносили в ступку, додавали потрійну кількість натрію сульфату безводного і розтирали до утворення однорідної сипкої маси. Отриманий об'єкт переносили до скляної колонки діаметром 20 мм, в нижню частину якої заздалегідь перед заповненням вміщували невеликий ватний тампон. Через відкритий кран колонку заповнювали хлороформом за допомогою гумової груші до утворення "дзеркала" над поверхнею об'єкта завтовшки до 2 см. Кран закривали і над колонкою встановлювали ділильну лійку з хлороформом (100 мл). Через колонку пропускали хлороформ зі швидкістю 60-80 крапель за хвилину. Елюати збиралі у порцелянові чашки і випарювали на водяній бані при температурі не вище, ніж 40°C до видалення органічного розчинника. Супутні домішки, які заважали подальшому виявленню та кількісному визначенням антидепресантів, проводили за допомогою методу екстракції, як описано в роботах [1, 2].

Таким чином, після очищення екстрактів за допомогою хлороформу кислі центрифугати підлуговували натрію гідроксидом 20% розчином до відповідних значень pH, які наведені нижче та відповідають максимумам екстракції зазначених антидепресантів, і тричі екстрагували препарати хлороформом по 10 мл кожного разу. Хлороформні екстракти збирали в чашки, об'єднували і кількісно переносили у мірні колби об'ємом 50 мл та доводили до позначки хлороформом. Паралельно проводили "холості" досліди для отримання розчинів порівняння.

Результати та їх обговорення

За даними літератури, зазначені антидепресанти з кислих водних розчинів хлороформом практично не екстрагуються (ступінь однократної екстракції (R, %) препаратів не перевищує 1-2%). З підлужених водних розчинів максимальний ступінь екстракції хлороформом становить: для амітриптиліну — R = 62-66 (pH = 11-12) [9], для флуоксетину — R = 99-98 (pH = 8-9) [6], для піразидолу — R = 31-37 (pH = 8-11) [7].

Отримані хлороформні екстракти використовували для ідентифікації досліджуваних антидепресантів за допомогою кольорових експрес-тестів, ТШХ та УФ-спектроскопії. Кількісне визначення препаратів проводили екстракційно-фотоколориметричним методом за реакцією утворення іонних асоціатів з кислотним азобарвником — метиловим оранжевим.

Для кольорових експрес-тестів на досліджувані лікарські речовини використовували кислоту сульфатну концентровану (амітриптилін — оранжеве забарвлення, флуоксетин — коричневе забарвлення, піразидол — лимонно-жовте забарвлення), реактиви Маркі (амітриптилін — коричневе забарвлення, яке переходить у оранжеве, піразидол — жовте забарвлення), Фреде (амітриптилін — цег-

ляно-червоне забарвлення, яке переходить у зелене, флуоксетин та піразидол — синє забарвлення), Манделіна (амітриптилін — коричневе забарвлення, яке переходить у зелене, флуоксетин — синє забарвлення, піразидол — жовте забарвлення), Лібермана (флуоксетин та піразидол — коричневе забарвлення). Паралельно проводили контрольні досліди зі стандартними розчинами амітриптиліну, флуоксетину та піразидолу (20 мкг/мл) та витяжками з "холостих" дослідів.

Для хроматографічного виявлення досліджуваних антидепресантів використовували хроматографічні пластинки Merck (Silica gel 60 F254 розміром 10×20 см). Відбирали 10-20 мл хлороформної витяжки, органічний розчинник 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" відповідного антидепресанта (10 мкг у пробі). У третю точку наносили 5 мл випареної витяжки, одержаної у "холостому" досліді. Хроматограми розвивали послідовно з використанням двох рухомих фаз: хлороформ і метанол — амонію гідроксид 25% розчин (100:1,5) (послідовно). Плями антидепресантів на хроматографічних пластинках детектували за допомогою реактиву Драгендорфа у модифікації за Мунье (оранжевий колір плям препарату на жовтому фоні; чутливість виявлення амітриптиліну складала 0,5 мкг, для флуоксетину — 0,25 мкг, для піразидолу — 8,0 мкг препаратів у пробі). Плями антидепресанта, виділеного з печінки, та антидепресанта-“свідка” співпадали за величинами Rf і становили для амітриптиліну 0,35±0,02, для флуоксетину 0,25±0,02, для піразидолу 0,55±0,02. Витяжки, отримані з "холостих" дослідів, не давали плям зі вказаними значеннями Rf.

