

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

УДК 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

## ІЗОЛЮВАННЯ ФЛУВОКСАМІНУ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ЗА ДОПОМОГОЮ ХЛОРОФОРМУ

С.В.Баюрка

Національний фармацевтичний університет

**Встановлено ефективність відносно антидепресанта флувоксаміну методу ізолювання лікарських речовин елююванням їх хлороформом з біологічної тканини, гомогенізованої розтиранням з натрію сульфатом безводним, який дозволив виділити  $19,3 \pm 2,1\%$  зазначеного антидепресанта. Виявляли флувоксамін у біологічних екстрактах за допомогою кольорової реакції, тонкошарової хроматографії та УФ-спектроскопії. Кількісний вміст препарату встановлювали екстракційно-спектрофотометричним методом за реакцією утворення іонного асоціату з кислотним азобарвником метиловим оранжевим.**

Останнім часом отруєння препаратами антидепресивної дії посідають одне з перших місць серед отруєнь лікарськими речовинами [10, 13, 16, 18]. Одним з сучасних антидепресантів, який знайшов широке застосування в медичній практиці для лікування депресій різноманітної етіології [8, 9], є флувоксамін — ((E)-5-метокси-1-[4-(трифторметил)феніл]-1-пентанон-O-(2-аміноетил)оксиму малеат). Препарат має досить високу токсичність і згідно з літературними даними [11, 15, 17, 20, 21, 23] неодноразово був причиною гострих та смертельних отруєнь.

Таким чином, розробка методів судово-токсикологічного аналізу флувоксаміну в біологічних об'єктах є актуальною задачею.

В літературі містяться дані щодо методів хіміко-токсикологічного аналізу флувоксаміну в біологічних рідинах за допомогою газо-рідинної та високоефективної рідинної хроматографії [15], капілярного електрофорезу [12], сполучення рідинної хроматографії з мас-спектрометрією [14, 22]. Відомості про дослідження біологічного матеріалу на вміст флувоксаміну в літературі відсутні.

Згідно з даними наших попередніх досліджень [1, 2, 3] загальноприйняті у хіміко-токсикологічному аналізі методи ізолювання лікарських речовин за допомогою підкисленої води або підкисленого етанолу [7] характеризуються низькою розрізняльною спроможністю відносно поліциклічних антидепресантів. Невисока ефективність цих

методів, вірогідно, обумовлена високою ліпофільністю антидепресантів, про що свідчать значні величини їх коефіцієнтів розподілу ( $V_d$ ), наприклад, для амітріптиліну — 20 л/кг [7, 19], флуоксетину — 27 л/кг [15], флувоксаміну — 25 л/кг [15].

У зв'язку з цим великий інтерес по відношенню до флувоксаміну становить метод ізолювання лікарських речовин, заснований на елююванні токсичної речовини ліпофільним розчинником хлороформом з наважки біологічного об'єкта, гомогенізованого за допомогою його розтирання з натрію сульфатом безводним. Цей метод впроваджено в практику хіміко-токсикологічного аналізу лікарських речовин різних фармакологічних груп [5, 6].

Виявлення та кількісне визначення флувоксаміну в отриманих екстрактах з біологічного матеріалу проводили за допомогою розроблених нами раніше методів: хімічного, тонкошарової хроматографії (ТШХ), УФ-спектроскопії, екстракційної спектрофотометрії у видимій області [4].

### Матеріали та методи

До проб печінки (5 г) людини, яка загинула від травми, додавали водні розчини флувоксаміну, що містили 500 мкг препарату. Об'єкти залишали на добу при кімнатній температурі, а потім виділяли флувоксамін 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'єкту завтовшки до 2 см. Кран закривали і над колонкою встановлювали дільницу лійку з хлороформом (100 мл). Через колонку пропускали хлороформ зі швидкістю 60–80 крапель за хвилину. Елюати збирали у порцелянові чашки і випарювали на водяній бані при температурі не вище, ніж 40°C до видалення органічного розчинника.

Елюати, отримані таким чином, містили певну кількість супутніх домішок, які видаляли за допомогою додаткової екстракційної очистки.

