

УДК 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

С.В. БАЮРКА, С.А. КАРПУШИНА, А.М. СЕМЕНОВ

Національний фармацевтичний університет

РОЗРОБКА МЕТОДІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ПАРОКСЕТИНУ, ПРИДАТНИХ ДЛЯ ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНОГО АНАЛІЗУ

Розроблені методи ідентифікації та кількісного визначення нового антидепресивного засобу пароксетину за допомогою тонкошарової хроматографії, кольорових реакцій, УФ-спектрофотометрії та екстракційної спектрофотометрії у видимій області.

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

ВСТУП

Пароксетин ((3S-транс)-3-[(1,3-бензодіоксол-5-ілокси)метил]-4-(4-фторофеніл)-піперидину гідрохлорид гемігідрат) – антидепресант, який широко застосовується в сучасній медичній практиці [5, 7] та проявляє найвищий рівень селективного інгібування зворотнього нейронального захвату серотоніну (СІЗНЗС) серед лікарських засобів вказаної фармакологічної групи [19]. Антидепресанти, що відносяться до групи СІЗНЗС, неодноразово були причиною гострих та смертельних отруень [10, 14, 15]. Зокрема, для пароксетину відзначені такі побічні ефекти як гостра гепатотоксичність [18], звикання, агресія та розвиток суїцидальної поведінки [13, 23]. Зафіксовані випадки смертельних отруень пароксетином [20, 24]. Тому розробка методів хіміко-токсикологічного аналізу пароксетину є актуальною задачею.

Були запропоновані скринінгові системи для виявлення пароксетину за допомогою методу тонкошарової хроматографії [12], але перелік наведених рухомих фаз обмежений. На наш погляд, доцільно провести хроматографічне дослідження пароксетину з використанням рухомих фаз, рекомендованих Міжнародним комітетом з систематичного токсикологічного аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів [2].

Були опрацьовані методики аналізу пароксетину в плазмі за допомогою газорідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням (ГРХ-МС) [12, 16, 19], високоефектив-

ної рідинної хроматографії з флуоресцентним детектором [12, 17], рідинної хроматографії (РХ) з МС-детектуванням [21, 25], а також сполучення РХ з тандемною мас-спектрометрією (РХ-МС-МС) [11, 22]. Вищеперелічені методики характеризуються високою чутливістю та специфічністю, але потребують ретельної підготовки проби до аналізу, зокрема, з використанням твердофазної екстракції [11, 17, 21] та спеціального дорогого обладнання, що робить їх малодоступними.

Метою нашого дослідження було визначення умов виявлення, ідентифікації та кількісного визначення пароксетину за допомогою доступних та широко впроваджених у практику хіміко-токсикологічного аналізу методів [4, 12]: тонкошарової хроматографії, хімічних реакцій, УФ-спектрофотометрії та екстракційної спектрофотометрії у видимій області.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

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 – 20×20 см), Sorbfil (силікагель СТХ-1 ВЕ, тип підложки – ПЕТФ, зв'язуюча речовина – силіказоль, фракція – 8÷12 мкм, товщина шару – 100 мкм, розмір пластинок – 10×10 см), Merck виробництва Німеччини (силікагель GF₂₅₄, розмір пластинок – 10×20 см), Silufol UV-254 (силікагель, підложка – фольга, зв'язуюча речовина – крохмаль, розмір пластинок – 10×10 см) та рухомих фаз, які наведені в табл. 1. Як проявник пароксетину на хроматографічних пластинках

