

Wybrane metody oznaczania fluoksetyny i fluwoksaminy

Some methods of determination of fluoxetine and fluvoxamine

Barbara Starczewska, Katarzyna Mielech, Ewa Kleszczewska

Z Zakładu Chemii Ogólnej i Nieorganicznej Uniwersytetu w Białymstoku
Kierownik prof. dr hab. H. Puzanowska-Tarasiewicz

Summary: Two selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) have been introduced: fluoxetine and fluvoxamine. The literature review shows most methods allow quantitative determination of SSRIs pharmaceutical preparations and plasma, in the lower ng/ml range and that they are, therefore, suitable for therapeutic drug monitoring purposes of this category of drugs. Most procedures are based on investigation of these drugs by spectrophotometric, electrochemical and chromatographic procedures with detection by various detectors.

Słowa klucze: fluoksetyna, fluwoksamina, metody oznaczania

Key words: fluoxetine, fluvoxamine, methods of determination

Wstęp

W poszukiwaniu „idealnego leku” przeciwdepresyjnego, obok stosowanych od ponad 30 lat leków trójpierścieniowych w terapii depresji, wprowadza się coraz częściej nowe specyfiki, tzw. leki przeciwdepresyjne II generacji. Grupa tych związków stale się powiększa o nowe preparaty.

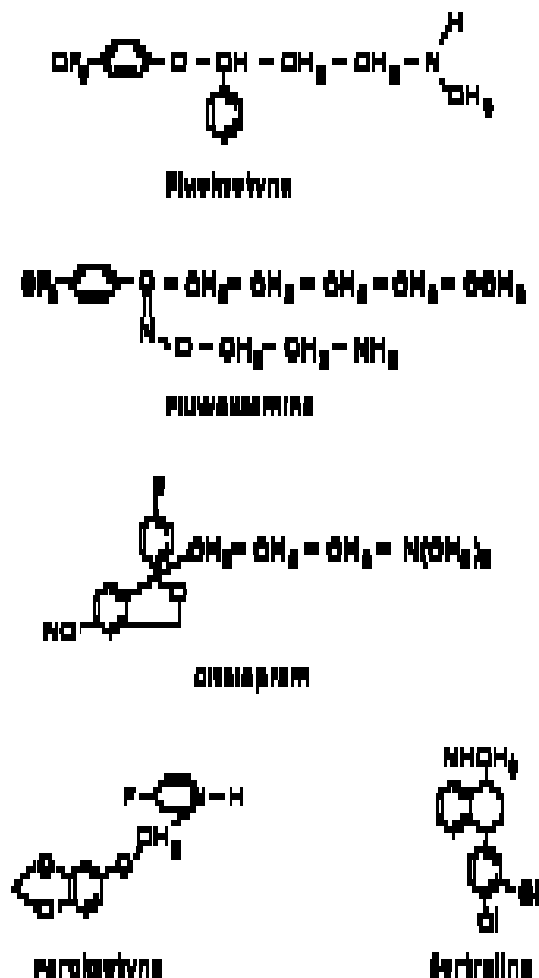
Wykorzystywanie tych związków w leczeniu psychiatrycznym stało się podstawą badań dotyczących właściwości analitycznych oraz opracowania nowych metod ich oznaczania. Celowość tych badań podyktowana jest potrzebami współczesnej terapii monitorowanej. Polega ona na prowadzeniu terapii z równoczesnym pomiarem stężeń podanego leku w płynach biologicznych. Wynik badania laboratoryjnego pozwala na ustalenie optymalnej dawki. Potrzeba prowadzenia terapii pod kontrolą stężenia leku we krwi wynika z dużych różnic osobniczych w intensywności reakcji farmakologicznej na podawane dawki leku. Zapewnia to bezpieczeństwo w trakcie ustalonego postępowania leczniczego. Monitorowanie jest metodą, w której przewiduje się pewien schemat postępowania leczniczego, w zależności od wyników badań klinicznych i laboratoryjnych. Dlatego też tak ważne jest opracowywanie prostych i czułych metod oznaczania leków stosowanych w terapii.

W prezentowanej pracy zestawiono niektóre właściwości fluoksetyny i fluwoksaminy oraz dokonano przeglądu dotychczas publikowanych metod ich oznaczania.

Budowa chemiczna i działanie farmakologiczne leków psychotropowych II generacji

Leki przeciwdepresyjne stanowią liczną grupę związków chemicznych o różnorodnej budowie i różnych, nie w pełni poznanych, mechanizmach działania. Kryterium zaliczenia leku do grupy „antidepressiva” jest jego lecznicze działanie w zespołach depresyjnych [1].

