СИНТЕЗ ТА АНАЛІЗ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Рекомендована д.ф.н., професором П.О.Безуглим

УДК 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

РОЗРОБКА МЕТОДІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЦИТАЛОПРАМУ, ПРИДАТНИХ ДЛЯ ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНОГО АНАЛІЗУ

С.В.Баюрка, В.С.Бондар, В.В.Болотов, С.А.Карпушина

Національний фармацевтичний університет

Вивчені умови ідентифікації циталопраму за допомогою тонкошарової хроматографії, осадових і кольорових реакцій, УФ-спектроскопії. Розроблені методики УФ-спектрофотометричного і екстракційно-фотоколориметричного визначення циталопраму за реакцією з метиловим оранжевим.

Близько 121 млн людей у світі згідно зі статистичними даними [17, 22] вживають антидепресанти з приводу хронічних та рецидивних розладів психічного стану, які є потенційною причиною суїцидальної поведінки. Одним з антидепресантів, який неодноразово був причиною гострих та смертельних отруєнь, є циталопрам [15, 18, 19, 20] (1-[3-(диметиламіно)пропіл]-1-(4-фторфеніл)-1,3-дигідро-5-ізобензофуранкарбонітрилу гідробромід). Серед групи антидепресантів — селективних інгібіторів зворотнього захвату серотоніну циталопрам є найбільш токсичним при передозуванні [12]. Поряд з цим зазначений антидепресант знайшов широке застосування в сучасній медичній практиці для лікування депресій різноманітної етіології [5, 7], а також лікування хворих з алкогольною залежністю [1]. Таким чином, розробка методів аналізу циталопраму, придатних для використання при хіміко-токсикологічному дослідженні, є актуальною задачею.

Запропоновано скринінгові системи для виявлення циталопраму за допомогою методу тонкошарової хроматографії [15], але перелік наведених рухомих фаз обмежений. На наш погляд, доцільно провести хроматографічне дослідження циталопраму з використанням рухомих фаз, рекомендованих Міжнародним комітетом з систематичного токсикологічного аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів [2].

Вивчено світлопоглинання циталопраму в УФ-області спектра [15], яке характеризується наявністю п'яти максимумів, що значно відрізняються за інтенсивністю. При цьому відсутні дані про області досліджуваних концентрацій або величини коефіцієнтів світлопоглинання. Це може викликати певні складності при використанні наведених даних для ідентифікації циталопраму в об'єктах судово-токсикологічного аналізу, кількість яких обмежена.

Опрацьовані також методики аналізу циталопраму в об'єктах хіміко-токсикологічного аналізу (плазмі, крові, сечі, волоссі) за допомогою методів газорідинної хроматографії [15], високоефективної рідинної хроматографії [11, 15, 16], сполучення рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією [14, 23], методу міцелярної електрокінетичної капілярної хроматографії [21]. Метод капілярного електрофорезу застосовано для кількісного аналізу циталопраму в грудному молоці [13]. Вищеперелічені методики характеризуються високою чутливістю та специфічністю, але потребують ретельної пробопідготовки (твердофазна екстракція [14, 16], рідиннофазна мікроекстракція [13]) та спеціального дорогого обладнання, що робить їх малодоступними.

Метою нашого дослідження було встановлення умов виявлення, ідентифікації та кількісного визначення циталопраму за допомогою простих, доступних та широко впроваджених у практику хіміко-токсикологічного аналізу методів [4, 15]: тонкошарової хроматографії, хімічних реакцій, УФ-спектрофотомерії та екстракційної фотоколориметрії.

Матеріали та методи

Хроматографічне дослідження проводили з використанням пластинок для високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) виробництва Естонії (сорбент КСКГ, фракція — 5÷20 мкм, товщина шару — 130±25 мкм, розмір пластинок 20×20 см), Sorbfil (силікагель СТХ-1 ВЕ, тип підложки — ПЕТФ, зв'язуюча речовина — силіка-