© С.В. Баюрка, С.А. Карпушина, С.М. Семенов, 2012

ЗНАЧЕННЯ Rf ПАРОКСЕТИНУ У РІЗНИХ РУХОМИХ ФАЗАХ ТА ТОНКИХ ШАРАХ

№ п/п	Рухомі фази	Значення Rf пароксетину			
		ВЕТШХ	сорбфіл	Мерк	силуфол
1	Метанол-25 % розчин амонію гідроксиду (100:1,5)	0,33	0,34	0,17	0,16
2	Хлороформ-метанол (90:10)	0,14	0,21	0,02	0,03
3	Етилацетат-метанол-25 % розчин амонію гідроксиду (85:10:5)	0,81	0,78	0,68	0,71
4	Хлороформ- <i>n</i> -бутанол-25 % розчин амонію гідроксиду (70:40:5)	0,88	0,78	0,97	0,96
5	Метанол- <i>n</i> -бутанол (60:40)	0,11	0,15	0,12	0,07
6	Метанол	0,10	0,10	0,12	0,07
7	Ацетон	0	0	0	0
8	Етилацетат	0	0	0	0
9	Циклогексан-толуен-діетиламін (75:15:10)	0,15	0,12	0,17	0,10
10	Гексан- <i>i</i> -пропанол-25 % розчин амонію гідроксиду (24:6:0,3)	0,26	0,37	0,28	0,13
11	Толуен-ацетон-етанол-25 % розчин амонію гідроксиду (45:45:7,5:2,5)	0,61	0,66	0,68	0,57
12	Хлороформ-діоксан-ацетон-25 % розчин амонію гідроксиду (47,5:45:5:2,5)	0,48	0,53	0,45	0,56
13	Хлороформ-ацетон-25 % розчин амонію гідроксиду (12:24:1)	0,52	0,60	0,41	0,50
14	Хлороформ-ацетон-25 % розчин амонію гідроксиду (25:5:0,3)	0,26	0,28	0,22	0,15
15	<i>n</i> -Бутанол-кислота ацетатна-вода (4:0,5:1)	0,10	0,17	0,11	0,16
16	Етилацетат-ацетон-25 % розчин амонію гідроксиду (50:45:5)	0,63	0,58	0,62	0,67
17	Етилацетат-метанол-25 % розчин амонію гідроксиду (85:10:2,5)	0,46	0,42	0,43	0,22
18	Бензен-метанол-діетиламін (90:10:10)	0,85	0,90	0,82	0,87
19	Гексан-етилацетат-етанол-25 % розчин амонію гідроксиду (30:10:5:1)	0,23	0,30	0,21	0,16
20	Етанол-ацетон-вода (1:1:2)	0,22	0,25	0,21	0,18
21	Гексан-толуен-діетиламін (75:15:10)	0,16	0,18	0,20	0,11
22	Хлороформ-гексан-етанол (1:1:1)	0,47	0,42	0,35	0,37
23	Хлороформ-ацетон (80:20)	0	0	0	0
24	Хлороформ	0	0	0	0

використовували реактив Драгендорфа у модифікації Муньє.

Кольорові реакції проводили у порцелянових чашках з хлороформними розчинами пароксетину (вміст речовини – від 0,1 до 20 мкг у пробі). Як реагенти використовували кольорові реактиви [4, 12]: концентровані кислоти сульфатну, нітратну, хлоридну, фосфатну, ацетатну, реактиви Маркі, Манделіна, Фреде, Лібермана, Ердмана.

УФ-спектри абсорбції пароксетину в 0,1 М розчині кислоти хлоридної знімали на спектрофотометрі 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.

Для УФ-спектрофотометричного визначення пароксетину використовували абсорбцію при довжині хвилі 293 нм.

Методика побудови градувального графіка для УФ-спектрофотометричного визначення пароксетину

Розчини пароксетину 1–11 готували наступним чином: 0,0100 г досліджуваної речовини вносили в мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняли у 0,1 М розчині кислоти хлоридної та дово-

дили об'єм розчину до мітки вказаним розчином кислоти (стандартний розчин з концентрацією 200 мкг/мл). У мірні колби місткістю 10 мл вносили 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 та 5,5 мл стандартного розчину і доводили об'єми розчинів до мітки 0,1 М розчином кислоти хлоридної (розчини 1–11, відповідно, концентрації – 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100 та 110 мкг/мл). Вимірювали оптичну густину і будували графік залежності оптичної густини від концентрації.

Методика побудови градувального графіка для екстракційно-спектрофотометричного визначення пароксетину

Розчини пароксетину 1–11 готували наступним чином: 0,0100 г пароксетину вносили в мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняли у хлороформі та доводили об'єм розчину до мітки вказаним розчинником (стандартний розчин з концентрацією 200 мкг/мл).

