

УДК: 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

С.В. Баюрка, С.А. Карпушина

Національний фармацевтичний університет

ІЗОЛЮВАННЯ ЦИТАЛОПРАМУ З БІОЛОГІЧНИХ РІДИН

АНОТАЦІЯ

Розроблено ефективні методики рідинно-рідинної екстракції циталопраму з біологічних рідин хлороформом з лужного середовища при рН 10-11, які дозволили виділити з сечі $78,1 \pm 4,5$ % циталопраму, з плазми крові – $33,7 \pm 1,8$ %, з осаду крові після його відокремлення від плазми – додатково $10,9 \pm 1,3$ % зазначеного антидепресанта.

Ключові слова: циталопрам, біологічні рідини, кольорові реакції, тонкошарова хроматографія, УФ-спектроскопія, екстракційна спектрофотометрія у видимій області.

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 [3, 6, 21].

Останнім часом отруєння препаратами антидепресивної дії посідають одне з провідних місць серед отруєнь лікарськими речовинами [7, 11, 15, 20].

Циталопрам – 1-[3-(диметиламіно)пропіл]-1-(4-фторфеніл)-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 [9] і неодноразово був причиною гострих та смертельних отруєнь [13, 16, 17, 19]. Таким чином, розробка методів хіміко-токсикологічного аналізу циталопраму в біологічних об'єктах є актуальною задачею.

В літературі містяться дані по аналізу циталопраму в біологічних рідинах (кров, сеча) за допомогою методів газо-рідинної хроматографії [13],

високоєфективної рідинної хроматографії [8, 13, 14], сполучення рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією [12, 22], міцелярної електрокінетичної капілярної хроматографії [18]. Метод капілярного електрофорезу застосовано для кількісного аналізу циталопраму в грудному молоці [10]. Вищеперелічені методики характеризуються високою чутливістю та специфічністю, але потребують ретельної пробопідготовки (твердофазна екстракція [12, 14], рідиннофазна мікроекстракція [10]) та спеціального коштовного обладнання, що робить їх малодоступними.

Метою наших досліджень було розроблення методики виділення циталопраму з крові та сечі методом рідинно-рідинної екстракції. Виявлення та кількісне визначення антидепресанту в отриманих екстрактах проводили за допомогою розроблених нами раніше методів аналізу циталопраму з використанням стандартних розчинів: тонкошарової хроматографії (ТШХ), УФ-спектроскопії, кольорових реакцій, екстракційної спектрофотометрії [2].

Матеріали та методи

Методика ізолювання циталопраму з сечі. До 50 мл сечі людини додавали 1 мл водного розчину циталопраму, що містив від 200 до 1000 мкг препарату і суміш залишали на 24 год. Паралельно ставили «холості» досліди. Після цього до проб сечі додавали кислоту хлоридну 10% розчин до значення рН 1 і суміші збовтували з 20 мл діетилового етеру для відокремлення супутніх домішок з біологічної рідини. Шар органічного розчинника відкидали. Потім до підкисленої сечі додавали натрій гідроксиду 20% розчин до рН 10-11 і тричі екстрагували циталопрам хлороформом по 15 мл кожного разу. Емульсії, якщо вони утворювались, руйнували центрифугуванням протягом 10 хв. зі швидкістю 3000 об/хв. Центрифугат фільтрували через паперовий фільтр з 0,5 г безводного натрій сульфату у мірну колбу об'ємом 50 мл і доводили хлороформом до позначки. Як розчини порівняння використовували екстракти, одержані у «холостих» дослідах.

Методика ізолювання циталопраму з крові. До 10 мл донорської крові додавали по 1 мл водного розчину циталопраму, що містив від 100 до 500

мкг препарату, перемішували і залишали на добу. Через добу до 10 мл модельної суміші циталопраму 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 діетилового етеру і фазу органічного розчинника відокремлювали та відкидали, а потім, після підлугування водної фази до рН 10-11 20 % розчином натрій гідроксиду, тричі екстрагували циталопрам хлороформом по 10 мл кожного разу. Одержані «лужні» екстракти фільтрували через фільтр з 0,5 г безводного натрій сульфату у мірну колбу об'ємом 50 мл і доводили до позначки хлороформом.

