

С.В. Баярка, С.А. Карпушина, В.І. Степаненко, В.П. Мороз

РОЗРОБКА МЕТОДІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ФЛУВОКСАМІНУ, ПРИДАТНИХ ДЛЯ ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНОГО АНАЛІЗУ

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: флувоксамін, тонкошарова хроматографія, осадові та кольорові реакції, УФ-спектроскопія.

Ключевые слова: флувоксамин, тонкослойная хроматография, осадочные и цветные реакции, УФ-спектроскопия.

Key words: Fluvoxamine, Thin Layer Chromatography, sedimentary and colour reactions, UV-spectroscopy.

Вивчено умови ідентифікації флувоксаміну за допомогою тонкошарової хроматографії, осадових та кольорових реакцій, УФ-спектроскопії.

Изучены условия идентификации флувоксаминa с помощью тонкослойной хроматографии, осадочных и цветных реакций, УФ-спектроскопии.

The conditions of fluvoxamine authentication by means of the Thin Layer Chromatography, sedimentary and colour reactions, UV-spectroscopy have been studied.

Флувоксамін ((*E*)-5-Метокси-1-[4-(трифторметил)феніл]-1-пентанон-О-(2-аміноетил)оксиму малеат) – антидепресант, що за механізмом фармакологічної дії є селективним інгібітором зворотнього нейронального захвату серотоніну. Зазначена група антидепресантів знайшла широке застосування в сучасній медичній практиці [3,4]. Поряд з цим, флувоксамін неодноразово був причиною гострих та смертельних отруєнь [7,9,10,12,13,15]. Для встановлення причини отруєння важливе значення мають результати хіміко-токсикологічного дослідження біологічних об'єктів на вміст в них токсичної речовини.

Запропоновано [9] скринінгові системи для виявлення флувоксаміну за допомогою методу тонкошарової хроматографії, але перелік наведених рухомих фаз обмежений. На наш погляд, доцільно провести хроматографічне дослідження вказаного антидепресанта з використанням рухомих фаз, що рекомендовані Міжнародним комітетом з систематичного токсикологічного аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів [1].

Опрацьовано також методики аналізу флувоксаміну в об'єктах хіміко-токсикологічного аналізу за допомогою методів газо-рідинної хроматографії (ГРХ) з електрозахватним детектором [13], ГРХ/МС (мас-спектрометричний детектор) [9], високоефективної рідинної хроматографії (УФ- та флюоресцентний детектори) [9,11], сполучення рідинної хроматографії і мас-спектрометрії з ультразвуковою розпилювальною іонізацією [14]. Метод капілярного електрофорезу застосовано для кількісного аналізу флувоксаміну в грудному молоці [8]. Вищеперелічені методики характеризуються високою чутливістю та специфічністю, але потребують ретельної прободготовки (твердофазна екстракція [14], рідиннофазна мікроекстракція [8]) та спеціального дорогого обладнання, що робить їх малодоступними.

МЕТА РОБОТИ

Встановлення умов виявлення та ідентифікації флувоксаміну за допомогою простих, доступних та широко впроваджених в практику хіміко-токсикологічного

аналізу методів [2, 9]: тонкошарової хроматографії, хімічних реакцій, УФ-спектроскопії.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Хроматографічне дослідження проводили з використанням пластинок для високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) виробництва Естонії (сорбент КСКГ, фракція – 5÷20 мкм, товщина шару – 130±25 мкм, розмір пластинок 20x20 см), Sorbfil (силікагель СТХ-1 ВЕ, тип підложки – ПЕТФ, зв'язуюча речовина – силіказоль, фракція – 8÷12 мкм, товщина шару – 100 мкм, розмір пластинок 10x10 см), Merck виробництва Німеччини (силікагель GF₂₅₄, розмір пластинок 10x20 см), Silufol UV-254 (силікагель, підложка – фольга, зв'язуюча речовина – крохмаль, розмір пластинок 5x15 см) та рухомих фаз, які наведені в *табл. 1*. Як проявник флувоксаміну на хроматографічних пластинках використовували реактив Драгендорфа у модифікації за Мун'є.

