

АНАЛІТИЧНА ДІАГНОСТИКА ОТРУЄНЬ ФЛУВОКСАМІНОМ

С.В.Баюрка, С.А.Карпушина, Т.О.Томаровська

Національний фармацевтичний університет

Ключові слова: флувоксамін; тонкошарова хроматографія; кольорові реакції; УФ-спектроскопія; біологічні рідини; екстракційна спектрофотометрія у видимій області

Розроблено ефективні методики рідинно-рідинної екстракції флувоксаміну з біологічних рідин дієтичним етером із лужного середовища при рН 8-9. Ідентифікацію флувоксаміну в отриманих біологічних екстрактах проводили за допомогою кольорової реакції з реактивом Лібермана, тонкошарової хроматографії з використанням рухомих фаз: метанол-амонію гідроксиду 25% розчин (100:1,5) та толуен-ацетон-етанол-амонію гідроксиду 25% розчин (45:45:7,5:2,5). Значення R_f становили $0,55 \pm 0,02$ (для пластинок Сорбфіл), $0,45 \pm 0,02$ (для пластинок Merck) та $0,72 \pm 0,02$ (для пластинок Сорбфіл), $0,65 \pm 0,02$ (для пластинок Merck), відповідно. Після елювання флувоксаміну з фореграм метанолом проводили УФ-спектроскопічне виявлення препарату (λ_{\max} 246 \pm 2 нм). Кількісний вміст флувоксаміну в екстрактах встановлювали за допомогою екстракційної спектрофотометрії у видимій області за реакцією утворення іонного асоціату з кислотним азобарвником метиловим оранжевим. Розроблені методики дозволили виділити з сечі 63,4 \pm 2,8% флувоксаміну, з плазми крові — 19,8 \pm 1,6%, а з осаду крові після його відокремлення від плазми — ще додатково 14,6 \pm 1,5% зазначеного антидепресанта.

Діагностика отруєнь лікарськими речовинами у багатьох випадках становить значні труднощі у зв'язку з тим, що клінічна картина інтоксикації переважно є нехарактерною. Аналітична діагностика, метою якої є екстренне визначення отруйної речовини у біологічних середовищах людини, часто має вирішальне значення для встановлення або підтвердження діагнозу отруєння та вибору оптимальних методів детоксикації, в тому числі специфічної антидотної терапії [2, 5, 16].

Останнім часом отруєння препаратами антидепресивної дії посідають одне з провідних місць серед отруєнь лікарськими речовинами [6, 9, 13, 15]. Згідно зі статистичними даними [12, 13] приблизно 121 мільйон людей у світі вживає антидепресанти з приводу хронічних та рецидив-

них розладів психічного стану, які є потенційною причиною суїцидальної поведінки.

Флувоксамін ((Е)-5-Метокси-1-[4-(трифторометил)феніл]-1-пентанон-О-(2-аміноетил)оксиму малеат) — новий антидепресант, який за механізмом фармакологічної дії належить до селективних інгібіторів зворотного захвату серотоніну (СІЗЗС). Широке застосування його в сучасній медичній практиці [3, 4] зумовило те, що вказаний антидепресант неодноразово був причиною гострих та смертельних отруєнь [7, 11, 13, 17, 16, 19].

Токсична концентрація флувоксаміну в крові становить 1400 мкг/л [11], період напіввиведення ($t_{1/2}$) — 17-22 год. У вигляді нативної речовини з сечею виводиться близько 4% від дози, яка надійшла до організму. Терапевтична концентрація флувоксамі-

ну в сироватці знаходиться в межах 50-250 мкг/л [11].

Для аналізу флувоксаміну в біологічних рідинах запропоновано методи газорідинної та високо-ефективної рідинної хроматографії [11]. Опрацьовано також високочутливі методики визначення зазначеного антидепресанта за допомогою сполучення рідинної хроматографії з мас-спектрометрією (РХ-МС) [18], рідинної хроматографії з танDEMною мас-спектрометрією (РХ-МС/МС) [10], нижні межі визначення становили, відповідно, 0,1 мкг/мл та 10 мкг/мл. Метод капілярного електрофорезу застосовано для кількісного аналізу флувоксаміну в грудному молоці; градувальний графік був лінійним у межах концентрацій від 50 до 500 нг/мл [8]. Перелічені вище методи потребують спеціального коштовного обладнання, що робить їх малодоступними.

