

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

УДК 615.065:54.061/062:547.712.22:001.8

ІЗОЛЮВАННЯ ФЛУОКСЕТИНУ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ПІДКИСЛЕНОЮ ВОДОЮ ТА ПІДКИСЛЕНИМ ЕТАНОЛОМ

С.В.Баюрка, В.С.Бондар, С.А.Карпушина

Національний фармацевтичний університет

Вивчено роздільну спроможність відносно флуоксетину загальноприйнятих у судово-токсикологічному аналізі методів ізолювання "лікарських" отрут методами О.О.Васильєвої, Стаса-Отто, В.П.Крамаренка, які дозволили виділити, відповідно, $9,44 \pm 0,83$ %, $18,70 \pm 1,83$ %, $17,68 \pm 2,10$ % флуоксетину. Виявляли флуоксетин у біологічних екстрактах за допомогою тонкошарової хроматографії, кольорових реакцій та УФ-спектроскопії. Кількісний вміст препарату встановлювали екстракційно-фотометричним методом реакцією утворення іонного асоціату з кислотним азобарвником метиловим оранжевим.

Флуоксетин ((\pm)-N-метил-3-феніл-3-(пара-трифторометил)феноксипропіламіну гідрохлорид) належить до групи сучасних антидепресантів та застосовується в медичній практиці [3, 12, 14]. Він є значно менш токсичним, ніж, наприклад, широко відомий трициклічний антидепресант амітриптілін [5, 7, 13].

Так, наведені в літературі смертельні дози для флуоксетину (1,5 г [5], 1880 мг [8]) та амітриптіліну (10-20 мг/кг [13]) значно не відрізняються, але при цьому флуоксетин має значно більший терапевтичний індекс. Доза флуоксетину, що в 10 разів перевищує терапевтичну, не призводить до серйозної інтоксикації, в той час як таке ж передозування амітриптіліну викликає тяжкі гострі отруєння, більшість з яких з летальним кінцем [13].

Останнім часом зареєстровані непоодинокі випадки смертельних отруєнь флуоксетином [5, 6, 7, 9, 10, 11], більшість з яких є комбінованими та згадується у зв'язку з прийомом флуоксетину сумісно з трициклічними антидепресантами [7], бензодіазепінами [8] та іншими психотропними речовинами [6].

Таким чином, розробка схеми ненаправленого (загального) дослідження біологічного матеріалу на "лікарські" отрути, що передбачає використання загальних методів ізолювання, є актуальною задачею сучасного судово-токсикологічного аналізу [4].

У літературі наведені дані [1] із загальних методів виділення флуоксетину з печінки водою та етанолом, підкисленими кислотою оксалатною, а також водою, підкисленою кислотою сульфатною. Але використані методики містять деякі модифікації загальноприйнятих у судово-токсикологічному аналізі методів ізолювання, що робить їх менш придатними у схемі ненаправленого судово-токсикологічного аналізу "лікарських отрут".

Метою наших досліджень було встановлення роздільної спроможності відносно флуоксетину загальноприйнятих у судово-токсикологічному аналізі методів ізолювання лікарських сполук з біологічного матеріалу [2]: 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 флуоксетину в отриманих екстрактах з біологічного матеріалу проводили за допомогою простих, доступних та ефективних при судово-токсикологічному аналізі методів: тонкошарової хроматографії (ТШХ), УФ-спектроскопії, кольорових реакцій, екстракційної фотометрії.

Матеріали та методи

Подрібнену печінку людини (20 г), загиблої від травми, вміщували у стакан, додавали 2 мл водного розчину флуоксетину, який містив 2000 мкг препарату. Суміш ретельно перемішували і залишали на 24 год. Паралельно ставили "холості" досліди. Ізолювання флуоксетину проводили водою та етанолом, підкисленими кислотою оксалатною, а також водою, підкисленою кислотою сульфатною, згідно із 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 додаткового екстракційного очищення. Для цього хлороформні екстракти перено-

сили до фарфорової чашки, випаровували їх на водяній бані при температурі не вище 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 двічі (по 10 мл) збовтували з діетиловим ефіром, відкидаючи фазу органічного розчинника. Після цього кислий водний залишок підлугували 20% розчином натрію гідроксиду до рН 8-9 і тричі екстрагували флуоксетин 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 довели до позначки хлороформом.