За даними, отриманими нами при вивченні екстракції флувоксаміну з водних розчинів органічними розчинниками, було встановлено, що з кислого середовища (рН 1-2) вказана речовина у найменшій мірі екстрагується хлороформом (ступінь одноразової екстракції складає 13%). Найбільша кількість флувоксаміну екстрагується діетиловим етером з лужного середовища при рН 8-9 (ступінь екстракції складає близько 98%).

Видалення домішок проводили екстракційним методом. Для цього хлороформні екстракти, отримані з кислого та лужного середовища, переносили 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, переносили до ділильної лійки і кислий розчин збовтували з 15 мл хлороформу, відкидаючи фазу органічного розчинника. Після цього кислий водний залишок підлуговували 20% розчином натрію гідроксиду до pH 8-9 і тричі екстрагували флувоксамін діетиловим етером по 10 мл кожного разу. Органічні екстракти фільтрували через фільтр з 0,5 г безводного натрію сульфату у мірну колбу об'ємом 50 мл і доводили до позначки етером.

Паралельно проводили "холості" досліди для отримання розчинів порівняння.

### Результати та їх обговорення

При розробці методів аналізу флувоксаміну в біологічному матеріалі було встановлено, що після ізолявання зазначеного препарату за допомогою елюювання хлороформом отримані біологічні екстракти вміщували велику кількість домішок, які заважали подальшому виявленню та кількісному визначенню досліджуваної лікарської речовини. Так, результати вимірювань показників оптичної густини, отримані екстракційно-спектрофотометричним методом з метиловим оранжевим для екстрактів з "холостих" дослідів за наведеним вище методом ізолявання, становили 0,26-0,35. Після додаткового екстракційного очищення, яке проводили за наведеною вище методикою, оптична густина екстрактів не перевищувала 0,035-0,048 в області спектра, що відповідала максимуму світлопоглинання забарвлених розчинів іонних асоціатів флувоксаміну з метиловим оранжевим.

Отримані таким чином очищені екстракти використовували для виявлення в них флувоксаміну методом ТШХ та кольоровими реакціями. Ідентифікацію препарату за УФ-спектрами проводили тільки після додаткового очищення екстрактів методом ТШХ, аналізуючи елюати з хроматограм.

Для флувоксаміну характерна кольорова реакція з реагентом Лібермана (брудно-фіолетове забарвлення, яке переходить у сіре; чутливість — 5,0 мкг препарату в пробі). Паралельно проводили контрольні досліди зі стандартним розчином флу-

воксаміну в хлороформі (10 мкг/мл) та витяжкою з "холостого" досліду.

Виявлення флувоксаміну в екстрактах методом ТШХ проводили з використанням хроматографічних пластинок Сорбфіл (силікагель ПТСХ-П-А, фракція 5-17 мкм, розмір 10×10 см) та Merck (Silica gel 60 F254, розмір 10×20 см). Від 5 до 25 мл етерної 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" флувоксаміну (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 від препарату (домішки переважно мігрували з фронтом розчинника до лінії фінішу, а флувоксамін залишався на лінії старту). Після ТШХ-очистки екстракти досліджували у рухомих фазах: метанол — амоній гідроксид 25% розчин (100:1,5) та толуен-ацетон-етанол-амонію гідроксиду 25% розчин (45:45:7,5:2,5). Після розвитку хроматограм пластинки висушували на повітрі і проявляли за допомогою реактива Драгендорфа у модифікації за Мунье (жовтогарячий колір плям флувоксаміну на жовтому фоні; чутливість виявлення флувоксаміну на вказаних пластинках складала 2,0-4,0 мкг препарату у пробі, відповідно).

Плями флувоксаміну, виділеного з біологічних рідин, та флувоксаміну-стандарту за величинами Rf співпадали та складали у рухомих фазах: метанол — амонію гідроксиду 25% розчин (100:1,5) 0,55±0,02 (для пластинок Сорбфіл) та 0,45±0,02 (для пластинок Merck), толуен-ацетон-етанол-амонію гідроксиду 25% розчин (45:45:7,5:2,5) 0,72±0,02 (для пластинок Сорбфіл) та 0,65±0,02 (для пластинок Merck). Витяжки з "холостих" дослідів не давали плям з вказаними значеннями Rf.