Метою наших досліджень була розробка методики виділення

флувоксаміну з крові та сечі методом рідинно-рідинної екстракції з подальшим виявленням та кількісним визначенням антидепресанту в отриманих екстрактах за допомогою розроблених нами раніше [1] методів: хімічного, тонкошарової хроматографії (ТШХ), УФ-спектроскопії, екстракційної спектrophотометрії у видимій області.

Матеріали та методи

Методика ізолювання флувоксаміну з сечі. До 50 мл сечі людини додавали 1 мл водного розчину флувоксаміну, що містив від 200 до 1000 мкг препарату, і залишали суміш на 24 год. Паралельно ставили “холості” досліді. Після цього до проб сечі додавали кислоту хлоридну 10% розчин до значення рН 1, а суміші збовтували з 25 мл хлороформу для відокремлення супутніх домішок з біологічної рідини. Шар органічного розчинника відкидали. Потім до підкисленої сечі додавали натрію гідроксиду 20% розчин до рН 8-9 і тричі екстрагували флувоксамін діетиловим етером по 15 мл кожного разу. Емульсії, якщо вони утворювались, руйнували центрифугуванням протягом 15 хв зі швидкістю 3000 об/хв. Центрифугат фільтрували через паперовий фільтр з 0,5 г безводного натрію сульфату у мірну колбу об'ємом 50 мл і доводили етером до позначки. Як розчини порівняння використовували екстракти, одержані у “холостих” дослідіах.

Методика ізолювання флувоксаміну з крові. До 10 мл донорської крові додавали по 1 мл водного розчину флувоксаміну, що містив від 100 до 500 мкг препарату, перемішували і залишали на добу. Через добу до 10 мл модельної суміші флувоксаміну з кров'ю додавали 10 мл кислоти трихлорацетатної 10% розчин і перемішували. Після цього суміш центрифугували на протязі 15 хв зі швидкістю 3000 об/хв. Центрифугат зливали та однократно екстрагували домішки 10 мл хлороформу, фазу органічного розчинника відокремлювали та відкидали, а потім після підлогу-

вання водної фази до рН 8-9 натрію гідроксиду 20% розчином тричі екстрагували флувоксамін діетиловим етером по 10 мл кожного разу. Одержані “лужні” екстракти фільтрували через фільтр з 0,5 г безводного натрію сульфату у мірну колбу об'ємом 50 мл і доводили до позначки етером.

Враховуючи те, що ступінь ізолювання флувоксаміну з плазми крові був порівняно невисоким, ми досліджували окремо осад, який залишився після відокремлення надосадової рідини. Осад зі склянки для центрифугування зважували і переносили до порцелянової ступки, де його розтирали з потрібною кількістю безводного натрію сульфату до отримання однорідної сипкої маси, яку потім переносили до скляної колонки висотою 25 см та діаметром 1 см. Перед заповненням колонки в неї вміщували невеличкий ватний тампон для запобігання попадання розтертої маси у скляний краник. Легким постукуванням по колонці сипку масу ущільнювали. Над колонкою закріплювали ділильну лійку, що вміщувала 50 мл хлороформу, який пропускали через колонку зі швидкістю 60-80 крапель за хв. Отриману хлороформну витяжку випаровували у порцеляновій чашці досуха на водяній бані при температурі не вище 40°C. Отриманий екстракт містив значну кількість супутніх домішок з біологічної рідини, які заважали проведенню ідентифікації та кількісного визначення флувоксаміну в екстрактах. Так, при проведенні кількісного визначення флувоксаміну у витяжках екстракційно-спектрофотометричним 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 15 мл хлороформу, а суміш збовтували протягом 5 хв, після чого органічну фазу відокремлювали і відкидали. Потім кислу витяжку

підлогували натрію гідроксиду 20% розчином до рН 8-9 і тричі екстрагували флувоксаміну діетиловим етером по 10 мл кожного разу. Етерні екстракти фільтрували через паперовий фільтр, який містив 0,5 г безводного натрію сульфату, об'єднували і переносили до мірної колби об'ємом 50 мл та доводили до позначки вказаним розчинником.