При проведенні кількісного визначення флуоксетину в очищених таким чином екстрактах екстракційно-фотометричним методом з метиловим оранжевим оптична густина у розчинах, отриманих для "холостих" дослідів, знаходилась у межах 0,02-0,04.

Виявлення флуоксетину в екстрактах проводили за методом ТШХ. Для дослідження використовували скляні хроматографічні пластинки для ВЕТШХ (силікагель КСКГ, фракція 5-20 мкм, товщина шару 130±25 мкм, розмір 20×20 см, виробництво Естонія), Сорбфіл (силікагель ПТСХ-П-А, фракція 5-17 мкм, розмір 10×10 см), Мерск (Silica gel 60 F254, розмір 10×20 см). Від 5 до 15 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" флуоксетину (10 мкг у пробі). У третю точку наносили 5 мл випареної витяжки, одержаної у "холостому" досліді. Хроматограми розвивали послідовно з використанням двох систем рухомих розчинників: хлороформ і метанол — амонію гідроксид 25% розчин (100:1,5). Після цього пластинки висушували на повітрі і проявляли за допомогою реактиву Драгендорфа у модифікації за Мунье (жовтогарячий колір плям флуоксетину на жовтому фоні; чутливість виявлення флуоксетину складала 0,25 мкг препарату у пробі для пластинок ВЕТШХ та Сорбфіл і 1,0 мкг для пластинок Мерск). Плями флуоксетину, виділеного з печінки, та флуоксетину-стандарту за величинами Rf співпадали та складала у системі рухомих розчинників метанол — амонію гідроксид 25% розчин (100:1,5) 0,58±0,02 (для пластинок ВЕТШХ), 0,42±0,02 (для пластинок Сорбфіл), 0,25±0,02 (для пластинок Мерск). Витяжки з "холостих" дослідів не давали плям з вказаними значеннями Rf.

Виявляли також флуоксетин у витяжках за допомогою кольорових реакцій. Як реагенти використовували кислоту сульфатну концентровану (спостерігали коричневе забарвлення, чутливість — 20 мкг препарату в пробі), реактиви Лібермана

(коричневе забарвлення, чутливість — 3 мкг флуоксетину в пробі), Манделіна (синє забарвлення, чутливість — 3 мкг препарату в пробі), Фреде (синє забарвлення, чутливість — 4 мкг флуоксетину в пробі). Паралельно проводили контрольні досліди зі стандартним розчином флуоксетину в хлороформі (10 мкг/мл) та витяжкою з "холостого" досліді. Досліджувані реакції специфічні на флуоксетин по відношенню до співекстрактивних речовин з біологічного матеріалу.

Підтвердження присутності флуоксетину в екстрактах додатково проводили УФ-спектроскопічним методом. Для цього елюювали флуоксетин з непроявленої смуги хроматограми на рівні, що відповідав місцю знаходження плями "свідка" флуоксетину, 0,1 М розчином кислоти хлоридної: УФ-спектр одержаного розчину був аналогічним спектру розчину стандарту флуоксетину в 0,1 М розчині кислоти хлоридної та мав смуги поглинання при $\lambda_{\max} = 265 \pm 2$ нм та 276 ± 2 нм.

Кількісне визначення флуоксетину у витяжках проводили екстракційно-фотометричним методом за реакцією утворення іонних асоціатів препарату з метиловим оранжевим та розраховували вміст флуоксетину в екстрактах за допомогою градуального графіка.