Jak już wspomniano, najczęściej stosowanymi środkami w leczeniu depresji są trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne (TLPD). Obok nich coraz częściej w praktyce klinicznej stosowane są leki o budowie innej niż trójpierścieniowa, określane jako „leki II generacji”. Do grupy tej należą: fluoksetyna, fluwoksamina, paroksetyna, sertralina, citalopram. Są to leki o budowie jednopierścieniowej, dwupierścieniowej i wielopierścieniowej. Struktura chemiczna tych związków pokazana jest na rys.1.



Rys.1 Struktura chemiczna selektywnych inhibitorów wychwytu serotoniny

Przedstawione na rys. 1 związki łatwo wchłaniają się z przewodu pokarmowego, osiągając maksymalne stężenie we krwi już po około 6 godzinach.

Fluwoksamina i paroksetyna są metabolizowane do związków nieczynnych pod względem działania psychotropowego. Fluoksetyna w drodze N-metylacji ulega przemianom w norfluoksetynę, sertralina jest demetylowana do dezmetylosertraliny, citalopram do dezmetylotalopramu. Metabolity te również hamują wychwyt doneuronalny serotoniny [2].

Szybkość eliminowania z ustroju poszczególnych leków jest różna. Najkrótszy okres biologicznego półtrwania wykazuje fluwoksamina (15 godzin), najdłuższy – fluoksetyna (84 godziny). Okres półtrwania metabolitu fluoksetyny – norfluoksetyny wynosi aż 9 dni [3].

Profil psychotropowy poszczególnych selektywnych inhibitorów wychwyty serotoniny wykazuje różnicowanie: fluwoksamina i paroksetyna są podobne w działaniu do amitryptyliny i doksepy (wyraźne działanie sedatywne i przeciwłękowe), pozostałe, zwłaszcza fluoksetyna, bardziej przypominają profil imipraminy (działanie „odhamowujące”).

Na podstawie danych z literatury [4, 2] i badań klinicznych można przyjąć, że głównym wskazaniem do stosowania selektywnych inhibitorów wychwyty serotoniny w zaburzeniach afektywnych są łagodne i średnio nasilone stany depresyjne. Leki z omawianej grupy można z powodzeniem zalecać w leczeniu ambulatoryjnym. Oprócz leczenia nimi depresji, podejmowane są próby długoterminowego stosowania ich w zapobieganiu nawracającym zaburzeniom depresyjnym, a także w innych chorobach, takich jak: zaburzenia lękowe, otyłość, natręctwa, zachowania impulsywne, agresywne, zaburzenia osobowości, uzależnienia od nikotyny i alkoholu [5].

W przeciwieństwie do TLPD, wiedza o właściwościach leków II generacji jest wciąż niepełna. Dotyczy to również występowania objawów niepożądanych i interakcji z innymi lekami. Mimo to, wprowadzenie tej grupy związków do leczenia stanowi postęp w leczeniu depresji i wiąże się głównie z większym bezpieczeństwem terapii [6, 7, 8].

Leki zaliczane do grupy selektywnych inhibitorów wychwyty serotoniny nie przewyższają klasycznych leków psychotropowych pod względem efektywności działania przeciwdepresyjnego, nie oznacza to jednak, że chorzy nie mogą reagować lepiej na określony lek z tej grupy niż na TLPD [9, 10, 11, 12].

Właściwości chemiczne fluoksetyny i fluwoksaminy

Fluoksetyna (FLU) została zsyntetyzowana w 1974 roku w formie szczawianu fluoksetyny. Do leczenia depresji została wprowadzona w 1987 roku w postaci innej soli – chlorowodoru fluoksetyny. Chlorowodorek fluoksetyny zawiera nie mniej niż 98% i nie więcej niż 101,5% chlorowodoru (R,S) – metylo[3 fenylo-3(4-trifluorometylofenoksy)] propyloaminy, obliczonego z odnośnika bezwodnej i wolnej od acetonitrylu substancji [13].

