

## **РОЗРОБЛЕННЯ МЕТОДІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЕСЦИТАЛОПРАМУ, ПРИДАТНИХ ДЛЯ ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНОГО АНАЛІЗУ**

**Ключові слова:** есциталопрам, тонкошарова хроматографія, кольорові реакції, УФ-спектрофотометрія, екстракційна спектрофотометрія

Отруєння антидепресантами посідають одне з перших місць у світі серед отруєнь психотропними препаратами [7]. Це зумовлено як значною поширеністю депресивних та психотичних станів (так у Сполучених Штатах Америки на лікування депресій витрачається близько 44 мільярдів доларів щорічно [10]), так і характером контингенту осіб, які вживають вказані засоби (хворі на шизофренію та наркоманію [9]). Основною причиною гострих та летальних отруєнь є спроби суїциду на фоні прийому антидепресантів [8], передозування, сумісний прийом з іншими психотропними засобами та алкоголем [9].

Особливу увагу в токсикологічному відношенні приділяють антидепресантам нової генерації з групи селективних інгібіторів зворотнього захвату серотоніну [7, 8], до яких відноситься S-енантіомер відомого антидепресанта циталопрама – есциталопрам ((1-[3-(диметиламіно)пропіл]-1-(4-фторфеніл)-1,3-дигідро-5-ізобензофуранкарбонітрилу оксалат). За даними клінічних досліджень, він має більш стабільний терапевтичний ефект, ніж циталопрам та, поряд з останнім, знайшов широке застосування в сучасній медичній практиці для лікування депресій різноманітної етіології [6].

Безумовно, есциталопрам викликає певний інтерес у хіміко-токсикологічному відношенні і розроблення методів його аналізу, придатних для хіміко-токсикологічних досліджень, є актуальним завданням.

Вже опрацьовано методи аналізу есциталопраму методом рідинної хроматографії в плазмі крові [5] та сполученням рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією у волоссі [4]. Вищеперелічені методики є високочутливими та специфічними, але їх використання вимагає ретельної пробопідготовки та спеціального вартісного обладнання, що може обмежувати їх використання.

В літературі відсутні відомості про умови виявлення есциталопраму за допомогою методу тонкошарової хроматографії, УФ-спектроскопії.

**Метою** нашого дослідження було встановлення умов виявлення, ідентифікації та кількісного визначення есциталопраму за допомогою доступних та широко впроваджених в практику хіміко-токсикологічного аналізу методів [2, 3]: тонкошарової хроматографії, кольорових реакцій, УФ-спектрофотометрії та екстракційної спектрофотометрії у видимій області.

### **Матеріали та методи дослідження**

Хроматографічне дослідження здійснювали з використанням пластинок для високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) виробництва Естонії (сорбент КСКГ, фракція – 5–20 мкм, шаром завтовшки – 130±25 мкм, розмір пластинок 20x20 см), Sorbfil (силікагель СТХ-1 ВЕ, тип підложки – ПЕТФ, зв'язуюча речовина – си-

ліказоль, фракція – 8–12 мкм, шаром завтовшки – 100 мкм, розмір пластинок 10x10 см), Merck виробництва Німеччини (силікагель GF<sub>254</sub>, розмір пластинок 10x20 см), Silufol UV-254 (силікагель, підложка – фольга, зв'язуюча речовина – крохмаль, розмір пластинок 10x10 см) та рухомих фаз, наведених в табл. 1. Як проявник есциталопраму на хроматографічних пластинках використовували реактив Драгендорфа у модифікації за Мун'є.

Реакції забарвлення здійснювали на шматочках хроматографічних пластинок з хлороформними розчинами есциталопраму (вміст речовини від 0,5 до 25 мкг у пробі). Як реагенти використовували наступні кольорові реактиви [3]: Ердмана, Манделіна, Лібермана, Фреде, Маркі, концентровані кислоти нітратну, сульфатну, хлоридну.

УФ-спектри абсорбції есциталопраму оксалату в метанолі знімали на спектрофотометрі СФ-46 (СРСР) у діапазоні довжин хвиль 200–350 нм у кюветі з шаром завтовшки 10 мм; як розчин порівняння використовували метанол.