Для виявлення флувоксаміну УФ-спектроскопічним методом використовували елюати з хроматограм на рівні, що відповідав місцю знаходження плями "свідка" флувоксаміну, знімали шар сорбенту, який двічі збовтували з метанолом та фільтрували. Ступінь елюювання флувоксаміну при цьому становив 98,5±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 флувоксаміну в кислоті хлоридні 0,1 М розчині та мав смугу поглинання при довжині хвилі 246±2 нм.

Для кількісного визначення флувоксаміну в витяжках використовували екстракційну спектрофотометрію з метиловим оранжевим. Вміст препарату в екстрактах розраховували за допомогою рівняння  $A = 0,00421C + 0,01$  ( $r = 0,99985$ ;  $S^2 = 3 \cdot 10^{-5}$ ).

Таблиця

Результати екстракційно-спектрофотометричного визначення флувоксаміну, виділеного з печінки, за допомогою хлороформу (середнє з п'яти визначень)

Додано флувоксаміну до 5 г печінки, мкг	Виділено флувоксаміну		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
500	99,0	19,8	
500	87,0	17,4	
500	106,5	21,3	
500	102,5	20,5	$\bar{X} = 19,3$ $S = 1,7$ $S_{\bar{X}} = 0,8$ $\Delta X = 2,1$ $\Sigma = 11,0$ $\bar{X} \pm \Delta X = 19,3 \pm 2,1$
500	88,5	17,7	

Градуюальну залежність встановлювали з використанням стандартного розчину флувоксаміну в хлороформі, що містив 300 мкг препарату в 1 мл. В ділильні лійки вносили по 5 мл ацетатного буферного розчину з pH 4,6, по 5 мл метилового оранжевого 0,05% розчину і додавали по 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 та 0,8 мл стандартного розчину флувоксаміну та додавали хлороформ до загального об'єму 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 (блізько 1 мл), до яких додавали по 2 мл кислоти сульфатної 1% розчину в абсолютному етанолі.

Оптичну густину отриманих розчинів, забарвлених у червоний колір, вимірювали за допомо-

гою спектрофотометра СФ-46 (світлофільтр з  $\lambda_{max} = 540 \pm 2$  нм; кювета з товщиною шару рідини 10 мм). Як розчини порівняння використовували "холості" досліди (метиловий оранжевий не екстрагується хлороформом в інтервалі pH від 3 до 7).

Світлопоглинання забарвлених розчинів підлягало закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрації від 15 до 240 мкг флувоксаміну в 14 мл кінцевого об'єму. Відносна помилка кількісного визначення не перевищувала 2,6%.

Результати екстракційно-спектрофотометричного визначення флувоксаміну, виділеного з печінки за допомогою елюювання хлороформом, наведені в таблиці. Як видно, за допомогою запропонованої методики з печінки можна виділити  $19,3 \pm 2,1\%$  зазначеного антидепресанта.

### ВИСНОВКИ

1. Встановлено ефективність відносно антидепресанта флувоксаміну методу ізолювання лікарських речовин елююванням їх хлороформом з біологічної тканини, гомогенізованої за допомогою розтирання з натрієм сульфатом безводним, який дозволив виділити  $19,3 \pm 2,1\%$  зазначеного антидепресанта.

2. Показана можливість використання кольорової реакції, тонкошарової хроматографії, УФ-спектроскопії та екстракційної фотоелектроколориметрії для виявлення та кількісного визначення флувоксаміну, виділеного з біологічного матеріалу зазначеним методом.