У ділільну лійку вносили 5,0 мл ацетатного буферного розчину з рН 4,6, 5,0 мл 0,05 % розчину метилового оранжевого та по 0,075; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 та 1,0 мл стандартного розчину пароксетину (вміст препарату в досліджуваних пробах становив, відповідно, 15;

20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180 та 200 мкг). В усіх випадках об'єм хлороформу доводили до 1 мл. До отриманої суміші додавали 15 мл хлороформу. Суміш у ділительній лійці струшували протягом 10 хв за допомогою механічного струшувача і залишали на 10 хв для розділення шарів. Збирали 14 мл хлороформного шару, відкидаючи 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 при $\lambda_{\text{max}} = 540$ нм, використовуючи кювету з товщиною шару рідини 10 мм. Як розчин порівняння застосовували хлороформ. Величину рН буферного розчину контролювали потенціометрично. Вимірювали оптичну густину і будували графік залежності оптичної густини від концентрації пароксетину.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати хроматографічного дослідження пароксетину наведені в табл. 1. Рухомі фази №1–9 рекомендовані Міжнародним комітетом з систематичного токсикологічного аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів. Рухомі фази №10–24 використовуються у хіміко-токсикологічному аналізі для виявлення лікарських речовин основного характеру методом тонкошарової хроматографії [8, 9].

При використанні реактиву Драгендорфа у модифікації Мунье, як проявника пароксетину на хроматографічних пластинках спостерігали оранжевий колір плям препарату на жовтому фоні. Чутливість виявлення пароксетину при цьому знаходилась у межах 0,5–1,0 мкг препарату в пробі. Найбільш чутливою для виявлення пароксетину методом ТШХ була пластинка Sorbfil (чутливість 0,5 мкг препарату в пробі).

Пароксетин утворював забарвлення з концентрованими кислотами: сульфатною (темно-зелене, чутливість 6,0 мкг препарату в пробі), нітратною (коричневе, що швидко зникало, 3,0 мкг), реактивами Маркі (жовтувате, 1,0 мкг), Манделіна (рожево-фіолетове, що переходило у синє, 1,0 мкг), Фреде (рожево-фіолетове, що переходило у зелене, 0,5 мкг), Лібермана (рожево-фіолетове, що переходило у коричневе, 1,0 мкг), Ердмана (рожево-фіолетове, що переходило у бурувате, а потім у жовте, 3,0 мкг). З іншими кольоровими реактивами, які вказані вище, пароксетин забарвлення не утворював.

УФ-спектр абсорбції пароксетину в 0,1 М розчині кислоти хлоридної мав чотири смуги поглинання при довжинах хвиль 233 ± 2 ; 265 ± 2 ; 272 ± 2 ; 293 ± 2 нм; питомі (A^1) та молярні (ϵ) коефіцієнти

світлопоглинання, відповідно, становили: 88 та 2908; 29 та 968; 38 та 1256; 90 та 2972.

Для розробки методики екстракційно-спектрофотометричного визначення пароксетину попередньо нами було встановлено, що кислотний азобарвник – метиловий оранжевий (0,05% водний розчин) утворював з пароксетином у середовищі ацетатного буферного розчину з рН 4,6 іонний асоціат, який екстрагувався 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. При цьому одержували розчини, що мали значно вищу оптичну густину.

Були визначені також оптимальні умови проведення екстракційно-спектрофотометричного визначення [3]: 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 8,0 [6].

Для кількісного визначення пароксетину в модельних розчинах УФ-спектрофотометричним та екстракційно-спектрофотометричним методами попередньо встановлювали градувальну залежність оптичної густини від концентрації, загальний вигляд якої описується рівнянням лінійної регресії виду: $y = bx + a$. Значення параметрів a та b розраховували за методом найменших квадратів [1]. Після перевірки значущості параметра a в отриманих рівняннях [1] було зроблено висновок про можливість переходу до рівняння виду $y = b'x$ для градувальної залежності екстракційно-спектрофотометричного визначення. Метрологічні характеристики отриманих градувальних залежностей наведені в табл. 2.

Таблиця 2

МЕТРОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГРАДУВАЛЬНОЇ ЗАЛЕЖНОСТІ ОПТИЧНОЇ ГУСТИНИ ВІД ВМІСТУ ПАРОКСЕТИНУ ($Y = VX + A$), ОТРИМАНОЇ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИМ ТА ЕКСТРАКЦІЙНО- СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИМ МЕТОДАМИ

Метод	r	b	a	S ²	Δb	Δa
УФ-спектрофотометричний	0,9993	0,0095	-0,02	10 ⁻⁴	2·10 ⁻⁴	0,01
Екстракційно-спектрофотометричний	0,998	0,00606	-	3·10 ⁻⁴	6·10 ⁻⁵	-