Осадові реакції виконували на предметному склі з водними розчинами флувоксаміну малеату (вміст досліджуваної речовини від 0,5 до 20 мкг в пробі) з реактивами групового осадження алкалоїдів [2], які наведені в *табл. 2*.

Реакції забарвлення проводили на шматочках хроматографічних пластинок з сухими залишками після видалення хлороформу (хлороформні розчини флувоксаміну малеату містили від 0,5 до 25 мкг препарату у пробі). Як реактиви використовували кольорові реактиви [2,9]: кислоти сульфатну, хлоридну, нітратну, фосфатну, ацетатну концентровані, реактиви Маркі, Манделіна, Фреде, Ердмана, Лібермана.

УФ-спектри абсорбції флувоксаміну малеату в 0,1 М розчині кислоти хлоридної знімали на спектрофотометрії СФ-46 у діапазоні довжин хвиль 200–350 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм; як розчин порівняння використовували 0,1 М розчин кислоти хлоридної.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати хроматографічного дослідження флувоксаміну наведені в *табл. 1*. Рухомі фази № 1–9 рекомендовані



Значення Rf флувоксаміну у різних рухомих фазах і тонких шарах

№ з/п	Рухомі фази	Значення Rf флувоксаміну			
		ВЕТШХ	Сорбфіл	Merk	Силуфол
1	Метанол-25 % розчин амонію гідроксиду (100:1,5)	0,61	0,55	0,45	0,36
2	Хлороформ-метанол (90:10)	0,15	0,28	0,17	0,12
3	Етилацетат-метанол-25 % розчин амонію гідроксиду (85:10:5)	0,74	0,75	0,55	0,41
4	Хлороформ- <i>n</i> -бутанол-25 % розчин амонію гідроксиду (70:40:5)	0,94	0,94	0,93	0,90
5	Метанол- <i>n</i> -бутанол (60:40)	0	0	0	0
6	Метанол	0	0	0	0,04
7	Ацетон	0	0	0,06	0,02
8	Етилацетат	0	0	0	0
9	Циклогексан-толуен-діетиламін (75:15:10)	0,74	0,68	0,52	0,66
10	Гексан- <i>i</i> -пропанол-25 % розчин амонію гідроксиду (24:6:0,3)	0,50	0,20	0,46	0,08
11	Толуен-ацетон-етанол-25 % розчин амонію гідроксиду (45:45:7,5:2,5)	0,64	0,72	0,65	0,50
12	Хлороформ-диоксан-ацетон-25 % розчин амонію гідроксиду (47,5:45:5:2,5)	0,75	0,67	0,62	0,48
13	Хлороформ-ацетон-25 % розчин амонію гідроксиду (12:24:1)	0,87	0,71	0,65	0,66
14	<i>n</i> -Бутанол-кислота ацетатна-вода (4:0,5:1)	0,50	0,61	0,50	0,30
15	Етилацетат-ацетон-25 % розчин амонію гідроксиду (50:45:4)	0,84	0,71	0,74	0,42
16	Бензен-метанол-діетиламін (90:10:10)	0,78	0,74	0,67	0,44
17	Гексан-етилацетат-етанол-25 % розчин амонію гідроксиду (30:10:5:1)	0,45	0,38	0,37	0,16
18	Етанол-ацетон-вода (1:1:2)	0,81	0,83	0,80	0,14
19	Гексан-толуен-діетиламін (75:15:10)	0,57	0,61	0,30	0,25

Міжнародним комітетом з систематичного токсикологічного аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів. Рухомі фази №10–19 використовуються у хіміко-токсикологічному аналізі для виявлення лікарських речовин основного характеру методом тонкошарової хроматографії [5,6]. Як видно з табл. 1, найбільш придатними для ідентифікації

флувоксаміну виявилися рухомі фази № 1, 3, 9, 11–15, 17, 19.