Для підвищення ступеню ізолювання циталопраму з крові ми додатково досліджували осад, який залишився після відокремлення надосадової рідини. Осад зі стакана для центрифугування зважували і переносили до порцелянової ступки, де його розтирали з потрібною кількістю безводного натрію сульфату до отримання однорідної сипучої 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 сипучу 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 циталопраму в екстрактах. Так, при проведенні кількісного визначення циталопраму в 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 діетилового етеру і суміш збовтували протягом 5 хв, а потім органічну фазу відокремлювали і відкидали. Після цього кислу витяжку підлужували натрій гідроксидом 20 % розчином до рН 10-11 і тричі екстрагували циталопрам хлороформом по 10 мл кожного разу. Хлороформні екстракти фільтрували через паперовий фільтр, який містив 0,5 г безводного натрій сульфату, об'єднували і переносили до мірної колби об'ємом 50 мл та доводили до позначки вказаним розчинником.

Циталопрам, виділений з сечі та крові, виявляли за допомогою кольорових реакцій, тонкошарової хроматографії та УФ-спектроскопії.

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-коричнє забарвлення); чутливість вказаних реакцій становила 3,0-6,0 мкг в пробі. Паралельно проводили контрольні досліди 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 (силікагель ПТСХ-П-А, фракція 5-17 мкм, розмір 10х10 см) та Merck (Silica gel 60 F₂₅₄, розмір 10х20 см). Від 2 до 10 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 – амоній гідроксид 25 % розчин (100:1,5) та толуен-ацетон-етанол-амоній гідроксид 25 % розчин (45:45:7,5:2,5). Потім пластинки висушували на повітрі і проявляли за допомогою реактива Драгендорфа у модифікації за Мун'є (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 гідроксид 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-амоній гідроксид 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 непроявленої 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 становила $99,0 \pm 1,0$ %. 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 $A = 0,00554 \cdot C + 0,02$ ($r = 0,99945$; $S^2 = 1,5 \cdot 10^{-4}$).

Градуювальну залежність встановлювали з використанням стандартного розчину циталопраму в хлороформі, що містив 200 мкг препарату в 1 мл. В ділительні лійки вносили по 5 мл ацетатного буферного розчину з рН 4,6, по 5 мл метилового 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 в ділительних лійках збовтували протягом 5 хв. за допомогою апарата 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 в 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

За даними, отриманими нами по вивченню екстракції циталопраму з водних розчинів органічними розчинниками, було встановлено, що в найменшій кількості вказана речовина екстрагується з кислого середовища діетиловим етером при рН 1 (ступінь одноразової екстракції складає близько 11 %). У найбільшій кількості циталопрам екстрагується хлороформом з лужного середовища при рН 9-11 (ступінь екстракції складає 96-100 %). Таким чином, ізолювання циталопраму з біологічних рідин доцільно проводити хлороформом з лужного середовища при рН 10-11. Для видалення співекстрактивних речовин з біологічних рідин найбільш придатним екстрагентом є діетиловий етер при рН 1.

В ході розробки методик виділення циталопраму з сечі та крові було встановлено необхідність попереднього видалення супутніх речовин з біологічних рідин, для чого білкові домішки осаджували додаванням 10 % розчину кислоти хлоридної з наступним центрифугуванням (кров) та екстрагували залишки супутніх речовин діетиловим етером з кислого середовища (кров, сеча). У разі відсутності етапу очистки при ізолюванні циталопраму з біологічних рідин, особливо з крові, під час екстракції препарату органічними розчинниками з лужного середовища утворювались стійкі емульсії. Результати вимірювань показників оптичної густини, отримані екстракційно-спектрофотометричним методом з метиловим оранжевим для екстрактів з «холостих» дослідів, отриманих з крові, становили 0,040-0,065.

Для аналізу циталопраму в хлороформних екстрактах, одержаних з осаду крові, також була необхідна екстракційна очистка, яку проводили так, як описано вище. Оптична густина розчинів, одержаних у «холостих» дослідях після екстракційної очистки, знаходилась у межах 0,015-0,020 в області спектру, що відповідала максимуму світлопоглинання забарвлених розчинів іонних асоціатів циталопраму з метиловим оранжевим.