Для побудови градуального графіка використовували стандартний розчин флуоксетину в хлороформі, що містив 100 мкг препарату в 1 мл. У ділильні лійки вносили по 5 мл ацетатного буферного розчину з рН 4,6, по 5 мл 0,05% розчину метилового оранжевого і додавали по 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,2 мл стандартного розчину флуоксетину. Додавали хлороформ до загального об'єму органічного розчинника 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 (близько 1 мл), до яких додавали по 2 мл 1% розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі.

Оптичну густину отриманих розчинів, забарвлених у червоний колір, вимірювали за допомогою фотоелектроколориметра КФК-2 (світлофільтр зеленій з $\lambda_{\text{еф}} = 540 \pm 10$ 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 120 мкг флуоксетину в 14 мл кінцевого об'єму. Відносна помилка кількісного визначення не перевищувала 2,5%.

Результати та їх обговорення

При виділенні флуоксетину з біологічного матеріалу з використанням вищенаведених розчин-

Таблиця

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

Метод ізолювання	Додано флуоксетину до 20 г печінки, мкг	Виділено флуоксетину		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
Настоювання з водою, підкисленою кислотою оксалатною (метод О.О.Васильєвої)	2000	174,0	8,7	$\bar{X} = 9,44$ $S = 0,69$ $S_{\bar{X}} = 0,30$ $\Delta\bar{X} = 0,83$ $\varepsilon = 8,79$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 9,44 \pm 0,83$
		184,0	9,2	
		180,0	9,0	
		198,0	9,9	
		208,0	10,4	
Настоювання з етанолом, підкисленою кислотою оксалатною (метод Стаса-Отто)	2000	388,0	19,4	$\bar{X} = 18,70$ $S = 1,49$ $S_{\bar{X}} = 0,66$ $\Delta\bar{X} = 1,83$ $\varepsilon = 9,78$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 18,70 \pm 1,83$
		364,0	18,2	
		416,0	20,8	
		336,0	16,8	
		382,0	19,1	
Настоювання з водою, підкисленою кислотою сульфатною (метод В.П.Крамаренка)	2000	312,0	15,6	$\bar{X} = 17,68$ $S = 1,70$ $S_{\bar{X}} = 0,76$ $\Delta\bar{X} = 2,10$ $\varepsilon = 11,87$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 17,68 \pm 2,10$
		354,0	17,7	
		328,0	16,4	
		392,0	19,6	
		383,0	19,1	

ників було встановлено, що отримані біологічні екстракти вміщували значну кількість домішок, які заважали подальшому виявленню та кількісному визначенню досліджуваної "лікарської" отрути. Так, результати вимірювань показників оптичної густини отриманих розчинів екстракційно-фотометричним методом з метиловим оранжевим для екстрактів з "холостих" дослідів становили 0,08-0,14 (за методом О.О.Васильєвої); 0,18-0,29 (за методом Стаса-Отто); 0,05-0,11 (за методом В.П.Крамаренка).

Для видалення супутніх домішок проводили додаткове екстракційне очищення витяжок за методикою, наведеною вище. Отримані таким чином очищені екстракти використовували для виявлення в них флуоксетину методами ТШХ та кольорових реакцій. Ідентифікацію препарату за УФ-спектрами проводили після додаткового очищення екстрактів методом ТШХ, досліджуючи елюати з хроматограм.

Результати вимірювань показників оптичної густини екстракційно-фотометричним методом у розчинах, отриманих для "холостих" дослідів, ста-

новили 0,02-0,04 (за методом О.О.Васильєвої), 0,035-0,05 (за методом Стаса-Отто), 0,03-0,04 (за методом В.П.Крамаренка) в області спектра, що відповідало максимуму світлопоглинання забарвлених розчинів іонних асоціатів флуоксетину з метиловим оранжевим.

Результати екстракційно-фотометричного визначення флуоксетину, виділеного з печінки за вищеназваними методами, наведені в таблиці.

Як видно, за допомогою загальних методів ізолювання з печінки можна виділити, відповідно, 9,44±0,83%, 18,70±1,83%, 17,68±2,10% флуоксетину.