При використанні реактиву Драгендорфа у модифікації за Мун'є, як проявника флувоксаміну на хроматографічних пластинках, спостерігали оранжевий колір плям препарату на жовтому фоні. Чутливість виявлення флувоксаміну при цьому знаходилась у межах 2–6 мкг препарату в пробі в

Таблиця 2

Осадів реакції на флувоксамін та їх чутливість

№ з/п	Реактив	Колір осаду	Межа виявлення, мкг	Граничне розведення
1	Реактив Драгендорфа	коричневий	2,0	1:25000
2	Реактив Драгендорфа за Мун'є	жовтий	3,0	1:6666
3	Реактив Бушарда	коричневий	2,0	1:25000
4	Реактив Шейблера	брудно-білий	2,0	1:25000
5	Реактив Зонненшейна	коричневий	5,0	1:10000
6	Метилловий оранжевий 0,05% розчин	жовтий	3,0	1:6666
7	Кислота пікринова 0,5% розчин	жовтий	3,0	1:6666
8	Калій перманганат 1% розчин	бурий	2,0	1:25000
9	Калій дихромат 1% розчин	жовтий	5,0	1:10000
10	Сіль Рейнеке 1% розчин	білий	1,0	1:50000
11	Калій фероціанід 20% розчин	білувато-жовтий	5,0	1:10000
12	Кадмій іодид 15% розчин	білий	20,0	1:2500
13	Роданідний комплекс кобальту (II)	синій	3,0	1:6666
14	Роданідний комплекс мангану (II)	білий	10,0	1:5000
15	Роданідний комплекс цинку	білий	5,0	1:10000
16	Роданідний комплекс купруму (II)	білий	3,0	1:6666
17	Роданідний комплекс феруму (II)	коричневий	10,0	1:5000

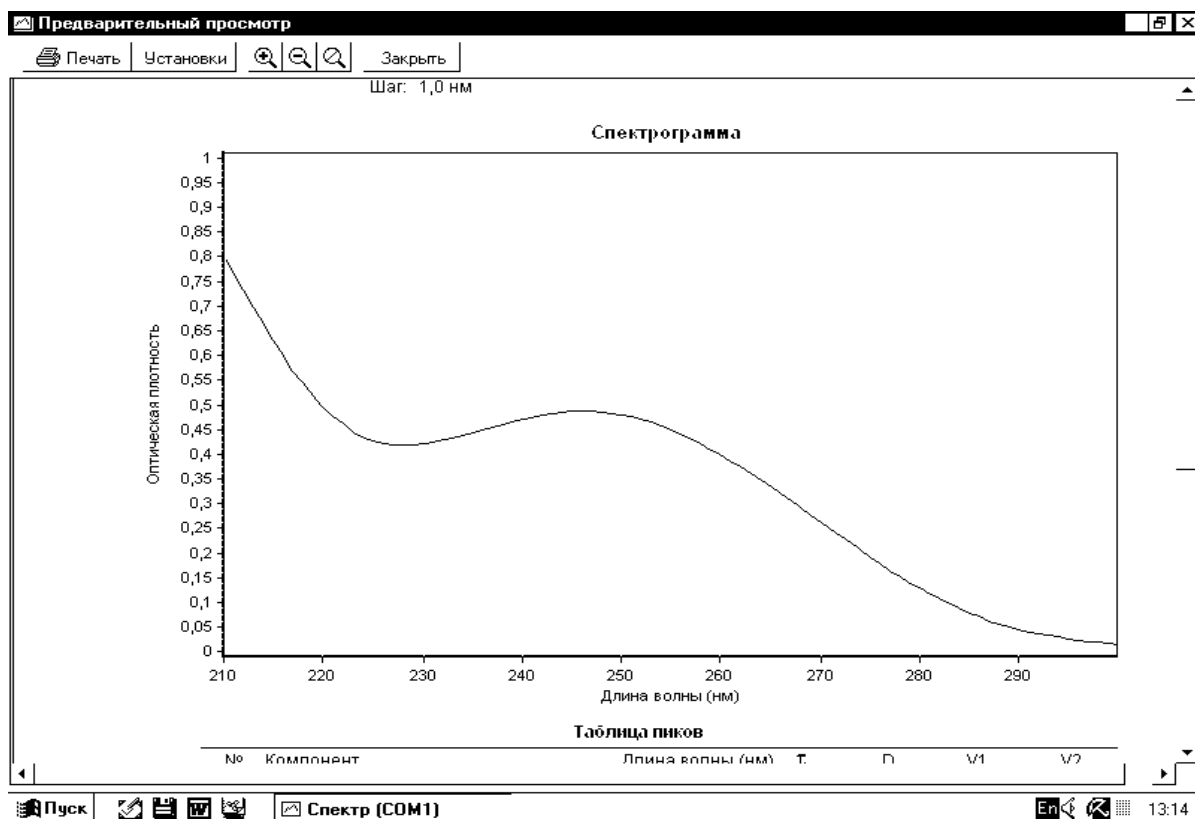


Рис. 1. УФ-спектр светопоглощения флувоксамину малеату в 0,1 М розчині кислоти хлоридної (концентрація $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л).