Результати кількісного визначення циталопраму, 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 хлороформом з сечі можливо виділити $78,1 \pm 4,5$ % циталопраму, з плазми крові – $33,7 \pm 1,8$ %, а з осаду крові після його відокремлення від плазми ще додатково – $10,9 \pm 1,3$ % зазначеного антидепресанта. Таким чином, аналіз осаду з крові на вміст в ньому циталопраму підвищує ступінь його ізолювання з зазначеної біологічної рідини.

ВИСНОВКИ

1. Розроблені ефективні методики рідинно-рідинної екстракції циталопраму з біологічних рідин хлороформом з лужного середовища, які дозволяють виділити з сечі $78,1 \pm 4,5$ % циталопраму, з плазми крові – $33,7 \pm 1,8$ %, а з осаду крові після його відокремлення від плазми ще додатково – $10,9 \pm 1,3$ % зазначеного антидепресанта.
2. Доведена можливість використання кольорової реакції, ТШХ, УФ-спектроскопії, екстракційної спектрофотометрії для виявлення та кількісного визначення циталопраму в одержаних біологічних екстрактах.

ЛІТЕРАТУРА

1. Агибалова Т.В. Использование антидепрессанта циталопрам при лечении больных с алкогольной зависимостью / Т.В. Агибалова, М.В. Захаров, А.С. Лобачева // Психиатрия и психофармакотерапия. – 2004. – № 4. – С. 156-158.
2. Баюрка С.В. Розробка методів ідентифікації та кількісного визначення циталопраму, придатних для хіміко-токсикологічного аналізу / С.В. Баюрка, В.С. Бондар, В.В. Болотов та ін. // Вісник фармації. – 2010. – Т. 64, № 4. – С. 33-37.
3. Вергейчик Т.Х. Токсикологическая химия / Т.Х. Вергейчик. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 400 с.
4. Крылов В.И. Антидепрессанты в общей медицинской практике. Эффективность и безопасность терапии / В.И. Крылов // ФАРМиндекс-Практик. – 2003. – Вып. 5 – С. 22-32.
5. Машковский М.Д. Лекарственные средства: 15-е изд. / М.Д. Машковский. – М.: ООО «Издательство Новая Волна», 2006. – С. 106.
6. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов: учебное пособие для вузов / Под ред. Н.И. Калетиной. – М.: ГОЭТАР-Медиа, 2008. – 1016 с.
7. Элленхорн М.Дж. Медицинская токсикология: Диагностика и лечение отравлений у человека: В 2 т.: Пер. с англ. / М.Дж. Элленхорн. – М.: Медицина, 2003. – Т.1. – С. 647-697.
8. Bartolinčič A. Development of practical and accurate HPLC methods for enantioselective analysis of fluoxetine and citalopram / A. Bartolinčič, A. Šporec, V. Druškovič et al. // Chem. anal. – 2006. – 51, № 4. – P. 509-526.
9. Bateman N.D. Antidepressants: Poisonous substances / N.D. Bateman. – Amsterdam: Elsevier, 2007. – P. 587-589.
10. Bjorhovde A. Liquid-phase microextraction of drugs from human breast milk / A. Bjorhovde, G.T. Halvorsen, K. E. Rasmussen et al. // Anal. chim. acta. – 2003. – 491, № 2. – P. 155-161.

11. Carson H.J. Classes of drugs and their prevalence in multiple drug intoxication in suicides and accidents / H.J. Carson. // Leg. Med. – 2007. – Vol. XXX. – P. 1-4.
12. Castro A. High-throughput on-line solid-phase extraction – liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 14 antidepressants and their metabolites in plasma / A. Castro, M.d.M.R. Fernandez, M. Laloup et al. // J.Chromatogr. A. – 2007. – 1160, №1. – P. 3-12.
13. Clark's analysis of Drugs and Poisons: Third edition [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.
14. Frahnet Ch. Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: A simple tool for therapeutic drug monitoring / Ch. Frahnet, R.M. Luise, K. Grasmäder // J. Chromatogr. B. – 2003. – 794, № 1. – P. 35-47.
15. 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.
16. Isbister G.K. Relative toxicity of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in overdose / G.K. Isbister, S.J. Bowe, A. Dawson et al. // J. Toxicol. Clin. Toxicol. – 2004. – № 42. – P. 277-285.
17. Jenkins A.J. Disposition of citalopram in biological specimens from postmortem cases / A.J. Jenkins, K.M. Gubanich // J. For. Sci. – 2002. – № 47. – P. 159-164.
18. Labat L. Separation of new antidepressants and their metabolites by micellar electrokinetic capillary chromatography / L. Labat, M. Deveaux, P. Dallet et al. // J. Chromatogr. B. – 2002. – Vol. 773, № 1. – P. 17-23.