Флувоксамін, виділений з сечі та крові, виявляли за допомогою кольорових реакцій, ТШХ та УФ-спектроскопії.

Для флувоксаміну характерна кольорова реакція з реактивом Лібермана (брудно-фіолетове забарвлення, яке переходить у сіре; чутливість — 5,0 мкг препарату у пробі). Паралельно проводили контрольні досліді зі стандартним розчином флувоксаміну у хлороформі (10 мкг/мл) та витяжкою з “холостого” дослідіа.

Виявлення флувоксаміну в екстрактах за методом ТШХ проводили з використанням хроматографічних пластинок Сорбфіл (силікагель ПТСХ-П-А, фракція 5-17 мкм, розмір 10x10 см) та Merck (Silica gel 60 F254, розмір 10x20 см). Від 5 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” флувоксаміну (10 мкг у пробі). У третю точку наносили 5 мл випареної витяжки, одержаної у “холостому” дослідіа. Спочатку хроматограми розвивали у рухомій фазі хлороформ для відокремлення домішок від препарату (домішки мігрували з фронтом розчинника до лінії фінішу, а флувоксамін 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 флувоксаміну на жовтому фоні; чутливість виявлення

Таблиця 1

Результати кількісного визначення флувоксаміну, виділеного з сечі, екстракційно-спектрофотометричним методом (середнє з п'яти визначень)

Додано флувоксаміну до 50 мл сечі, мкг	Виділено флувоксаміну		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
200	122,6	61,3	$\bar{X} = 63,4$ $S = 2,2$ $S_{\bar{X}} = 1,0$ $\Delta\bar{X} = 2,8$ $\varepsilon = 4,4$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 63,4 \pm 2,8$
300	195,0	65,0	
500	333,5	66,7	
700	436,8	62,4	
1000	620,0	62,0	

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 R_f співпадали та складали у рухомих фазах: метанол — амонію гідроксиду 25% розчин (100:1,5) $0,55 \pm 0,02$ (для пластинок Сорбфіл) та $0,45 \pm 0,02$ (для пластинок Мерек), толуен-ацетон-етанол-амонію гідроксиду 25% розчин (45:45:7,5:2,5) $0,72 \pm 0,02$ (для пластинок Сорбфіл) та $0,65 \pm 0,02$ (для пластинок Мерек). Витяжки з “холостих” дослідів не давали плям з вказаними значеннями R_f .

Для виявлення флувоксаміну УФ-спектроскопічним методом використовували елюати з хроматограм. Для цього з не проявленої смуги хроматограми на рівні, що відповідав місцю знаходження плями “свідка” флувоксаміну, знімали шар сорбенту, який двічі збовтували з метанолом та фільтрували. Ступінь елювання флувоксаміну при цьому становив $98,5 \pm 1,0\%$. 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 флувоксаміну в кислоті хлоридній 0,1 М розчині та мав смугу поглинання при довжині хвилі 246 ± 2 нм.

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

Градувальну залежність встановлювали з використанням стандартного розчину флувоксаміну у хлороформі, що містив 300 мкг препарату в 1 мл. У ділительні лійки вносили по 5 мл ацетатного буферного розчину з рН 4,6, по 5 мл метилового оранжевого 0,05% розчину, 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

Таблиця 2

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

Додано флувоксаміну до 10 мл крові, мкг	Виділено флувоксаміну		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
100	20,2	20,2	$\bar{X} = 19,8$ $S = 1,3$ $S_{\bar{X}} = 0,6$ $\Delta\bar{X} = 1,6$ $\varepsilon = 8,3$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 19,8 \pm 1,6$
200	35,2	17,6	
300	58,5	19,5	
400	84,0	21,0	
500	103,5	20,7	

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 густину отриманих розчинів, забарвлених у червоний колір, вимірювали за допомогою спектрофотометра СФ-46 (світлофільтр з $\lambda_{\max} = 540 \pm 2$ нм; кювета з товщиною шару рідини 10 мм). Як розчини порівняння використовували “холості” дослідів (метиловий оранжевий не екстрагується хлороформом в інтервалі рН від 3 до 7).