Для УФ-спектрофотометричного визначення есциталопраму використовували абсорбцію за довжини хвилі 238 нм.

*Методика побудови градуовального графіка для УФ-спектрофотометричного визначення есциталопраму оксалату.*

Розчини есциталопраму оксалату 1–10 готували наступним чином: 0,0015 г досліджуваної речовини вносили в мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняли у метанолі та доводили об'єм розчину до мітки вказаним розчинником (стандартний розчин з концентрацією 30 мкг/мл). У мірні колби місткістю 10 мл вносили 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 та 10,0 мл стандартного розчину і доводили об'єми розчинів до мітки метанолом (розчини 1–10 відповідно, концентрація – 3,0; 6,0; 9,0; 12,0; 15,0; 18,0; 21,0; 24,0; 27,0 та 30,0 мкг/мл). Вимірювали оптичну густину і встановлювали градуовальну залежність оптичної густини від концентрації.

*Методика побудови градуовального графіка для екстракційно-спектрофотометричного визначення есциталопраму оксалату.*

0,0200 г есциталопраму оксалату вносили в мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняли у хлороформі та доводили об'єм розчину до мітки вказаним розчинником (стандартний розчин з концентрацією 400 мкг/мл).

У ділильну лійку вносили 5,0 мл ацетатного буферного розчину з рН 4,6, 5,0 мл 0,05% розчину метилового оранжевого та по 0,05; 0,1; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,45; 0,50; 0,55 мл стандартного розчину есциталопраму оксалату відповідно. В усіх випадках об'єм хлороформних розчинів доводили до 1 мл. До отриманої суміші додавали 15 мл хлороформу. Суміш у ділильній лійці струшували протягом 10 хв за допомогою механічного струшувача і залишали на 10 хв для розділення шарів. Збирали 14 мл хлороформного шару, відкидаючи його першу порцію (близько 1 мл), і додавали до нього 2 мл 1% розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі. Одержану суміш ретельно перемішували та визначали оптичну густину на спектрофотометрі СФ-46 за  $\lambda_{\max} = 540$  нм, використовуючи кювету з шаром рідини завтовшки 10 мм. Як розчин порівняння застосовували хлороформ. Величину рН буферного розчину контролювали потенціометрично. Вимірювали оптичну густину і встановлювали градуовальну залежність оптичної густини від концентрації.

### **Результати дослідження та обговорення**

На підставі експериментальних досліджень встановлені значення  $R_f$  есциталопраму у різних рухомих фазах та тонких шарах сорбенту, які наведені в табл. 1.