19. Levine B. Citalopram distribution in postmortem cases / B. Levine, X. Zhang, J.E. Smialek et al. // J. Anal. Tox. – 2001. – № 25. – P. 641–644.
20. Okulicz – Kozaryn K. Przyjmowanie leków psychoaktywnych a używanie innych substancji odurzających przez młodzież / K. Okulicz – Kozaryn, A. Borucka, K. Koson // Alk. i narkomania. – 2006. – 19, №1. – C. 35-52.
21. Randall C. Baselt. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man / C. Baselt Randall. – California, Foster City: Chemical Toxicology Institute, 2000. – P. 476-478.
22. Thieme D. Improved screening capabilities in forensic toxicology by application of liquid chromatography – tandem mass spectrometry / D. Thieme, H. Sachs // Anal. chim. acta. – 2003. – 492. – P. 171-186.

Таблиця 1

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

Додано циталопраму до 50 мл сечі, мкг	Виділено циталопраму		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
200	161,2	80,6	$\bar{X} = 78,1$ $S = 3,6$ $S_{\bar{x}} = 1,6$ $\Delta \bar{X} = 4,5 \quad \varepsilon = 5,7$ $\bar{X} \pm \Delta \bar{X} = 78,1 \pm 4,5$
300	228,3	76,1	
500	392,5	78,5	
700	512,4	73,2	
1000	823,0	82,3	

Таблиця 2

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

Додано циталопраму до 10 мл крові, мкг	Виділено циталопраму		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
100	34,8	34,8	$\bar{X} = 33,7$ $S = 1,5$ $S_{\bar{x}} = 0,7$ $\Delta\bar{X} = 1,8 \quad \varepsilon = 5,3$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 33,7 \pm 1,8$
200	68,0	34,0	
300	94,5	31,5	
400	140,8	35,2	
500	165,5	33,1	

Таблиця 3

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

Додано циталопраму до 10 мл крові, мкг	Виділено циталопраму		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
100	9,4	9,4	$\bar{X} = 10,9$ $S = 1,0$ $S_{\bar{X}} = 0,5$ $\Delta\bar{X} = 1,3$ $\varepsilon = 11,7$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 10,9 \pm 1,3$
200	23,4	11,7	
300	32,4	10,8	
400	48,0	12,0	
500	52,5	10,5	

УДК: 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

С.В. Баюрка, С.А. Карпушина

ИЗОЛИРОВАНИЕ ЦИТАЛОПРАМА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

АННОТАЦИЯ

Разработаны эффективные методики жидкость-жидкостной экстракции циталопрама из биологических жидкостей хлороформом из щелочной среды при рН 10-11, которые позволили выделить из мочи $78,1 \pm 4,5$ % циталопрама, из плазмы крови – $33,7 \pm 1,8$ %, из осадка крови после его отделения от плазмы – дополнительно $10,9 \pm 1,3$ % указанного антидепрессанта.

Ключевые слова: циталопрам, биологические жидкости, цветные реакции, тонкослойная хроматография, УФ-спектроскопия, экстракционная спектрофотометрия в видимой области.

UDC: 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

S.V. Baiurka, S.A. Karpushina

ISOLATION OF CITALOPRAM FROM BIOLOGICAL FLUIDS

RESUME

The effective methods of liquid-liquid extraction of citalopram from biological fluids with chloroform from the alkaline medium at pH 10–11 have been developed, which allowed to separate 78.1 ± 4.5 % of citalopram from urine, 33.7 ± 1.8 % from blood serum and from the blood sediment 10.9 ± 1.3 % of the antidepressant studied after additional separation from the blood serum.

Key words: citalopram, biological fluids, colour reactions, Thin Layer Chromatography, UV-spectroscopy, extraction spectrophotometry in visible region.