залежності від типу хроматографічних пластинок. Чутливість зазначеного проявника при виявленні флувоксаміну була найвищою при використанні хроматографічних пластинок Merck (2 мкг препарату в пробі).

Встановлено, що флувоксамін утворює забарвлені аморфні осадки, з реактивами групового осадження алкалоїдів. Колір отриманих осадків, а також чутливість відповідних реакцій наведено у табл. 2. Таким чином, найбільш чутливими осадковими реактивами у відношенні до флувоксаміну виявились реактиви Драгендорфа, Бушарда, Шейблера, 1% розчини калій перманганату та солі Рейнеке (межа виявлення 1–2 мкг препарату в пробі).

При встановленні умов виявлення флувоксаміну за допомогою кольорових реактивів встановлено, що зазначений антидепресант з реактивом Лібермана утворював брудно-фіолетове забарвлення, яке переходило у сіре. Чутливість вказаної реакції становила 5 мкг флувоксаміну в пробі. З іншими кольоровими реактивами, що перелічені вище, флувоксамін не утворював забарвлених продуктів.

Вивчення світлопоглинання флувоксаміну малеату в УФ-області спектру показало наявність максимуму абсорбції при довжині хвилі 248 ± 2 нм (0,1 М розчин кислоти хлоридної) (рис. 1), для якого було розраховано питомий і молярний коефіцієнти світлопоглинання: $A_1 = 224,2$; $\epsilon = 9740$.

ВИСНОВКИ

Вивчено хроматографічну поведінку флувоксаміну у загальних і деяких часткових рухомих фазах, загальноприйнятих у токсикологічному скринінгу речовин основного

характеру з використанням чотирьох типів тонких шарів.

Вивчено осадкові та кольорові реакції виявлення флувоксаміну.

Досліджено УФ-спектр поглинання флувоксаміну в 0,1 М розчині кислоти хлоридної та визначено коефіцієнти світлопоглинання.

ЛІТЕРАТУРА

1. Еремін С.К. Анализ наркотических средств / С.К. Еремін, Б.Н. Изотов, Н.В. Веселовская. – М.: Мысль, 1993. – 272 с.
2. Крамаренко В.П. Токсикологічна хімія / В.П. Крамаренко. – К.: Вища шк., 1995. – 423 с.
3. Крылов В.И. Антидепрессанты в общемедицинской практике. Эффективность и безопасность терапии / В.И. Крылов // ФАРМиндекс-Практик. – 2003. – Вып. 5 – С. 22–32.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – 15-е изд. – М.: ООО «Издательство Новая Волна», 2006. – С. 105.
5. Николаева Э.Г. Изолирование амитриптилина из трупного материала ацетонитрилом / Э.Г. Николаева // СМЭ. – 1990. – Т. 33, №1. – С. 39–40.
6. Чернова Л.В. Химико-токсикологический анализ комбинированных отравлений некоторыми психотропными препаратами трициклической структуры / Л.В. Чернова, В.А. Карташов, Е.Ю. Конишина // СМЭ. – 1991. – Т. 34, №1. – С. 34–36.
7. Bateman N.D. Antidepressants: Poisonous substances / N.D. Bateman. – Amsterdam: Elsevier, 2007. – P. 587–589.
8. 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. – V. 491, № 2. – P. 155–161.
9. 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.– Назва з титул. екрану.
10. *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. – V. 42. – P. 277–285.
 11. *Lucca A.* Simultaneous determination of human plasma levels of four selective serotonin inhibitors by high-performance liquid chromatography / *A. Lucca, G. Gentilini, S. Lopez-Silva et al.* // *Ther. Drug Mon.* – 2000. – V. 22. – P. 271–276.
 12. *Reeves R.R.* Neurotoxic syndrome associated with risperidone and fluvoxamine / *R.R. Reeves, J.E. Mack, J.J. Beddingfield* // *Ann. Pharmacother.* – 2002. – V. 36. – P. 440–443.
 13. *Randall C.B.* Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man / *C.B. Randall.* – California, Foster City: Chemical Toxicological Institute, 2000. – P. 488–489.
 14. *Shinozuka T.* Solid-phase extraction and analysis of 20 antidepressant drugs in human plasma by LC/MS with SSI method / *T. Shinozuka, M. Terada, E. Tanaka* // *Forens. sci. Int.* – 2006. – V. 162. – P. 108–112.
 15. *Sim F.H.* A single dose of fluvoxamine associated with an acute psychotic reaction / *F.H. Sim, R.A. Massabki* // *Can. J. Psych.* – 2000. – V. 45. – P. 762–763.

