

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

УДК 615.065:54.061/062:547.712.22:001.8

ІЗОЛЮВАННЯ ЦИТАЛОПРАМУ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ПІДКИСЛЕНОЮ ВОДОЮ ТА ПІДКИСЛЕНИМ ЕТАНОЛОМ

С.В.Баюрка

Національний фармацевтичний університет

Вивчено розрізняльну спроможність відносно циталопраму загальноприйнятих у судово-токсикологічному аналізі методів ізолювання лікарських речовин за О.О.Васильєвою, Стасом-Отто, В.П.Крамаренком, які дозволили виділити, відповідно, $21,8 \pm 2,5\%$, $9,8 \pm 1,4\%$, $15,5 \pm 1,5\%$ циталопраму. Виявляли циталопрам у біологічних екстрактах за допомогою кольорових реакцій, тонкошарової хроматографії та УФ-спектроскопії. Кількісний вміст препарату встановлювали екстракційно-спектрофотометричним методом за реакцією утворення іонного асоціату з кислотним азобарвником метиловим оранжевим.

Циталопрам — 1-[3-(диметиламіно)пропіл]-1-(4-фторофеніл)-1,3-дигідро-5-ізобензофуранкарбонітрилу гідробромід, сучасний антидепресант, який знайшов широке застосування в медичній практиці для лікування депресій різноманітної етіології [4, 5], а також для лікування хворих з алкогольною залежністю [1]. Серед селективних інгібіторів зворотнього захвату серотоніну циталопрам є найбільш токсичним при передозуванні [7] і неодноразово був причиною гострих та смертельних отруєнь [10, 12, 13, 14]. Таким чином, розробка методів хіміко-токсикологічного аналізу циталопраму в біологічних об'єктах є актуальною задачею.

В літературі містяться дані щодо аналізу циталопраму в біологічних рідинах (крові, сечі). Для ідентифікації зазначеного антидепресанта в отриманих екстрактах використовували методи газорідинної хроматографії [10], високоефективної рідинної хроматографії [6, 10, 11], сполучення рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією [9, 16], міцелярної електрокінетичної капілярної хроматографії [15]. Метод капілярного електрофорезу застосовано для кількісного аналізу циталопраму в грудному молоці [8]. Вищеперелічені методики характеризуються високою чутливістю та специфічністю, але потребують ретельної пробопідготовки (твердофазна екстракція [9, 11], рідиннофазна мікроекстракція [8]) та спеціального

коштовного обладнання, що робить їх малодоступними.

Запропоновано скринінгові системи для виявлення циталопраму за допомогою методу тонкошарової хроматографії [10] при хіміко-токсикологічних дослідженнях, вивчено світлопоглинання циталопраму в УФ-області спектра [10].

Дані по дослідженню біологічного матеріалу на вміст у ньому циталопраму в літературі відсутні.

Метою наших досліджень було встановлення розрізняльної спроможності відносно циталопраму загальноприйнятих у судово-токсикологічному аналізі методів ізолювання лікарських сполук з біологічного матеріалу [2, 3]: настоюванням з водою, підкисленою кислотою оксалатною (метод О.О.Васильєвої), настоюванням з етанолом, підкисленим кислотою оксалатною (метод Стаса-Отто), настоюванням азотовмісних органічних основ з водою, підкисленою кислотою сульфатною (метод В.П.Крамаренка). Виявлення та кількісне визначення циталопраму в отриманих екстрактах з біологічного матеріалу проводили за допомогою простих, доступних та ефективних для судово-токсикологічного аналізу методів: тонкошарової хроматографії (ТШХ), УФ-спектроскопії, кольорових реакцій, екстракційної спектрофотометрії [2, 3, 10].

Матеріали та методи

Брали 20 г подрібненої печінки людини, яка загинула від травми, вміщували у стакан, додавали 2 мл водного розчину циталопраму, який містив 2000 мкг препарату. Суміш ретельно перемішували і залишали на 24 год. Паралельно ставили "холості" дослід з біологічним матеріалом. Ізолювання циталопраму проводили водою та етанолом, підкисленими кислотою оксалатною, а також водою, підкисленою кислотою сульфатною, згідно з загальноприйнятими методиками [2].

Отримані хлороформні витяжки переносили до мірної колби на 50 мл, доводячи об'єм розчину до позначки хлороформом.

Екстракти з біологічного матеріалу містили значну кількість супутніх домішок, які потім видаляли за допомогою додаткової екстракційної очистки.