Значення  $R_f$  есциталопраму у різних рухомих фазах та тонких шарах

№ з/п	Рухомі фази	Значення $R_f$ есциталопраму			
		ВЕТШХ	Сорбфіл	Мерк	Силуфол
1	Метанол–25% розчин амонію гідроксиду (100:1,5)	0,52	0,52	0,30	0,25
2	Хлороформ–метанол (90:10)	0,28	0,27	0,12	0,06
3	Етилацетат–метанол–25% розчин амонію гідроксиду (85:10:5)	0,95	0,87	0,53	0,70
4	Метанол– <i>n</i> -бутанол (60:40)	0,08	0,17	0,13	0,05
5	Метанол	0,15	0,21	0,15	0,12
6	Етилацетат	0,00	0,00	0,00	0,00
7	Циклогексан–толуен–діетиламін (75:15:10)	0,50	0,57	0,57	0,45
8	Ацетон	0,13	0,11	0,16	0,03
9	Хлороформ–ацетон (80:20)	0,00	0,00	0,00	0,00
10	Хлороформ– <i>n</i> -бутанол–25% розчин амонію гідроксиду (70:40:5)	0,96	0,94	0,97	0,97
11	Гексан– <i>i</i> -пропанол–25% розчин амонію гідроксиду (24:6:0,3)	0,55	0,61	0,67	0,38
12	Толуен–ацетон–етанол–25% розчин амонію гідроксиду (45:45:7,5:2,5)	0,60	0,55	0,57	0,47
13	Хлороформ–діоксан–ацетон–25% розчин амонію гідроксиду (47,5:45:5:2,5)	0,78	0,83	0,76	0,68
14	Хлороформ–ацетон–25% розчин амонію гідроксиду (12:24:1)	0,87	0,93	0,63	0,77
15	<i>n</i> -Бутанол–кислота ацетатна–вода (4:0,5:1)	0,02	0,05	0,03	0,02
16	Етилацетат–ацетон–25% розчин амонію гідроксиду (50:45:5)	0,93	0,96	0,77	0,67
17	Бензен–метанол–діетиламін (90:10:10)	0,96	0,91	0,90	0,87
18	Гексан–етилацетат–етанол–25% розчин амонію гідроксиду (30:10:5:1)	0,51	0,65	0,53	0,55
19	Етанол–ацетон–вода (1:1:2)	0,16	0,13	0,18	0,13
20	Гексан–толуен–діетиламін (75:15:10)	0,55	0,60	0,55	0,53
21	Хлороформ	0,00	0,00	0,00	0,00
22	Етилацетат–метанол–25% розчин амонію гідроксиду (85:10:2,5)	0,76	0,82	0,75	0,60
23	Хлороформ–ацетон–25% розчин амонію гідроксиду (25:5:0,3)	0,55	0,61	0,57	0,23
24	Хлороформ–гексан–етанол (1:1:1)	0,17	0,08	0,08	0,22

Насамперед нами була досліджена можливість виявлення есциталопраму на етапі загального ТШХ-скринінгу психотропних речовин у рухомих фазах, що рекомендовані Міжнародним комітетом з систематичного токсикологічного аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів (рухомі фази № 1–9) [3]. Використання декількох хроматографічних систем (не менше трьох) з низькою кореляцією значень  $R_f$  для досліджуваної речовини дає підставу для надійного детектування токсичних доз цієї речовини [3]. Щодо есциталопраму, комбінації систем № 1, 2, 3; 7, 8, 10 та інші відповідають вказаним вимогам. Досліджені нами інші рухомі фази (№ 10–24) також знайшли широке використання у хіміко-токсикологічному аналізі лікарських речовин основного характеру [3]. Рухомі фази, в яких значення  $R_f$  есциталопраму лежить у межах 0,3–0,7 (№ 12, 18, 20, 23), можуть бути рекомендовані для використання на підтверджуючому етапі ТШХ-скринінгу.

Під час детектування есциталопраму на хроматографічних пластинках реактивом Драгендорфа у модифікації за Мун'є спостерігали жовтогарячий колір плям препарату на жовтому фоні. Чутливість виявлення есциталопраму у цьому разі становила 1,0 мкг препарату в пробі.

Встановлено, що есциталопрам утворює забарвлення із вищезазначених кольорових реактивів лише з реактивами Фреде (коричнево-зелене, чутливість 3 мкг у пробі) та Маркі (жовтувато-коричневе, чутливість 5 мкг в пробі).

УФ-спектр абсорбції есциталопраму в метанолі характеризується наявністю шести максимумів світлопоглинання (рисунок), для яких нами були визначені питомі та молярні коефіцієнти світлопоглинання за наступних довжин хвиль ( $\lambda_{\max}$ ):  $207 \pm 2$  ( $A_1^1 = 547,0$ ;  $\epsilon = 22700$ ),  $238 \pm 2$  ( $A_1^1 = 387,3$ ;  $\epsilon = 16075$ ),  $265 \pm 2$  ( $A_1^1 = 49,7$ ;  $\epsilon = 2060$ ),  $271 \pm 2$  ( $A_1^1 = 49,7$ ;  $\epsilon = 2060$ ),  $274 \pm 2$  ( $A_1^1 = 49,0$ ;  $\epsilon = 2032$ ) та  $284 \pm 2$  нм ( $A_1^1 = 42,2$ ;  $\epsilon = 1748$ ).