УФ-спектроскопічне дослідження антидепресантів, виділених з біологічного матеріалу, проводили після додаткового очищення екстрактів від супутніх домішок методом ТШХ. Для цього елюювали досліджувані речовини метанолом з непроявленої смуги хроматограми на рівні, що відповідав місцю знаходження плями "свідка" препарату. Елюат випаровували до видалення органічного розчинника, залишок розчиняли в кислоті хлоридній 0,1 М розчині. УФ-спектри одержаних розчинів були аналогічні спектрам розчинів стандартних препаратів у кислоті хлоридній 0,1 М розчині та мали смуги поглинання для амітриптиліну при 238±2 нм, для флуоксетину — при 265±2 нм та 276±2 нм, для піразидолу — при 228±2 нм та 276±2 нм.

Кількісне визначення досліджуваних антидепресантів у витяжках проводили екстракційно-фотоколориметричним методом за реакцією утворення іонних асоціатів препаратів з метиловим оранжевим та розраховували вміст токсикантів в

Таблиця

Результати екстракційно-фотоколориметричного визначення деяких антидепресантів, виділених з печінки за допомогою хлороформу (середнє з п'яти визначень)

Речовина	Додано антидепресанта до 5 г печінки, мкг	Виділено антидепресанта		Метрологічні характеристики
		мкг	%,	
Амітриптилін	100	12,0	12,0	$\bar{X}=13,24$ $S=0,96$ $S_{\bar{X}}=0,43$ $\Delta X=1,19$ $\varepsilon=9,01$ $\bar{X} \pm \Delta X = 13,24 \pm 1,19$
		13,1	13,1	
		14,4	14,4	
		14,0	14,0	
		12,7	12,7	
Флуоксетин	500	51,0	10,2	$\bar{X}=10,54$ $S=1,14$ $S_{\bar{X}}=0,51$ $\Delta X=1,42$ $\varepsilon=13,47$ $\bar{X} \pm \Delta X = 10,54 \pm 1,42$
		47,5	9,5	
		49,0	9,8	
		62,0	12,4	
		54,0	10,8	
Піразидол	500	43,0	8,6	$\bar{X}=8,5$ $S=0,85$ $S_{\bar{X}}=0,38$ $\Delta X=1,05$ $\varepsilon=12,35$ $\bar{X} \pm \Delta X = 8,5 \pm 1,05$
		47,5	9,5	
		45,5	9,1	
		37,0	7,4	
		39,5	7,9	

екстрактах за допомогою градуювального графіка як описано у роботах [1, 2].

Результати кількісного визначення досліджуваних антидепресантів, виділених елююванням хлороформом з біологічного об'єкту, гомогенізованого за допомогою розтирання його з натрію сульфатом безводним, наведені у таблиці.

Як видно, за допомогою зазначененої методики з печінки можна виділити: амітриптиліну — 13,24 ±

±1,19%, флуоксетину — 10,54 ± 1,42%, піразидолу — 8,5 ± 1,05%.

Таким чином, ефективність ізолювання зазначених антидепресантів за допомогою хлороформу співвідноситься з ефективністю їх ізолювання загальноприйнятими методами (підкисленням водою та етанолом). Хоча апробований метод має перевагу в тому, що дозволяє виділити ліпофільну токсичну речовину з вмісту клітин, але він має той же недолік, що і загальні методи: втрата досліджуваної речовини на етапі екстракції ендогенних домішок з кислого середовища за рахунок розчинності антидепресантів у жирах. Очевидно, на цьому етапі відбувається найбільша втрата виділеної ліпофільної токсичної речовини. Але незважаючи на це, кількість токсиканта, що була виділена з біологічного матеріалу з використанням апробованого методу, була достатньою для його виявлення та кількісного визначення за допомогою колючих експрес-тестів, ТШХ, УФ-спектроскопії та екстракційної фотоколориметрії.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено ефективність відносно деяких антидепресантів методу ізолювання лікарських речовин елююванням їх хлороформом з біологічної тканини, гомогенізованої за допомогою розтирання з натрію сульфатом безводним, який дозволив виділити: амітриптиліну — 13,24 ± 1,19%, флуоксетину — 10,54 ± 1,42%, піразидолу — 8,5 ± 1,05%.

2. Показана можливість використання колючих експрес-тестів, тонкошарової хроматографії, УФ-спектроскопії та екстракційної фотоколориметрії для виявлення та кількісного визначення досліджуваних антидепресантів, виділених з біологічного матеріалу зазначенним методом.