За даними, отриманими при вивченні екстракції циталопраму з водних розчинів органічними розчинниками, було встановлено, що з кислого середовища (рН 1-2) вказана речовина у найменшій мірі екстрагується діетиловим етером (ступінь одноразової екстракції складає близько 11,4%). Циталопрам екстрагується хлороформом як з кислого, так і з лужного середовища. Ступінь екстракції складає, відповідно, 24,4 та 47,5% (рН 2 та 3 відповідно) та 96-100% (рН 9-11). Таким чином, для видалення співекстрактивних речовин з біологічного матеріалу при рН 1-2 найбільш придатним екстрагентом є діетиловий етер. При ізолюванні циталопраму з біологічного матеріалу його екстрагували хлороформом з водних (або водно-етанольних) витяжок з кислого та лужного середовища.

Для видалення домішок екстракційним методом хлороформні екстракти, отримані з кислого та лужного середовища, перенесли до фарфорової чашки, випаровували їх на водяній бані при температурі не вище, 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, перенесли до ділильної лійки і кислий розчин збовтували з 20 мл діетилового етеру, відкидаючи фазу органічного розчинника. Після цього кислий водний залишок підлугували 20% розчином натрію гідроксиду до рН 9-11 і тричі екстрагували циталопрам 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.

При проведенні кількісного визначення циталопраму в очищених таким чином "кислому" та "лужному" екстрактах екстракційно-спектрофотометричним методом з метиловим оранжевим оптична густина у розчинах, отриманих для "холостих" дослідів, знаходилась у межах 0,012-0,020 відповідно.

При виявленні циталопраму у витяжках за допомогою кольорових реакцій використовували кислоту сульфатну концентровану (жовте забарвлення), реактиви Маркі (жовтувато-зелене забарвлення, що переходило у коричневе), Манделіна (зелене забарвлення), Фреде (жовте забарвлення), Лібермана (лимонно-жовте забарвлення, що переходило у коричневе), Ердмана (світло-коричневе забарвлення); чутливість вказаних реакцій становила 3,0-6,0 мкг у пробі. Паралельно проводили контрольні досліді зі стандартним розчином циталопраму в хлороформі (10 мкг/мл) та витяжкою з "холостого" досліді.

Виявлення циталопраму в екстрактах за методом ТШХ проводили з використанням хроматографічних пластинок Сорбфіл (сілікагель ПТСХ-П-А, фракція 5-17 мкм, розмір 10×10 см) та Merck (Silica gel 60 F254, розмір 10×20 см). Від 10 до 25 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" циталопраму (10 мкг у пробі). У третю точку наносили 5 мл випареної витяжки, одержаної у "холостому" досліді. Спочатку хроматограми розвивали у рухомій фазі хлороформ для відокремлення домішок з біологічного матеріалу від препарату (домішки мігрували з фронтом розчинника до лінії фінішу, а циталопрам залишався на лінії старту). Після ТШХ-очистки екстракти досліджували у рухомих фазах: метанол-амонію гідроксиду 25% розчин (100:1,5) та толуен-ацетон-етанол-амонію гідроксиду 25% розчин (45:45:7,5:2,5). Потім пластинки висушували на повітрі і проявляли за допомогою реактиву Драгендорфа у модифікації за Мунье (жовтогарячий колір плям циталопраму на жовтому фоні; чутливість виявлення циталопраму на вказаних пластинках складала 0,5-1,0 мкг препарату у пробі, відповідно). Плями циталопраму, виділеного з біологічного матеріалу, та циталопраму-стандарту за величинами R_f співпадали та складали у рухомих фазах: метанол-амонію гідроксиду 25% розчин (100:1,5) $0,50 \pm 0,02$ (для пластинок Сорбфіл) та $0,38 \pm 0,02$ (для пластинок Merck), толуен-ацетон-етанол-амонію гідроксиду 25% розчин (45:45:7,5:2,5) $0,70 \pm 0,02$ (для пластинок Сорбфіл) та $0,59 \pm 0,02$ (для пластинок Merck). Витяжки з "холостих" дослідів не давали плям з вказаними значеннями R_f .

Для виявлення циталопраму УФ-спектроскопічним методом використовували елюати з хроматограм. Для цього з не проявленої смуги хроматограми на рівні, що відповідав місцю знаходження плями "свідка" циталопраму, знімали шар сорбенту, який двічі збовтували з метанолом та фільтрували. Ступінь елюювання циталопраму при цьому становив $99,0 \pm 1,0\%$. Отриманий елюат випаровували, сухий залишок розчиняли в 4 мл кислоти хлоридної 0,1 М розчині. Як розчин порівняння використовували кислоту хлоридну 0,1 М розчин. УФ-спектр елюату був аналогічним спектру стандартного розчину циталопраму в кислоті хлоридній 0,1 М розчині та мав п'ять смуг поглинання при довжинах хвиль: 206 ± 2 , 239 ± 2 , 270 ± 2 , 276 ± 2 та 285 ± 2 нм.