Таблиця 1

Значення Rf циталопраму у різних рухомих фазах і тонких шарах

Рухомі фази	Значення Rf циталопраму			
	ВЕТШХ	Сорбфіл	Merk	Силуфол
Метанол-25% розчин амонію гідроксиду (100:1,5)	0,57	0,50	0,38	0,24
Хлороформ-метанол (90:10)	0,21	0,33	0,27	0,18
Етилацетат-метанол-25% розчин амонію гідроксиду (85:10:5)	0,81	0,74	0,75	0,47
Хлороформ-*н*-бутанол-25% розчин амонію гідроксиду (70:40:5)	0,97	0,94	0,92	0,92
Метанол-*н*-бутанол (60:40)	0,14	0,08	0,07	0,08
Метанол	0,18	0,21	0,15	0,08
Ацетон	0,07	0,07	0,11	0,06
Етилацетат	0,00	0,00	0,00	0,00
Циклогексан-толуен-діетиламін (75:15:10)	0,65	0,58	0,40	0,58
Гексан-*і*-пропанол-25% розчин амонію гідроксиду (24:6:0,3)	0,47	0,18	0,40	0,04
Толуен-ацетон-етанол-25% розчин амонію гідроксиду (45:45:7,5:2,5)	0,72	0,70	0,59	0,46
Хлороформ-діоксан-ацетон-25% розчин амонію гідроксиду (47,5:45:5:2,5)	0,85	0,75	0,70	0,56
Хлороформ-ацетон-25% розчин амонію гідроксиду (12:24:1)	0,75	0,59	0,54	0,56
н-Бутанол-кислота ацетатна-вода (4:0,5:1)	0,35	0,41	0,26	0,18
Етилацетат-ацетон-25% розчин амонію гідроксиду (50:45:4)	0,84	0,70	0,72	0,46
Бензен-метанол-діетиламін (90:10:10)	0,81	0,76	0,74	0,45
Гексан-етилацетат-етанол-25% розчин амонію гідроксиду (30:10:5:1)	0,62	0,51	0,57	0,24
Етанол-ацетон-вода (1:1:2)	0,11	0,08	0,16	0,12
Гексан-толуен-діетиламін (75:15:10)	0,46	0,40	0,27	0,29

золь, фракція — 8÷12 мкм, товщина шару — 100 мкм, розмір пластинок 10×10 см), Merck виробництва Німеччини (силікагель GF_{254}, розмір пластинок 10×20 см), Silufol UV-254 (силікагель, підложка — фольга, зв'язуюча речовина — крохмаль, розмір пластинок 10×10 см) та рухомих фаз, які наведені в табл. 1. Як проявник циталопраму на хроматографічних пластинках використовували реактив Драгендорфа у модифікації за Муньє.

Осадові реакції виконували на предметному склі з водними розчинами циталопраму гідробромідy (вміст досліджуваної речовини — від 0,5 до 20 мкг у пробі) з реактивами групового осадження алкалоїдів [4].

Реакції забарвлення проводили на шматочках хроматографічних пластинок з хлороформними розчинами циталопраму гідробромідy (вміст речовини — від 0,5 до 25 мкг у пробі). Як реагенти використовували кольорові реактиви [4, 15]: кислоту сульфатну концентровану, реактиви Маркі, Манделіна, Фреде, Лібермана, Ердмана.

УФ-спектри абсорбції циталопраму гідробромідy в 0,1 М розчині кислоти хлоридної знімали на спектрофотометрі СФ-46 у діапазоні довжин хвиль 200-350 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм; як розчин порівняння використовували 0,1 М розчин кислоти хлоридної.

Для УФ-спектрофотометричного визначення циталопраму використовували абсорбцію при довжині хвилі 239 нм.

Методика побудови градуювального графіка для УФ-спектрофотометричного визначення циталопраму гідробромідy. Розчини циталопраму гідробромідy 1-9 готували наступним чином: 0,0025 г досліджуваної речовини вносили в мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняли у 0,1 М розчині кислоти хлоридної та доводили об'єм розчину до мітки вказаним розчином кислоти (стандартний розчин з концентрацією 50 мкг/мл). У мірні колби місткістю 10 мл вносили 0,4; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 та 7,0 мл стандартного розчину і доводили об'єми розчинів до мітки 0,1 М розчином кислоти хло-

ридної (розчини 1-9 відповідно, концентрація — 2,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 та 35,0 мкг/мл). Вимірювали оптичну густину і будували графік залежності оптичної густини від концентрації.

Методика побудови градуювального графіка для екстракційно-фотометричного визначення циталопраму гідроброміду. Циталопраму гідробромід (0,0150 г) вносили в мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняли у хлороформі та доводили об'єм розчину до мітки вказаним розчинником (стандартний розчин з концентрацією 300 мкг/мл).