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

### ЛІТЕРАТУРА

1. Баюрка С.В., Карпушина С.А., Бондар В.С. та ін. // Клінічна фармація. — 2009. — Т. 13, №2. — С. 30-33.
2. Баюрка С.В., Карпушина С.А., Бондар В.С. // Вісник фармації. — 2009. — №3 (59). — С. 23-26.
3. Баюрка С.В., Карпушина С.А., Степаненко В.І. // Вісник фармації. — 2010. — №1 (61). — С. 32-35.
4. Баюрка С.В., Карпушина С.А., Степаненко В.І. та ін. // Запорізький мед. журн. — 2010. — Т. 12, №4. — С. 60-63.
5. Болотов В.В., Клименко Л.Ю. // Вісник фармації. — 2006. — №3 (47). — С. 26-30.
6. Болотов В.В., Мороз В.П., Зареченський М.А. // Вісник фармації. — 1999. — №1 (19). — С. 45-48.
7. Вергейчик Т.Х. Токсикологическая химия. — М.: МЕДпресс-информ, 2009. — 400 с.
8. Крилов В.И. // ФАРМіндекс-Практик. — 2003. — Вып. 5 — С. 22-32.
9. Машковский М.Д. Лекарственные средства: 15-е изд. — М.: ООО "Изд-во Новая Волна", 2006. — С. 105.
10. Элленхорн М.Дж. Медицинская токсикология: Диагностика и лечение отравлений у человека. В 2-х т. / Пер. с англ. — М.: Медицина, 2003. — Т. 1. — С. 647-697.
11. Bateman N.D. Antidepressants: Poisonous substances. — Amsterdam: Elsevier, 2007. — P. 587-589.
12. Bjorhovde A., Halvorsen G.T., Rasmussen K.E. et al. // Anal. Chim. Acta. — 2003. — Vol. 491, №2. — P. 155-161.
13. Carson H.J. // Leg. Med. — 2007. — Vol. XXX. — P. 1-4.
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<sup>rd</sup> 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. *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.*
17. *Isbister G.K., Bowe S.J., Dawson A. et al. // J. Toxicol. Clin. Toxicol. — 2004. — №42. — P. 277-285.*
18. *Okulicz-Kozaryn K., Borucka A., Koson K. // Alk. i narkomania. — 2006. — Vol. 19, №1. — C. 35-52.*
19. *Poisoning & Drug Overdose. 4-th ed. / Ed. K.R.Olson. — Zange Medical Books, Mc Graw-Hill, 2004. — P. 88-93.*
20. *Randall C. Baselt. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. — California, Foster City: Chemical Toxicology Institute, 2000. — P. 476-478.*
21. *Reeves R.R., Mack J.E., Beddingfield J.J. // Ann. Pharmacother. — 2002. — Vol. 36. — P. 440-443.*
22. *Shinozuka T., Terada M., Tanaka E. // Forens. Sci. Int. — 2006. — Vol. 162. — P. 108-112.*
23. *Sim F.H., Massabki R.A. // Can. J. Psych. — 2000. — Vol. 45. — P. 762-763.*

УДК 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

**ИЗОЛИРОВАНИЕ ФЛУВОКСАМИНА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА С ПОМОЩЬЮ ХЛОРОФОРМА**  
С.В.Баюрка

Установлена эффективность по отношению к антидепрессанту флуvoxамину метода изолирования лекарственных веществ элюированием хлороформом из биологической ткани, гомогенизированной растиранием с натрия сульфатом безводным, который позволил выделить  $19,3\pm2,1\%$  указанного антидепрессанта. Обнаруживали флу voxамин в биологических экстрактах с помощью цветной реакции, 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 FLUVOXAMINE FROM BIOLOGICAL MATERIAL BY CHLOROFORM**  
S.V.Bayurka

Efficiency of the isolation method of medicinal substances in relation to fluvoxamine, the antidepressant, by its elution with chloroform from the biological tissue homogenized by grinding with anhydrous sodium sulphate has been determined. The method allowed to separate  $19.3\pm2.1\%$  of the antidepressant. Fluvoxamine was detected in the biological extracts with the help of the colour reaction, thin layer chromatography, UV-spectroscopy. The drug's assay was performed by the extraction-spectrophotometry method by the reaction of the ionic associate formation with methyl orange, the acidic azodye.