Для кількісного визначення циталопраму в витяжках використовували екстракційну спектрофотометрію в видимій області з метиловим оранжевим. Вміст препарату в екстрактах розраховували за допомогою рівняння $A = 0,00554 \cdot C + 0,02$ ($r = 0,99945$; $S^2 = 1,5 \cdot 10^{-4}$).

Градувальну залежність встановлювали з використанням стандартного розчину циталопраму в хлороформі, що містив 200 мкг препарату в 1 мл. У ділильні лійки вносили по 5 мл ацетатного буферного розчину з рН 4,6, по 5 мл метилового

Таблиця

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

Метод ізолювання	Додано циталопраму до 20 г печінки, мкг	Виділено циталопраму		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
Настоювання з водою, підкисленою кислотою оксалатною (метод О.О.Васильєвої)	2000	430,0	21,5	$\bar{X} = 21,8$ $S = 2,0$ $S_{\bar{X}} = 0,9$ $\Delta X = 2,5$ $\varepsilon = 11,4$ $\bar{X} \pm \Delta X = 21,8 \pm 2,5$
		396,0	19,8	
		472,0	23,6	
		486,0	24,3	
		402,0	20,1	
Настоювання з етанолом, підкисленим кислотою оксалатною (метод Стаса-Отто)	2000	194,0	9,7	$\bar{X} = 9,8$ $S = 1,1$ $S_{\bar{X}} = 0,5$ $\Delta X = 1,4$ $\varepsilon = 14,4$ $\bar{X} \pm \Delta X = 9,8 \pm 1,4$
		164,0	8,2	
		226,0	11,3	
		188,0	9,4	
		208,0	10,4	
Настоювання з водою, підкисленою кислотою сульфатною (метод В.П.Крамаренка)	2000	312,0	15,6	$\bar{X} = 15,5$ $S = 1,3$ $S_{\bar{X}} = 0,6$ $\Delta X = 1,6$ $\varepsilon = 10,0$ $\bar{X} \pm \Delta X = 15,5 \pm 1,6$
		302,0	15,1	
		270,0	13,5	
		326,0	16,3	
		336,0	16,8	

оранжевого 0,05% розчину і додавали 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 та додавали хлороформ до загального об'єму 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 кислоти сульфатної 1% розчину в абсолютному етанолі.

Оптичну густина отриманих розчинів, забарвлених у червоний колір, вимірювали за допомогою УФ-спектрофотометра СФ-46 (світлофільтр з $\lambda_{\max} = 540 \pm 2$ 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 200 мкг циталопраму в 14 мл кінцевого об'єму. Відносна помилка кількісного визначення не перевищувала 2,4%.

Результати та їх обговорення

При виділенні циталопраму з біологічного матеріалу з використанням вищенаведених розчинників було встановлено, що отримані біологічні екстракти вміщували значну кількість домішок, які заважали подальшому виявленню та кількісному визначенню досліджуваного антидепресанта. Так, результати вимірювань показників оптичної густини отриманих розчинів екстракційно-спектрофотометричним методом з метиловим оран-

жевим для екстрактів з "холостих" дослідів становили 0,055-0,10 (за методом О.О.Васильєвої); 0,075-0,10 (за методом Стаса-Отто); 0,08-0,11 (за методом В.П.Крамаренка).

Для видалення супутніх домішок проводили додаткову екстракційну очистку витяжок за методикою, наведеною вище. Результати вимірювань показників оптичної густини екстракційно-спектрофотометричним методом у розчинах, отриманих для "холостих" дослідів після очистки, становили 0,015-0,032 (за методом О.О.Васильєвої), 0,024-0,045 (за методом Стаса-Отто), 0,030-0,045 (за методом В.П.Крамаренка) в області спектра, що відповідала максимуму світлопоглинання забарвлених розчинів іонних асоціатів циталопраму з метиловим оранжевим.

Отримані таким чином очищені екстракти використовували для виявлення в них циталопраму за методами ТШХ та кольорових реакцій. Ідентифікацію препарату за УФ-спектрами проводили після додаткової очистки екстрактів методом ТШХ, досліджуючи елюати з хроматограм.

Результати екстракційно-спектрофотометричного визначення циталопраму, виділеного з печінки за вищеназваними методами (у сумі з "кислотою" та "лужною" витяжок), наведені в таблиці.

Як видно, за допомогою загальних методів ізолювання з печінки можна виділити, відповідно, 21,8 \pm 2,5%, 9,8 \pm 1,4%, 15,5 \pm 1,5% циталопраму.

ВИСНОВКИ

Вивчено розрізняльну спроможність відносно циталопраму загальноприйнятих у судово-токсич-

кологічному аналізі методів ізолювання за О.О.Васильєвою, Стасом-Отто, В.П.Крамаренком, які дозволили виділити, відповідно, $21,8\pm 2,5\%$, $9,8\pm 1,4\%$, $15,5\pm 1,5\%$ циталопраму.