Відомості про авторів:

Баюрка С.В., к. фарм. н., доцент каф. токсикологічної хімії НФаУ.
 Карпушина С.А., к. хім. н., доцент каф. токсикологічної хімії НФаУ.
 Степаненко В.І., к. фарм. н., доцент каф. токсикологічної хімії НФаУ.
 Мороз В.П., к. фарм. н., доцент каф. аналітичної хімії НФаУ.

Адреса для листування:

Баюрка С.В. 61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4
 тел. (0572) 67-91-92, e-mail: toxchem@ukrfa.kharkov.ua

УДК 615.26'45:543.42.062

Ю.В. Бурлака¹, О.О. Тарханова¹, С.О. Васюк¹, І.М. Кейтлін²

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КЛОТРИМАЗОЛУ У ЛІКАРСЬКИХ ФОРМАХ

¹Запорізький державний медичний університет,

²Запорізька обласна державна інспекція з контролю якості лікарських засобів

Ключові слова: спектрофотометрія, клотримазол, сульфоталейнові барвники, бромкрезоловий пурпуровий, кількісне визначення.

Ключевые слова: спектрофотометрия, клотримазол, сульфоталейновые красители, бромкрезоловый пурпурный, количественное определение.

Key words: spectrophotometry, clotrimazole, bromocresol purple, sulphonphthalein dyes, quantitative determination

Розроблено нову точну та чутливу спектрофотометричну методику кількісного визначення клотримазолу в лікарських формах на основі реакції з бромкрезоловим пурпуром. Проведено процедуру валідації згідно ДФУ з визначенням таких параметрів як лінійність, діапазон застосування, збіжність, правильність і робастність. Встановлено, що методика є валідною за цими показниками.

Разработана новая точная и чувствительная спектрофотометрическая методика количественного определения клотримазола в лекарственных формах на основе реакции с бромкрезоловым пурпуром. Проведена процедура валидации согласно ГФУ с определением таких параметров как линейность, диапазон применения, сходимость, правильность и робастность. Установлено, что методика является валидной по этим показателям.

A new precise and sensitive spectrophotometric method for the quantitative determination of clotrimazole in pharmaceutical preparations based on the reaction with bromocresol purple is developed. Validation characteristics such as linearity, application range, precision, accuracy and robustness are also determined. The method is valid according to these characteristics.

Клотримазол – представник групи імідазольних протигрибкових лікарських засобів широкого спектра дії для зовнішнього застосування [1]. Згідно Британської Фармакопеї [2], кількісний вміст клотримазолу в субстанції встановлюють титруванням в середовищі безводної оцтової кислоти, а визначення у лікарських формах проводять методом рідинної хроматографії з УФ-детектором. Відомі також роботи з визначення клотримазолу в присутності продуктів його деградації за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії, а також тонкошарової хроматографії та денситометрії

[3,4,5]. Дані способи визначення характеризуються високою точністю, але необхідність дорогого обладнання і тривалий процес підготовки проби зумовлюють їх незручність для рутинного контролю якості лікарських засобів. Тому виникає необхідність звернутися до спектрофотометричних методів кількісного аналізу, лабораторне оснащення для яких є більш доступним. У літературі описано спосіб кількісного визначення клотримазолу за допомогою спектрофотометрії в ультрафіолетовій області спектра, та, на жаль, цей метод не є достатньо селективним [6]. Отже, спектрофотометрія у видимій області спектра із застосу-