Одержані результати можуть бути використані для судово-токсикологічних досліджень біологічного матеріалу при смертельних отруєннях амітриптиліном, флуоксетином та піразидолом.

ЛІТЕРАТУРА

1. Баюрка С.В., Карпушина С.А., Бондар В.С. // Клінічна фармація. — 2009. — Т. 13, №1. — С. 23-26.
2. Баюрка С.В., Карпушина С.А., Бондар В.С. та ін. // Клінічна фармація. — 2009. — Т. 13, №2. — С. 30-33.
3. Болотов В.В., Клименко Л.Ю. // Вісник фармації. — 2006. — №3 (47). — С. 26-30.
4. Болотов В.В., Мороз В.П., Зареченський М.А. // Вісник фармації. — 1999. — №1 (19). — С. 45-48.
5. Бондар В.С., Бур'ян Г.О. // Вісник фармації. — 2002. — №4 (32). — С. 15-18.
6. Бондар В.С., Бур'ян Г.О. // ФАР. — 2001. — №2 (32). — С. 44-46.
7. Борисова І.В., Попова В.І. // Фармац. журн. — 1990. — №1. — С. 59-60.
8. Вергейчик Т.Х. Токсикологическая химия. — М.: МЕДпресс-информ, 2009. — 400 с.
9. Горностаєва Э.Ф. // Фармация. — 1975. — №2. — С. 79-80.
10. Машковский М.Д. Лекарственные средства: 15-е изд. — М.: ООО “Изд-во Новая Волна”, 2006. — С. 90-109.
11. Удалов А.В. // Лабор. журн. — 2003. — №1 (3). — С. 54-58.
12. Элленхорн М.Дж. Медицинская токсикология. Диагностика и лечение отравлений у человека. В 2-х т. / Пер. с англ. — М.: Медицина, 2003. — Т. 1. — 1048 с.; Т. 2. — 1044 с.

13. Bateman N.D. *Antidepressants: Poisonous substances.* — Amsterdam: Elsevier, 2007. — P. 587-589.
14. Carson H.J. // *J. Leg. Med.* — 2007. — Vol. XXX. — P. 1-4.
15. Cheeta S., Schifano F., Oyefeso A. et al. // *Brit. J. Psychiatry.* — 2004. — №184. — P. 41-47.
16. Clarke's isolation and identification of Drugs. — London: Pharmaceutical Press, 1986. — 1223 p.
17. Isbister G.K., Bowe S.J., Dawson A. et al. // *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* — 2004. — №42. — P. 277-285.
18. Poisoning & Drug Overdose. 4-th ed. / Ed. K.R.Olson. — Zange Medical Books, Mc Graw-Hill, 2004. — P. 88-93.

УДК 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

ИЗОЛИРОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ АНТИДЕПРЕССАНТОВ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА С ПОМОЩЬЮ ХЛОРОФОРМА

С.В.Баюрка, С.А.Карпушина

Установлена эффективность относительно некоторых антидепрессантов метода изолирования лекарственных веществ элюированием их хлороформом из биологической ткани, гомогенизированной растиранием с натрия сульфатом безводным, который позволил выделить: амитриптилина — 13,24±1,19%, флуоксетина — 10,54±1,42%, пиразидола — 8,5±1,05%. Показана возможность использования цветных экспресс-тестов, тонкослойной хроматографии, УФ-спектроскопии и экстракционной фотоколориметрии для обнаружения и количественного определения исследуемых антидепрессантов, выделенных из биологического материала указанным методом. Полученные результаты могут быть использованы для судебно-токсикологических исследований биологического материала при смертельных отравлениях амитриптилином, флуоксетином и пиразидолом.

UDC 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

ISOLATION OF SOME ANTIDEPRESSANTS FROM THE BIOLOGICAL MATERIAL WITH CHLOROFORM

S.V.Bayurka, S.A.Karpushina

Efficiency of the isolation method of medicinal substances in relation to some antidepressants by their elution with chloroform from the biological tissue homogenized by trituration with anhydrous sodium sulphate has been determined. The method allowed to separate 13.24±1.19% of amitriptyline, 10.54±1.42% of fluoxetine, 8.5±1.05% of pyrazidolum. The possibility of using colour express-tests, Thin Layer Chromatography, UV-spectroscopy, extraction-photocolorimetry for detection and quantitative determination of the antidepressants under research isolated from the biological material by the given method has been shown. The results obtained may be used for the forensic-toxicological research of the biological material in lethal poisonings with amitriptyline, fluoxetine, pyrazidol.