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

Результати та їх обговорення

Ізолювання флувоксаміну з біологічних рідин доцільно проводити діетиловим етером з лужного середовища при рН 8-9. Для видалення співекстрактивних речовин з біологічної рідини при рН 1-2 найбільш придатним екстрагентом є хлороформ. Так, 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 13,7%). Найбільша кількість флувоксаміну екстрагується діетиловим етером з лужного середовища при рН 8-9 (ступінь екстракції складає близько 98%).

У ході розробки методик виділення флувоксаміну з сечі та крові було встановлено необхідність попереднього видалення супутніх речовин з біологічних рідин, для чого білкові домішки осаджували додаванням кислоти

Таблиця 3

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

Додано флувоксаміну до 10 мл крові, мкг	Виділено флувоксаміну		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
100	13,7	13,7	$\bar{X} = 14,6$ $S = 1,2$ $S_{\bar{X}} = 0,5$ $\Delta X = 1,5$ $\varepsilon = 10,6$ $\bar{X} \pm \Delta X = 14,6 \pm 1,5$
200	25,8	12,9	
300	45,9	15,3	
400	60,4	15,1	
500	80,0	16,0	

хлоридної 10% розчину з наступним центрифугуванням (кров) та екстрагували залишки супутніх речовин хлороформом з кислого середовища (кров, сеча). У разі відсутності етапу очищення при ізолюванні флувоксаміну з біологічних рідин, особливо з крові, під час екстракції препарату органічними розчинниками з лужного середовища утворювались стійкі емульсії.

Для аналізу флувоксаміну у хлороформних екстрактах, одержаних з осаду крові, також було необхідне екстракційне очищення, яке проводили так, як описано вище. Оптична густина роз-

чинів, одержаних у "холостих" дослідах після екстракційного очищення, знаходилась у межах 0,015-0,020 в області спектра, що відповідало максимуму світлопоглинання забарвлених розчинів іонних асоціатів флувоксаміну з метиловим оранжевим.

Застосована нами кольорова реакція, методи ТШХ та УФ-спектроскопії (останній після додаткового хроматографічного очищення) виявилися досить чутливими для виявлення досліджених нами меж концентрацій флувоксаміну в біологічних рідинах.

Результати кількісного визначення флувоксаміну, виділеного з

сечі, а також з плазми крові та осаду крові після його відокремлення від плазми, наведені у табл. 1-3. Як видно, за допомогою запропонованої методики рідинно-рідинної екстракції з лужного середовища діетиловим етером з сечі можна виділити $63,4 \pm 2,8\%$ флувоксаміну, з плазми крові — $19,8 \pm 1,6\%$, а з осаду крові після його відокремлення від плазми ще додатково одержати $14,6 \pm 1,5\%$ зазначеного антидепресанта. Таким чином, аналіз осаду з крові на вміст у ньому флувоксаміну підвищує ступінь його ізолювання з зазначеної біологічної рідини.

ВИСНОВКИ

1. Розроблені ефективні методики рідинно-рідинної екстракції флувоксаміну з біологічних рідин діетиловим етером з лужного середовища дозволяють виділити з сечі $63,4 \pm 2,8\%$, з плазми крові — $19,8 \pm 1,6\%$ та з осаду крові після його відокремлення від плазми ще додатково одержати $14,6 \pm 1,5\%$ зазначеного антидепресанта.

2. Доведена можливість використання кольорової реакції, ТШХ, УФ-спектроскопії, екстракційної спектрофотометрії для виявлення та кількісного визначення флувоксаміну в одержаних біологічних екстрактах.