У ділильну лійку вносили 5,0 мл ацетатного буферного розчину з pH 4,6, 5,0 мл 0,05% розчину метилового оранжевого та по 0,05; 0,1; 0,15; 0,25; 0,4; 0,5; 0,6; 0,75; 0,9 та 1,0 мл стандартного розчину циталопраму гідробромі відповідно. В усіх випадках, крім останнього, об'єм хлороформу 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 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 при λ_{max} = 540 нм, використовуючи кювету з товщиною шару рідини 10 мм. Як розчин порівняння застосовували хлороформ. Величину pH буферного розчину контролювали потенціометрично. Вимірювали оптичну густину і будували графік залежності оптичної густини від концентрації.

Результати та їх обговорення

Результати хроматографічного дослідження циталопраму наведені в табл. 1. Рухомі фази №1-9 рекомендовані Міжнародним комітетом з систематичного токсикологічного аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів. Рухомі фази №10-19 використовуються у хіміко-токсикологічному аналізі для виявлення лікарських речовин основного характеру методом ТШХ [8, 10].

При використанні реактиву Драгендорфа у модифікації Муньє як проявника циталопраму на хроматографічних пластинках спостерігали оранжевий колір плям препарату на жовтому фоні. Чутливість виявлення циталопраму при цьому знаходилась у межах 0,5-1,0 мкг препарату в пробі. Чутливість зазначеного проявника при виявленні циталопраму була найвищою при використанні хроматографічних пластинок Merck та Sorbfil (0,5 мкг у пробі).

Встановлено, що циталопрам утворює забарвлення з кислотою сульфатною концентрованою (жовте), реактивами Маркі (жовтувато-зелене забарвлення, що переходило у коричневе), Манделіна (зелене), Фреде (жовте), Лібермана (лимонно-жовте забарвлення, що переходило у коричневе), Ердмана (світло-коричневе); чутливість вказаних реакцій становила 3,0-6,0 мкг препарату в пробі.

Найбільш чутливими осадовими реактивами, з якими циталопрам утворював аморфні осади, виявилися реактиви Драгендорфа, Бушарда, Шейблера та 1% розчин солі Рейнеке; чутливість вказаних реактивів становила 1,0 мкг препарату у пробі.

УФ-спектр абсорбції циталопраму в 0,1 М розчині кислоти хлоридної має, як вказувалось вище, п'ять максимумів світлопоглинання (рис.), для яких нами були визначені питомі та молярні коефіцієнти світлопоглинання при наступних довжинах хвиль (λ_{max}): 206±2 (A^1_1 = 608,4; ε = 24660), 239±2 (A^1_1 = 312,8; ε = 12680), 270±2 (A^1_1 = 39,1; ε = 1588), 276±2 (A^1_1 = 37,8; ε = 1536) та 285±2 нм (A^1_1 = 32,8; ε = 1332).

Для розробки методики екстракційно-фотоколориметричного визначення циталопраму попередньо нами було встановлено, що кислотний азобарвник — метиловий оранжевий (0,05% водний розчин) утворює з циталопрамом гідробромідом у середовищі ацетатного буферного розчину з pH 4,6 іонний асоціат, який екстрагується хлороформом. Забарвлення розчинів іонних асоціатів виявилося малоцікавим, тому для підсилення чутливості методу утворені іонні асоціати руйнували додаванням до їх хлороформних розчинів 1% розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі. При цьому одержували розчини, що мали значно вищу оптичну густину.

Були визначені також оптимальні умови проведення екстракційно-фотоколориметричного визначення [3]: об'єми розчину метилового оранжевого, ацетатного буферного розчину та хлороформу, кількість екстракцій іонного асоціату відповідним органічним розчинником, а також оптимальне значення pH буферного розчину, для чого нами був виготовлений ряд ацетатних буферних розчинів з pH від 3,0 до 6,0 [6].

Для розрахунку вмісту циталопраму в модельних розчинах УФ-спектрофотометричним та екстракційно-фотоколориметричним методами використовували градуювальні графіки або рівняння (1) та (2), відповідно, які мали вигляд:

$$A = 0{,}0333 \cdot C + 0{,}019 \quad (1)$$

$$A = 0{,}00554 \cdot C + 0{,}02, \quad (2)$$

де: A — оптична густина; C — концентрація розчину циталопраму гідробромі**ду**, відповідно, мкг/мл або мкг у пробі.