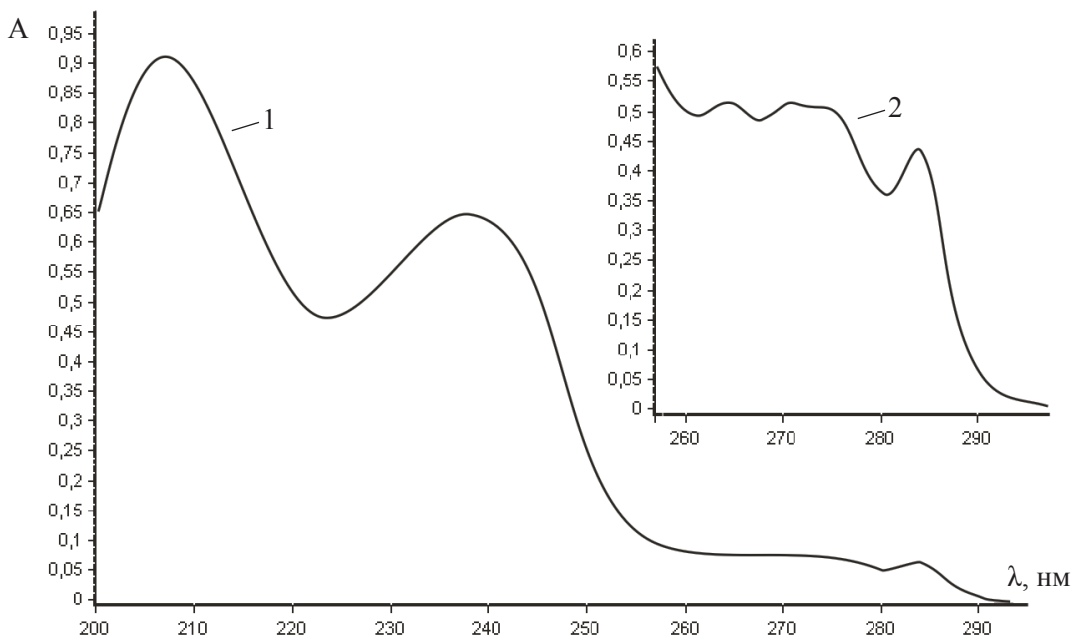


Рис. УФ-спектр світлопоглинання есциталопраму оксалату в метанолі (1 – концентрація  $4 \cdot 10^{-5}$  моль/л; 2 – концентрація  $2,5 \cdot 10^{-4}$  моль/л)

Для розроблення методики екстракційно-спектрофотометричного визначення есциталопраму попередньо нами було встановлено, що кислотний азобарвник – метиловий оранжевий (0,05% водний розчин) утворює з есциталопрамом у середовищі ацетатного буферного розчину з рН 4,6 іонний асоціат, який екстрагується хлороформом. Забарвлення розчинів іонних асоціатів виявилось малоінтенсивним, тому для підсилення чутливості методу утворені іонні асоціати руйнували додаванням до їх хлороформних розчинів 1% розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі. У цьому разі одержували розчини, що мали значно вищу оптичну густину.

Було встановлено також оптимальні умови екстракційно-спектрофотометричного визначення есциталопраму: об'єми розчину метилового оранжевого, ацетатного буферного розчину та хлороформу, кількість екстракцій іонного асоціату відповідним органічним розчинником, а також оптимальне значення рН буферного розчину, для чого нами було виготовлено ряд ацетатних буферних розчинів з рН від 3,0 до 6,0. Отримані результати було покладено в основу вищенаведеної методики екстракційно-спектрофотометричного визначення есциталопраму, згідно з якою була встанов-

лена відповідна градувальна залежність.

Для розрахунку вмісту есциталопраму в модельних розчинах УФ-спектрофотометричним та екстракційно-спектрофотометричним методами використовували рівняння (1) та (2) градувальних залежностей, відповідно, які мали вигляд:

$$A = 0,417C - 0,03 \quad (1)$$

$$A = 0,00512C, \quad (2)$$

де  $A$  – оптична густина;

$C$  – концентрація розчину есциталопраму, відповідно, мкг/мл та мкг в пробі.