ВИСНОВКИ

Вивчено роздільну спроможність відносно флуоксетину загальноприйнятих у судово-токсикологічному аналізі методів ізолювання за О.О.Васильєвою, Стасом-Отто, В.П.Крамаренко, які дозволили виділити, відповідно, 9,44±0,83%, 18,70±1,83%, 17,68±2,10% флуоксетину.

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

ЛІТЕРАТУРА

1. Бондар В.С., Бур'ян Г.О. // Вісник фармації. — 2002. — №4 (32). — С. 15-18.
2. Крамаренко В.П. Токсикологічна хімія. — К.: Вища шк., 1995. — 423 с.
3. Машковський М.Д. Лекарственные средства: 15-е изд. — М.: ООО "Изд-во Новая Волна", 2006. — С. 104-105.
4. Удалов А.В. // Лаб. журн. — 2003. — №1 (3). — С. 54-58.
5. Bateman N.D. Antidepressants: Poisonous substances. — Amsterdam: Elsevier, 2007. — P. 587-589.
6. Carson H.J. // J. Leg. Med. — 2007. — Vol. XXX. — P. 1-4.
7. Cheeta S., Schifano F., Oyefeso A. et. al. // Brit. J. Psychiatry. — 2004. — №184. — P. 41-47.

8. *Clark's Analysis of Drugs and Poisons. 3-rd Ed. — Pharmaceutical Press, 2005 (CD).*
9. *Gross R., Dannon P.N., Lepkifker E. et al. // Am. J. Emerg. Med. — 1998. — №16. — P. 328-329.*
10. *Isbister G.K., Bowe S.J., Dawson A. et al. // J. Toxicol. Clin. Toxicol. — 2004. — №42. — P. 277-285.*
11. *Jonsson A., Holmgren P., Ahlner J. // Forens. Sci. Int. — 2004. — Vol. 143. — P. 53-59.*
12. *Mann J.J. // N. Engl. J. Med. — 2005. — №353. — P. 1819.*
13. *Poisoning & Drug Overdose. 4-th Ed. / Ed. K.R. Olson. — Zange Medical Books, Mc Graw-Hill, 2004. — P. 88-93.*
14. *Yildiz A., Gonul A., Tamam L. // Bull. Clin. Psychopharmacol. — 2002. — №12. — P. 194.*

УДК 615.065:54.061/062:547.712.22:001.8

ИЗОЛИРОВАНИЕ ФЛУОКСЕТИНА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ПОДКИСЛЕННОЙ ВОДОЙ И ПОДКИСЛЕННЫМ ЭТАНОЛОМ

С.В.Баюрка, В.С.Бондар, С.А.Карпушина

Изучена разрешающая способность относительно amitriptилина общепринятых в судебно-токсикологическом анализе методов изолирования "лекарственных" ядов по методам А.А.Васильевой, Стаса-Отто, В.Ф.Крамаренко, которые позволили выделить, соответственно, $9,44 \pm 0,83\%$, $18,70 \pm 1,83\%$, $17,68 \pm 2,10\%$ флуоксетина. Обнаруживали флуоксетин в биологических экстрактах с помощью тонкослойной хроматографии, цветных реакций и УФ-спектроскопии. Количественное содержание препарата устанавливали экстракционно-фотометрическим методом по реакции образования ионного ассоциата с кислотным азокрасителем метиловым оранжевым.

UDC 615.065:54.061/062:547.712.22:001.8

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

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

The resolution ability of the generally accepted in forensic toxicological analysis isolation methods of "medicinal" poisons has been studied regarding to fluoxetine by O.O.Vasilyeva, Stas-Otto, V.Ph.Kramarenko methods, which allowed to separate $9,44 \pm 0,83\%$, $18,70 \pm 1,83\%$, $17,68 \pm 2,10\%$ fluoxetine, respectively. Fluoxetine was detected in the biological extracts with the help of thin layer chromatography, colour reactions, UV-spectroscopy. The drug's assay was performed by extraction — photometry method by the reaction of formation of ionic associate with methyl orange, the acidic azodye.