Загальний вигляд вищенаведених рівнянь відповідає лінійній регресії виду: $y = bx + a$. Значення параметрів *а* та *в* розраховували за методом найменших квадратів [9]. Метрологічні характеристики отриманих градуювальних залежностей наведені в табл. 2. Після перевірки значущості параметра *а* у рівняннях (1) та (2) [9] було зроблено

Таблиця 2

Метрологічні характеристики градуювальної залежності оптичної густини від вмісту циталопраму (y = bx + a), отриманої УФ-спектрофотометричним та екстракційно-фотоколориметричним методами

Метод	r	b	a	S^2	Δb	Δa
УФ-спектрофотометричний	0,9998	0,0333	0,019	$7 \cdot 10^{-5}$	0,0004	0,007
Екстракційно-фотоколориметричний	0,99945	0,00554	0,02	$1,5 \cdot 10^{-4}$	0,00009	0,01

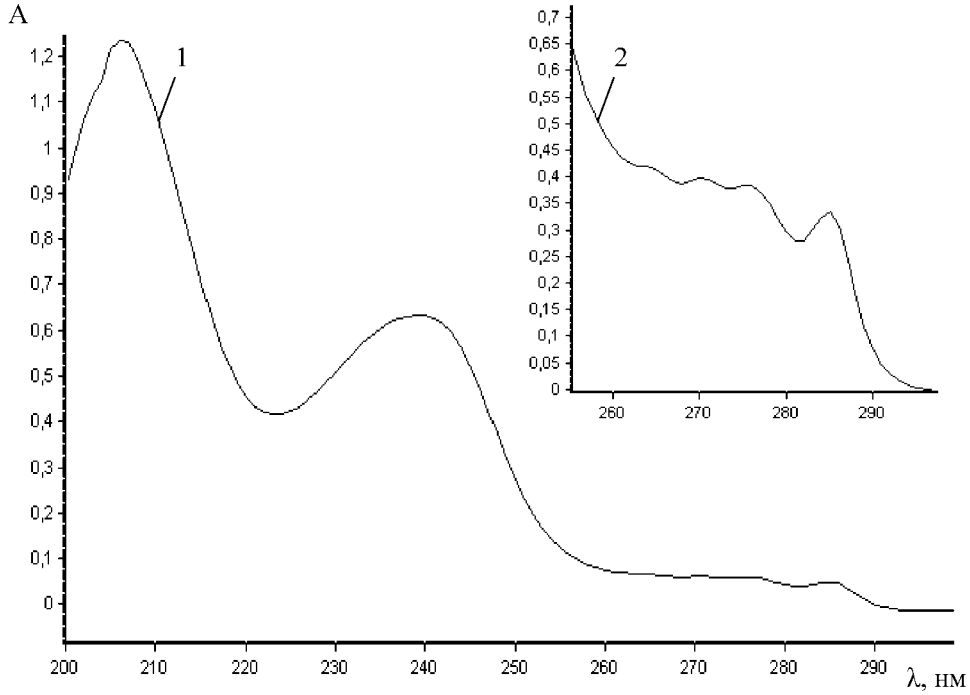

Рис. УФ-спектр світлопоглинання циталопраму гідробромідуу в 0,1 М розчині кислоти хлоридної (1 — концентрація $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л; 2 — концентрація $2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л).

висновок про неможливість переходу до рівняння виду: $y = b'x$.

Світлопоглинання розчинів підлягало закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 2 до 35 мкг/мл (УФ-спектрофотометричний метод) та від 10 до 200 мкг циталопраму у пробі в 15 мл кінцевого об'єму (екстракційно-фотоколориметричний метод), відносна невизначеність середнього результату, яка становила ±1,8% та ±2,4% відповідно.

ВИСНОВКИ

1. Вивчено хроматографічну поведінку циталопраму у загальних та деяких часткових рухомих фазах, загальноприйнятих у токсикологічному скринінгу речовин основного характеру з використанням чотирьох типів тонких шарів.

2. Вивчені осадові та кольорові реакції виявлення циталопраму.

3. Досліджено УФ-спектр поглинання циталопраму в 0,1 М розчині кислоти хлоридної та визначені коефіцієнти світлопоглинання.