Загальний вигляд вищенаведених рівнянь відповідає лінійній регресії виду:  $y = bx + a$ . Значення параметрів  $a$  та  $b$  розраховували за методом найменших квадратів [1]. Метрологічні характеристики отриманих градувальних залежностей наведено в табл. 2. Після перевірки значущості параметру  $a$  у рівнянні (2) [1] було зроблено висновок про можливість переходу до рівняння виду:  $y = b'x$ .

Т а б л и ц я 2

**Метрологічні характеристики градувальної залежності оптичної густини, отриманої спектральними методами, від вмісту есциталопраму ( $y = bx + a$ )**

Метод	$r$	$b$	$a$	$S^2$	$\Delta b$	$\Delta a$
УФ-спектрофотометричний	0,9998	0,417	-0,03	$2 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-4}$	0,01
Екстракційно-спектрофотометричний	0,9990	0,00512	-	$2 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-5}$	-

Світлопоглинання розчинів підлягало закону Бугера–Ламберта–Бера в межах концентрацій від 3 до 30 мкг/мл (УФ-спектрофотометричний метод) та від 20 до 220 мкг есциталопраму у пробі в 15 мл кінцевого об'єму (екстракційно-спектрофотометричний метод).

Результати кількісного визначення есциталопраму у модельних розчинах УФ-спектрофотометричним та екстракційно-спектрофотометричним методами наведено в табл. 3 та 4 відповідно.

Т а б л и ц я 3

**Результати УФ-спектрофотометричного визначення есциталопраму в модельних розчинах ( $n=5$ )**

Взято есциталопраму, мкг	Оптична густина	Знайдено есциталопраму		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
3	0,094	2,9	95,7	$\bar{X} = 99,5$ $S = 3,2$ $S_{\bar{x}} = 1,0$ $\Delta \bar{X} = 2,1 \quad \varepsilon = 2,1$ $\bar{X} \pm \Delta \bar{X} = 99,5 \pm 2,1$
6	0,204	5,8	97,2	
9	0,331	9,3	103,5	
12	0,452	11,7	98,1	
15	0,583	14,6	97,5	
18	0,711	17,3	96,2	
21	0,842	21,5	102,3	
24	0,974	24,9	103,7	
27	1,091	26,5	98,1	
30	1,222	30,8	102,8	

**Результати екстракційно-спектрофотометричного визначення  
есциталопраму за реакцією утворення іонного асоціату з метиловим  
оранжевим у модельних розчинах (n=5)**

Взято есциталопраму, мкг	Оптична густина	Знайдено есциталопраму		Метрологічні характе- ристики
		мкг	%	
20	0,101	20,5	102,4	$\bar{X} = 99,5$ $S = 2,4$ $S_{\bar{x}} = 0,8$ $\Delta\bar{X} = 1,6 \quad \varepsilon = 1,6$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 99,5 \pm 1,6$
40	0,198	39,0	97,5	
60	0,313	59,0	98,3	
80	0,420	82,7	103,2	
100	0,507	96,1	96,1	
120	0,605	122,6	102,2	
140	0,711	136,2	97,3	
160	0,826	157,4	98,4	
180	0,922	182,2	101,2	
200	1,025	195,6	97,8	
220	1,113	221,3	100,6	

Як видно, відносна невизначеність середнього результату для УФ-спектрофотометричного методу становила  $\pm 2,1\%$ , для екстракційно-спектрофотометричного –  $\pm 1,6\%$ .

### Висновки

1. Вивчено хроматографічну поведінку, кольорові реакції виявлення есциталопраму у загальних та деяких часткових рухомих фазах, загальноприйнятих у токсикологічному скринінгу речовин основного характеру з використанням чотирьох типів тонких шарів, які дають змогу використання отриманих даних в практиці хіміко-токсикологічного дослідження на есциталопрямі, та УФ-спектри поглинання есциталопраму в метанолі.