Chlorowodorek fluoksetyny jest to biały lub prawie biały krystaliczny proszek (puder), trudno rozpuszczalny w wodzie i chlorku metylenu, natomiast łatwo rozpuszczalny w metanolu. Temperatura topnienia krystalicznej soli wynosi 158,4–158,9°C [14]. Wodny roztwór chlorowodoru fluoksetyny wykazuje pH w zakresie 4,5–6,5. Skręcalność optyczna roztworu waha się w granicach od $-0,05^\circ$ do $+0,05^\circ$ [13]. Fluoksetyna jest II-rzędową aminą, zazwyczaj dostępną jako mieszanina racemiczna, dlatego niezwykle ważne znaczenie ma farmakologia, metabolizm i farmakokinetyka izomerów fluoksetyny. Fluoksetyna występuje w dwóch formach: (S)-FLU i (R)-FLU. W organizmie jest demetylowana do norfluoksetyny, aktywnego metabolitu, który również występuje w dwóch odmianach izomerycznych: (S)-NFLU i (R)-NFLU. Enancjomery fluoksetyny wykazują zbliżony efekt działania psychotropowego jako selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny, jednak porównując obie odmiany (R)- i (S)- fluoksetyny stwierdzono, że odmiana (S)-FLU ma ponad 3 razy dłuższy czas trwania aktywnego (okres biologicznego półtrwania) w organizmie niż odmiana (R)-FLU, pomimo zbliżonego stężenia obu form, np. w mózgu szczurów. W przypadku (S)-NFLU efekt działania jest 16-krotnie większy, w porównaniu z formą (R) - NFLU. Różnice czasu biologicznego półtrwania pomiędzy izomerami fluoksetyny mogą być częściowo wyjaśnione sposobem przemiany (R)-fluoksetyny w nieaktywną (R)-norfluoksetynę. W przypadku fluoksetyny, jako klinicznie ważne składniki uwzględnia się (S)- i (R)- fluoksetynę oraz (S)-norfluoksetynę [15].

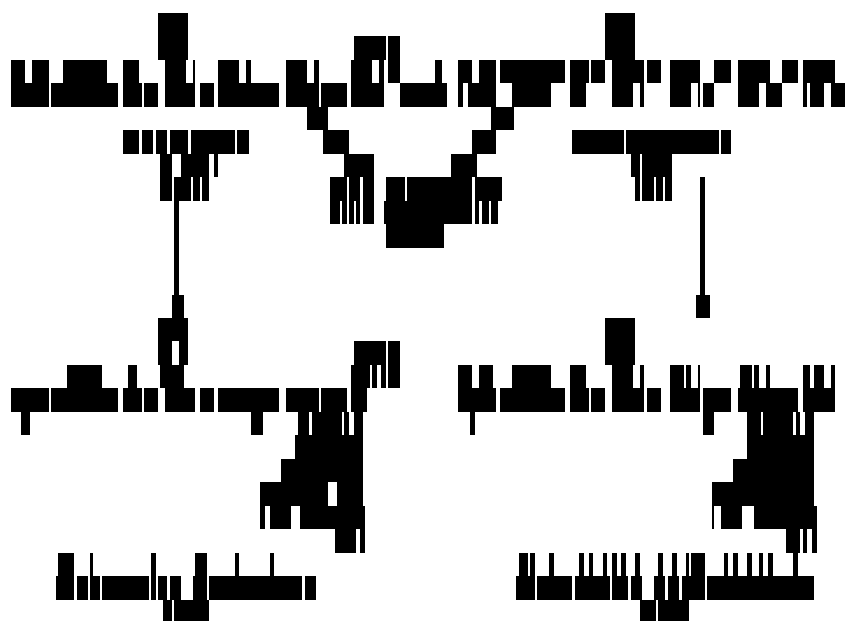
Rozdzielenie enancjomerów fluoksetyny i jej metabolitu oraz ich oznaczenie jest możliwe za pomocą technik chromatograficznych – HPLC oraz chromatografii gazowej (GC)[16, 17].

Cenne informacje na temat molekularnej struktury fluoksetyny dostarcza technika NMR. Metoda opracowana przez Komoroskiego [18] umożliwia wykonywanie i analizowanie widm NMR w materiale biologicznym osób przyjmujących fluoksetynę.

Fluoksetyna – pod względem budowy chemicznej: fenylotolylpropylamina – dobrze i całkowicie wchłania się z przewodu pokarmowego [19]. Osiąga maksymalne stężenie we krwi po 6 godzinach od przyjęcia pierwszej dawki. W moczu, oprócz fluoksetyny i norfluoksetyny, wykryto także inne niezidentyfikowane metabolity i sole kwasu glukuronowego [20] (rys. 2). Fluoksetyna ulega procesowi metabolicznemu, zgodnie z ogólnym modelem przemian przedstawionym przez Williamsa [za: 18]. W pierwszym etapie, w wyniku N-metylacji, powstaje metabolit obdarzony aktywnością biologiczną – norfluoksetyna. Etap II to reakcje sprzęgania z kwasem glukuronowym. Reakcje te prowadzą do powstania metabolitów pozbawionych aktywności biologicznej oraz przystosowanych do wydalania z organizmu.

Fluoksetyna jest obecnie dostępna w postaci następujących preparatów [21, 22]: Bioxetin, Fluctin, Fluctine, Prozac, Fluoxeren, Prozyn, Adofen, Docutrix, Reneuron.