4. Розроблено методики УФ-спектрофотометричного та екстракційно-фотоколориметричного (за реакцією з метиловим оранжевим) визначення циталопраму. Світлопоглинання розчинів підлягало закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 2 до 35 мкг/ мл (УФ-спектрофотометричний метод) та від 10 до 200 мкг циталопраму у пробі в 15 мл кінцевого об'єму (екстракційно-фотоколориметричний метод). Відносна невизначеність середнього результату складала для запропонованих методів ±1,8% та ±2,4% відповідно.

ЛІТЕРАТУРА

1. Агибалова Т.В., Захаров М.В., Лобачева А.С. // Психиатрия и психофармакотерапия. — 2004. — №4. — С. 156-158.

2. Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В. Анализ наркотических средств. — М.: Мысль, 1993. — 272 с.

3. Коренман И.М. Фотометрический анализ: Методы определения органических соединений. Изд. 2-е; перераб. и доп. — М.: Химия, 1975. — 359 с.

4. Крамаренко В.П. Токсикологічна хімія. — К.: Вища шк., 1995. — 423 с.

5. Крылов В.И. // ФАРМиндекс-Практик. — 2003. — Вып. 5 — С. 22-32.
6. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. — М.: Химия, 1989. — 448 с.
7. Машковский М.Д. Лекарственные средства: 15-е изд. — М.: ООО "Изд-во Новая Волна", 2006. — С. 106.
8. Николаева Э.Г. // СМЭ. — 1990. — Т. 33, №1. — С. 39-40.
9. Физико-химические методы анализа. Практическое руководство: Учебн. пособие для вузов / В.Б.Алесковский, В.В.Браун, М.И.Булатов и др.; Под ред. В.Б.Алесковского. — Л.: Химия, 1988. — 376 с.
10. Чернова Л.В., Карташов В.А., Коншина Е.Ю. // СМЭ. — 1991. — Т. 34, №1. — С. 34-36.
11. Bartolincic A., Sporec A., Druskovic V. et al. // Chem. Anal. — 2006. — 51, №4. — P. 509-526.
12. Bateman N.D. Antidepressants: Poisonous substances. — Amsterdam: Elsevier, 2007. — P. 587-589.
13. Bjorhovde A., Halvorsen G.T., Rasmussen K.E. et al. // Anal. Chim. Acta. — 2003. — Vol. 491, №2. — P. 155-161.
14. Castro A., Fernandez M.d.M.R., Laloup M. et al. //J. Chromatogr. A. — 2007. — Vol. 1160, №1. — P. 3-12.
15. 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.
16. Frahnet Ch., Luise R.M., Grasmader K. // J. Chromatogr. B. — 2003. — Vol. 794, №1. — P. 35-47.
17. Global Burden of Disease: A comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020 / C.J.L.Murray, A.D.Lopez. — Harvard: Harvard University Press, 1996. — P. 5.
18. Isbister G.K., Bowe S.J., Dawson A. et al. // J. Toxicol. Clin. Toxicol. — 2004. — №42. — P. 277-285.
19. Kelly C.K., Dhaun N., Laing W.J. et al. // J. Toxicol. Clin. Toxicol. — 2004. — №42. — P. 67-71.
20. Kelly C.K., Upex A., Spencer E.P. et al. // Hum. Exp. Toxicol. — 2003. — №22. — P. 103-105.
21. Labat L., Deveaux M., Dallet P. et al. // J. Chromatogr. B. — 2002. — Vol. 773, №1. — P. 17-23.
22. Sampson S.M. // Mayo Clin. Proc. — 2001. — №76. — P. 739.
23. Thieme D., Sachs H. // Anal. Chim. Acta. — 2003. — 492. — P. 171-186.

УДК 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

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

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

Изучены условия идентификации циталопрама с помощью тонкослойной хроматографии, осадочных и цветных реакций, УФ-спектроскопии. Разработаны методики УФ-спектрофотометрического и экстракционно-фотоколориметрического определения циталопрама по реакции с метиловым оранжевым.

UDC 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

DEVELOPMENT OF IDENTIFICATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION METHODS FOR DETERMINING CITALOPRAM SUITABLE FOR CHEMICAL AND TOXICOLOGICAL ANALYSIS

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

The conditions of citalopram identification by the Thin Layer Chromatography, sedimentary and colour reactions, UV-spectroscopy have been studied. The methods of citalopram quantitative determination with the help of UV-spectrophotometry and extraction photocolorimetry by the reaction with methyl orange have been developed.