Одержані результати можуть бути використані для судово-токсикологічних досліджень біологічного матеріалу при смертельних отруєннях циталопрамом.

ЛІТЕРАТУРА

1. Агібалова Т.В., Захаров М.В., Лобачева А.С. // *Психиатрия и психофармакотерапия*. — 2004. — №4. — С. 156-158.
2. Вергейчик Т.Х. *Токсикологическая химия*. — М.: МЕДпресс-информ, 2009. — 400 с.
3. Крамаренко В.П. *Токсикологічна хімія*. — К.: Вища шк., 1995. — 423 с.
4. Крылов В.И. // *ФАРМиндекс-Практик*. — 2003. — Вып. 5. — С. 22-32.
5. Машковский М.Д. *Лекарственные средства: 15-е изд.* — М.: ООО "Изд-во Новая Волна", 2006. — С. 106.
6. Bartolincic A., Sporec A., Druskovic V. et al. / *Chem. Anal.* — 2006. — Vol. 51, №4. — P. 509-526.
7. Bateman N.D. *Antidepressants: Poisonous substances*. — Amsterdam: Elsevier, 2007. — P. 587-589.
8. Bjorhovde A., Halvorsen G.T., Rasmussen K.E. et al. // *Anal. Chim. Acta.* — 2003. — Vol. 491, №2. — P. 155-161.
9. Castro A., Fernandez M.d.M.R., Laloup M. et al. // *J. Chromatogr. A.* — 2007. — Vol. 1160, №1. — P. 3-12.
10. *Clark's analysis of Drugs and Poisons: Third edition [Электронный ресурс] / Laurent Y. Galichet.* — 80 Min / 700 MB. — Pharmaceutical Press, 2005. — 1 электрон. опт. диск (CD-ROM); 12 см. — Систем. вимоги: Pentium; 128 Mb RAM; CD-ROM Windows XP / Vista.
11. Frahnet Ch., Luise R.M., Grasmader K. // *J. Chromatogr. B.* — 2003. — Vol. 794, №1. — P. 35-47.
12. Isbister G.K., Bowe S.J., Dawson A. et al. // *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* — 2004. — №42. — P. 277-285.
13. Kelly C.K., Dhaun N., Laing W.J. et al. // *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* — 2004. — №42. — P. 67-71.
14. Kelly C.K., Upex A., Spencer E.P. et al. // *Hum. Exp. Toxicol.* — 2003. — №22. — P. 103-105.
15. Labat L., Deveaux M., Dallet P. et al. // *J. Chromatogr. B.* — 2002. — Vol. 773, №1. — P. 17-23.
16. Thieme D., Sachs H. // *Anal. Chim. Acta.* — 2003. — Vol. 492. — P. 171-186.

УДК 615.065:54.061/062:547.712.22:001.8

ИЗОЛИРОВАНИЕ ЦИТАЛОПРАМА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ПОДКИСЛЕННОЙ ВОДОЙ И ПОДКИСЛЕННЫМ ЭТАНОЛОМ

С.В.Баярка

Изучена разрешающая способность относительно циталопрама общепринятых в судебно-токсикологическом анализе методов изолирования лекарственных веществ А.А.Васильевой, Стаса-Отто, В.Ф.Крамаренко, которые позволили выделить, соответственно, $21,8\pm 2,5\%$, $9,8\pm 1,4\%$, $15,5\pm 1,5\%$ циталопрама. Обнаруживали циталопрам в биологических экстрактах с помощью цветных реакций, тонкослойной хроматографии и УФ-спектроскопии. Количественное содержание препарата устанавливали экстракционно-спектрофотометрическим методом по реакции образования ионного ассоциата с кислотным азокрасителем метиловым оранжевым.

UDC 615.065:54.061/062:547.712.22:001.8

ISOLATION OF CITALOPRAM FROM THE BIOLOGICAL MATERIAL BY ACIDIFIED WATER AND ACIDIFIED ETHANOL

S.V.Bayurka

Resolution of the generally accepted in forensic-toxicological analysis isolation methods of medicines has been studied regarding to citalopram by O.O.Vasilyeva, Stas-Otto, V.Ph.Kramarenko methods, which allowed to separate $21.8\pm 2.5\%$, $9.8\pm 1.4\%$, $15.5\pm 1.5\%$ citalopram, respectively. Citalopram was detected in the biological extracts with the help of colour reactions, thin layer chromatography and UV-spectroscopy. The drug assay was performed by the extraction-spectrophotometry method by the reaction of formation of ionic associate with methyl orange, the acidic azodye.