ЛІТЕРАТУРА

1. Баюрка С.В., Карпушина С.А., Степаненко В.І. та ін. //Запорожский мед. журн. — 2010. — Т. 12, №4. — С. 60-63.
2. Вергейчик Т.Х. Токсикологическая химия. — М.: МЕДпресс-информ, 2009. — 400 с.
3. Крылов В.И. //ФАРМиндекс-Практик. — 2003. — Вып. 5. — С. 22-32.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства: 15-е изд. — М.: ООО "Изд-во Новая Волна", 2006. — С. 106.
5. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов: Учеб. пособие для вузов / Под ред. Н.И.Калетиной. — М.: ГОЭТАР-Медиа, 2008. — 1016 с.
6. 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.
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. Carson H.J. //J. Leg. Med. — 2007. — Vol. XXX. — P. 1-4.
10. Castro A., Fernandez M.d.M.R., Laloup M. et al. //J. Chromatogr. A. — 2007. — Vol. 1160, №1. — P. 3-12.
11. Clark's analysis of Drugs and Poisons: Third edition [Електронний ресурс] / Laurent Y. Galichet. — 80 Min / 700 МВ. — Pharmaceutical Press, 2005. — 1 електрон. опм. диск (CD-ROM); 12 см. — Систем. вимоги: Pentium; 128 Mb RAM; CD-ROM Windows XP / Vista. — Назва з титул. екрану.

12. *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.
13. Isbister G.K., Bowe S.J., Dawson A. et. al. // *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* — 2004. — №42. — P. 277-285.
14. Jonsson A., Holmgren P., Ahlner J. // *Forens. Sci. Int.* — 2004. — Vol. 143. — P. 53-59.
15. Okulicz-Kozaryn K., Borucka A., Koson K. // *Alk. i Narkomania.* — 2006. — Vol. 19, №1. — С. 35-52.
16. Randall C. Baselt. *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man.* — California, Foster City: Chemical Toxicology Institute, 2000. — P. 476-478.
17. Reeves R.R., Mack J.E., Beddingfield J.J. // *Ann. Pharmacother.* — 2002. — Vol. 36. — P. 440-443.
18. Shinozuka T., Terada M., Tanaka E. // *Forens. Sci. Int.* — 2006. — Vol. 162. — P. 108-112.
19. Sim F.H., Massabki R.A. // *Can. J. Psych.* — 2000. — Vol. 45. — P. 762-763.

Адреса для листування: 61168, м. Харків,
вул. Блюхера, 4. Тел. (572) 67-91-92.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 03.12.2010 р.

Інформаційне повідомлення відділу фармакологічного нагляду ДП “Державний фармакологічний центр” МОЗ України

Про підозрювану побічну дію препарату, діючою речовиною якого є **лізиноприл** (Інгібітори ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ). Код АТС C09A A03)

Хворому Б. (44 роки) з діагнозом ГХ І ст. було призначено препарат, діючою речовиною якого є лізиноприл (перорально по 5 мг 1 раз на добу). Через 15-20 хвилин після третього прийому препарату, діючою речовиною якого є лізиноприл, у хворого виникли різке запаморочення, сильний головний біль, різка слабкість. Одночасно хворий приймав кардиплант, настойку валеріани. Після відміни препарату, діючою речовиною якого є лізиноприл, зазначені явища минули без наслідків.

Алергологічний анамнез не обтяжений. Будь-які незвичайні реакції на ліки або хімічні речовини в минулому невідомі.

Інформація надійшла від регіонального відділення м. Києва ДП “Державний фармакологічний центр” МОЗ України.

Про підозрювану побічну дію препарату, діючою речовиною якого є **апротинін** (Інгібітори протеїназ. Код АТС B02A B01)

Хворій П. (61 рік) з діагнозом загострення хронічного панкреатиту для зменшення активності ферментів підшлункової залози було призначено препарат, діючою речовиною якого є апротинін (внутрішньовенно, крапельно по 200 000 АтрОд 1 раз на добу). Одночасно пацієнтка приймала цефтриаксон, платифілін, спазмалгон, даларгін, церукал, но-шпу. Після першого введення препарату, діючою речовиною якого є апротинін, у хворої виникло запаморочення, задуха, артеріальний тиск знизився до 80/50 мм рт. ст. Препарат, діючою речовиною якого є апротинін, було відмінено. Реакцію купірували за допомогою адреналіну, преднізолону, дофаміну, мезатону, глюкози, фізіологічного розчину. Після вжитих заходів зазначені явища минули без наслідків.

Алергологічний анамнез не обтяжений. Будь-які незвичайні реакції на ліки або хімічні речовини в минулому невідомі.

Інформація надійшла від Луганського регіонального відділення ДП “Державний фармакологічний центр” МОЗ України.