2. Розроблено методики УФ-спектрофотометричного та екстракційно-спектрофотометричного (за реакцією з метиловим оранжевим) визначення есциталопраму. Встановлено, що світлопоглинання розчинів підлягає закону Бугера–Ламберта–Бера в межах концентрацій від 3 до 30 мкг/мл (УФ-спектрофотометричний метод) та від 20 до 220 мкг есциталопраму у пробі в 15 мл кінцевого об'єму (екстракційно-спектрофотометричний метод). Відносна невизначеність середнього результату становила для запропонованих методів  $\pm 2,1\%$  та  $\pm 1,6\%$  відповідно.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Болотов В. В., Свєтнікова О. М., Колісник С. В. Аналітична хімія: Навч. посіб. для фармац. вузів та ф-тів III–IV рівня акредитації та ін. – Харків: Вид-во НФаУ «Оригінал», 2004. – 480 с.
2. Вергейчик Т. Х. Токсикологическая химия. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 400 с.
3. Jickells S., Negrusz A. Clarke's Analytical Forensic Toxicology. – London: Pharmaceutical Press, 2008. – 648 p.
4. Frison G., Favretto D., Vogliardi S. et al. Quantification of citalopram or escitalopram and their demethylated metabolites in neonatal hair samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // Ther. Drug Monit. – 2008. – V. 30, N 4. – P. 467–473.
5. Haupt D. Determination of citalopram enantiomers in human plasma by liquid chromatographic separation on a chiral-AGP column. // J. Chrom. B. – 1996. – V. 685. – P. 299–305.

6. Kennedy S. H., Andersen H. F., Thase M. E. Escitalopram in the treatment of major depressive disorder: A meta-analysis // *Curr. Med. Res. Opin.* – 2009. – V. 25, N 1. – P. 161–175.

7. McKenzie M. S., McFarland B. H. Trends in antidepressant overdoses. // *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* – 2007. – V. 16, N 5. – P. 513–523.

8. Rahme E., Dasgupta K., Turecki G. et al. Risks of suicide and poisoning among elderly patients prescribed selective serotonin reuptake inhibitors: A retrospective cohort study // *J. Clin Psychiatry.* – 2008. – V. 69, N 3. – P. 349–357.

9. Sankaranarayanan J., Puumala S. E. Epidemiology and characteristics of emergency department visits by US adults with psychiatric disorder and antipsychotic 2000 to 2004 // *Curr. Med. Res. Opin.* – 2007. – V. 23, N 6. – P. 1375–1385.

10. Sclar D. A. Epidemiology of depression and the prescribing of antidepressant pharmacotherapy // *ASHP Midyear Clinical Meeting.* – 2000. – V. 35. – P. 81.

Надійшла до редакції 20.09.2012.

*C. B. Байурка, В. В. Болотов, С. А. Карпушина, М. Н. Ивашюра*

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭСЦИТАЛОПРАМА, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ ХИМИКО-  
ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

**Ключевые слова:** эсциталопрам, тонкослойная хроматография, цветные реакции, УФ-спектрофотометрия, экстракционная спектрофотометрия

Р Е З Ю М Е

Изучены условия идентификации эсциталопрама с помощью тонкослойной хроматографии, цветных реакций, УФ-спектроскопии. Разработаны методики УФ-спектрофотометрического и экстракционно-спектрофотометрического (по реакции с метиловым оранжевым) определения эсциталопрама. Относительная неопределенность среднего результата для предложенных методов составляла  $\pm 2,1\%$  и  $\pm 1,6\%$  соответственно.

*S. V. Baiurka, V. V. Bolotov, S. A. Karpushina, M. N. Ivashura*

DEVELOPMENT OF IDENTIFICATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION METHODS  
OF ESCITALOPRAM SUITABLE  
FOR THE CHEMICAL AND TOXICOLOGICAL ANALYSIS

**Key words:** escitalopram, Thin Layer Chromatography, colour reactions, UV-spectrophotometry, extraction spectrophotometry

S U M M A R Y

The conditions of escitalopram identification by means of the Thin Layer Chromatography, colour reactions, UV-spectroscopy have been studied. The methods of UV-spectrophotometry and extraction spectrophotometry (by the reaction with methyl orange) of escitalopram quantitative determination have been developed. The relative error of the proposed methods was  $\pm 2.1\%$  and  $\pm 1.6\%$  respectively.