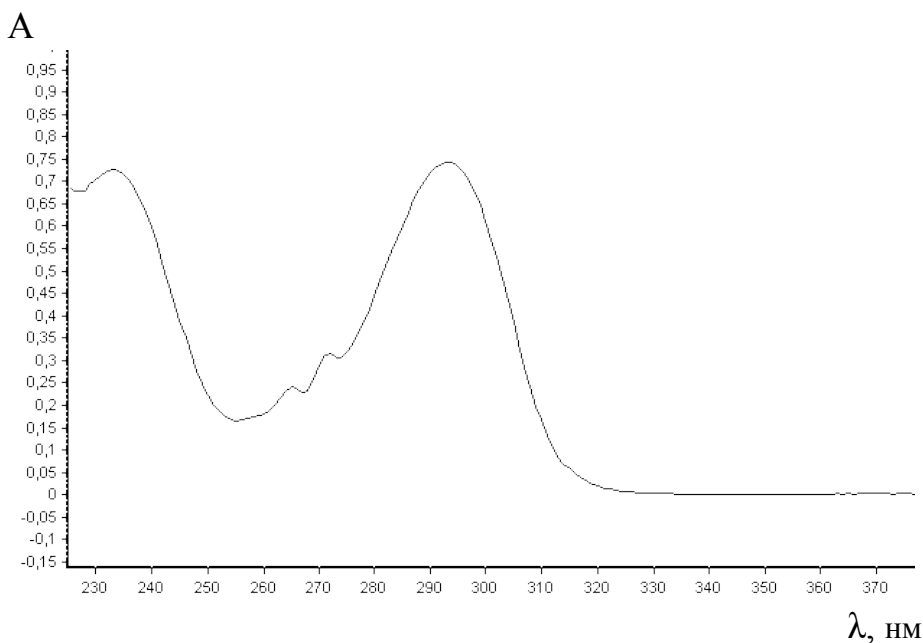


Рис. УФ-спектр світлопоглинання пароксетину гідрохлориду в 0,1 М розчині кислоти хлоридної (концентрація $2,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л).

Таким чином, рівняння градувальних залежностей для УФ-спектрофотометричного (1) та екстракційно-спектрофотометричного методів (2) мали вигляд:

$$A = 0,0095C - 0,02, \quad (1)$$

$$A = 0,00606C, \quad (2)$$

де: А – оптична густина;

С – концентрація розчину пароксетину, відповідно, мкг/мл або мкг в пробі.

Світлопоглинання розчинів підлягало закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 10 до 110 мкг / мл (УФ-спектрофотометричний метод) та від 15 до 200 мкг пароксетину в 15 мл кінцевого об'єму (екстракційно-спектрофотометричний метод), відносна невизначеність середнього результату становила $\pm 2,3\%$ та $\pm 2,8\%$ відповідно.

ВИСНОВКИ

1. Вивчено хроматографічну поведінку пароксетину у загальних та деяких часткових рухомих фазах, загальноприйнятих у токсикологічному скринінгу речовин основного характеру з використанням чотирьох типів тонких шарів.

2. Вивчено кольорові реакції виявлення пароксетину.

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

Розроблено методики УФ-спектрофотометричного та екстракційно-спектрофотометричного

го (за реакцією з метиловим оранжевим) кількісного визначення пароксетину. Світлопоглинання розчинів підлягало закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 10 до 110 мкг / мл (УФ-спектрофотометричний метод) та від 15 до 200 мкг пароксетину у пробі в 15 мл кінцевого об'єму (екстракційно-спектрофотометричний метод). Відносна невизначеність середнього результату складала для запропонованих методів $\pm 2,3\%$ та $\pm 2,8\%$ відповідно.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Алесковський В.Б. Физико-химические методы анализа. Практическое руководство: [учебн. пособие для вузов] / В.Б. Алесковський, В.В. Браун, М.И. Булатов и др.; Под ред. В.Б. Алесковского. – Л.: Химия, 1988. – 376 с.
2. Еремін С.К. Анализ наркотических средств / С.К. Еремін, Б.Н. Изотов, Н.В. Веселовская. – М.: Мысль, 1993. – 272 с.
3. Коренман И.М. Фотометрический анализ; Методы определения органических соединений. Изд. 2-е; перераб. и доп. / И.М. Коренман. – М.: Химия, 1975. – 359 с.
4. Крамаренко В.П. Токсикологічна хімія / В.П. Крамаренко. – К.: Вища шк., 1995. – 423 с.
5. Крылов В.И. Антидепрессанты в общей медицинской практике. Эффективность и безопасность терапии / В.И. Крылов // ФАРМиндекс-Практик. – 2003. – Вып. 5. – С. 22-32.

6. Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии / Ю.Ю. Лурье. – М.: Химия, 1989. – 448 с.
7. Машковский М.Д. Лекарственные средства: 15-е изд. / М.Д. Машковский. – М.: ООО «Издательство Новая Волна», 2006. – С. 106.
8. Николаева Э.Г. Изолирование амитриптилина из трупного материала ацетонитрилом / Э. Г. Николаева // СМЭ. – 1990. – Т. 33, №1. – С. 39-40.
9. Чернова Л.В. Химико-токсикологический анализ комбинированных отравлений некоторыми психотропными препаратами трициклической структуры / Л.В. Чернова, В.А. Карташов, Е.Ю. Коншина // СМЭ. – 1991. – Т. 34, №1. – С. 34-36.
10. Bateman N.D. Antidepressants: Poisonous substances / N.D. Bateman. – Amsterdam: Elsevier, 2007. – P. 587-589.
11. 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. – Vol. 1160, №1. – P. 3-12.
12. Clark's analysis of Drugs and Poisons: 3rd ed. [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.
13. Cotton S. Soundbite molecules / S. Cotton // Educ. Chem. – 2003. – Vol. 40, №5. – P. 117.
14. 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.
15. Jönsson A., Holmgren P., Ahlner J. Fatal intoxications in a Swedish forensic autopsy material during 1992–2002 // Forens. Sci. Int. – 2004. – Vol. 143. – P. 53-59.
16. Leis H.J. Improved sample preparation for the quantitative analysis of paroxetine in human plasma by stable isotope dilution ion chemical ionisation gas chromatography-mass spectrometry / H.J. Leis, W. Windischhofer, G. Fauler // J. Chrom. B. – 2002. – Vol. 779. – P. 353–357.
17. Mandrioli R. Determination of the antidepressant paroxetine and its three main metabolites in human plasma by liquid chromatography with fluorescence detection / R. Mandrioli, L. Mercolini, A. Ferranti et al. // Anal. chim. acta. – 2007. –Vol. 591. – P. 141-147.
18. Odeh M. Severe hepatotoxicity with jaundice associated with paroxetine / M. Odeh, I. Misselevich, J.H. Boss et al // Am. J. Gastroenterol. – 2001. – Vol. 96. – P. 2494-2496.
19. Segura M. Synthesis of the major metabolites of Paroxetine / M. Segura, L. Roura, R. de la Torre et al. // Bioorg. Chem. – 2003. –Vol. 31. – P. 248-258.
20. Singer P.P. An uncommon fatality due to moclobemide and paroxetine / P.P. Singer, G.R. Jones // J. Anal. Tox. – 1997. – Vol. 21. – P. 518-520.
21. 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. – Vol. 162. – P. 108–112.
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. – Vol. 492. – P. 171-186.
23. UK law firm sets up Seroxat Users Group // Scrip. World Pharm. News. – 2002. – № 2763. – P. 4.
24. Vermeulen T. Distribution of paroxetine in three postmortem cases // T. Vermeulen // J. Anal. Toxicol. – 1998. – Vol. 22. – P. 541-544.
25. Zhu Z. High performance liquid chromatography – mass spectrometry method for the determination of paroxetine in human plasma / Z. Zhu, L. Neirinck // J. Chrom. B. – 2002. – Vol. 780. – P. 295-300.

УДК 615.065:54.061/062:547.712.22:001.8

С.В. Баярка, С.А. Карпушина, А.Н. Семенов

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

Разработаны методы идентификации и количественного определения нового антидепрессивного средства пароксетина с помощью тонкослойной хроматографии, цветных реакций, УФ-спектрофотометрии и экстракционной спектрофотометрии в видимой области.

Ключевые слова: пароксетин; цветные реакции; тонкослойная хроматография; УФ-спектрография; экстракционная спектрофотометрия в видимой области; УФ-спектрофотометрия

UDC 615.065:54.061/062:547.712.22:001.8

S.V. Baiyrka, S.A. Karpushina, A.M. Semenov

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

The methods of identification and quantitative determination of a new antidepressant paroxetine, by means of thin layer chromatography, colour reactions, UV-spectrophotometry and extraction spectrophotometry in the visible region have been developed.

Key words: paroxetine; color reactions; thin layer chromatography; UV-spectrophotometry in the visible region; UV-spectrophotometry

Адреса для листування:
61068, м. Харків, вул. Блюхера, 4.
Кафедра токсикологічної,
хімії НФАУ.
Тел. (057) 67-91-92.

Надійшла до редакції:
20.12.2011