Fluwoksamina (FLW) po raz pierwszy została zsyntetyzowana we Francji [12].



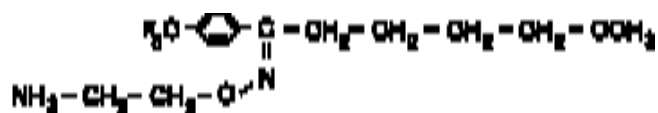
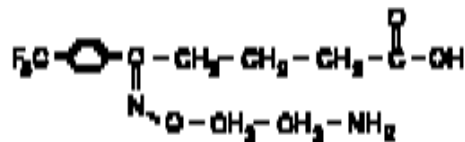
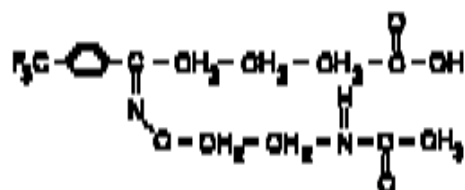
Rys. 2 Metabolity fluoksetyny zidentyfikowane w moczu po 35 dniach podawania [^{14}C]-fluoksetyny

Najczęściej występuje w postaci soli – maleinianu O-(2-aminoetylo)-oksymu(E)-5-metoksy-1-[4(trifluorometylo)-fenylo]-1-pentanonu. Jest bardzo szybko absorbowana po doustnym zażyciu. Maksymalny poziom tego leku w osoczu występuje po upływie 2–8 godzin po zażyciu. Okres biologicznego półtrwania wynosi około 15 godzin.

Fluwoksamina jest metabolizowana w wątrobie do nieczynnych metabolitów, które są wydalane z moczem. Za pomocą chromatograficznej metody opracowanej przez Pullena i wsp. [23] w moczu ludzkim zostały zidentyfikowane następujące metabolity fluwoksaminy: Z-izomer fluwoksaminy, kwas fluwoksaminowy, acetylowany kwas fluwoksaminowy (rys. 3).

Fluwoksamina jest aminą I-rzędową; jest lekiem achiralnym [24]. Obecnie znane są następujące preparaty maleinianu fluwoksaminy [21, 22]: Avoxin, Faverin, Fevarin, Floxyfral, Luvox, Dumirox.

Przegląd metod oznaczania fluoksetyny i fluwoksaminy

**Z-IZOMER****KWAS FLUWOKSAMINOWY****ACETYLOWANY
KWAS FLUWOKSAMINOWY**

Rys. 3 Metabolity fluoksaminy

Coraz szersze zastosowanie fluoksetyny i fluoksaminy w analizie klinicznej jest związane z koniecznością poszukiwań nowych metod oznaczania tych leków. W związku z tym, że leki z grupy selektywnych inhibitorów wychwyty serotoniny wykazują znaczne różnice w strukturze chemicznej, analityczne metody oznaczania są różne dla poszczególnych związków.

Metody oznaczania fluoksetyny i jej metabolitu norfluoksetyny

Z przeglądu literatury wynika, że do oznaczania chlorowodoru fluoksetyny, jak również jej aktywnego metabolitu – norfluoksetyny, zaproponowano szereg metod analitycznych. Wśród nich najczęściej stosowane są metody chromatograficzne. Fontanille i współpracownicy [25] zaproponowali oznaczanie fluoksetyny i norfluoksetyny w osoczu metodą kapilarnej chromatografii gazowej. Metoda ta umożliwia oznaczanie leku w zakresie 5–3000 ng/ml. Była ona stosowana do oznaczania fluoksetyny i norfluoksetyny w próbkach osocza. Uzyskane limity detekcji wynosiły 0,3 i 2 ng/ml, odpowiednio dla fluoksetyny i norfluoksetyny, natomiast współczynniki korelacji 0,996 dla FLU i 0,994 dla NFLU.

Kolejną metodą, zaproponowaną przez Lantza i wsp. [26], było zastosowanie kapilarnej chromatografii gazowej z detekcją ECD. W metodzie tej fluoksetyna i nor-

fluoksetyna były oznaczane w próbkach osocza ludzkiego z wykorzystaniem bezwodnika kwasu heptafluorymasłowego (HFBA). Granica oznaczania każdego z badanych składników nie przekraczała 5 ng/cm^3 . Badania trwałości FLU i NFLU wykazały, że oba oznaczane związki są trwałe w osoczu ludzkim do 96 godzin w temperaturze pokojowej i aż do 1 roku w temperaturze -20°C . Powyższa metoda jest stosowana do analiz farmakokinetycznych.

Inną metodę, umożliwiającą oznaczanie fluoksetyny w osoczu, zaproponowali Clausing i współpracownicy [27]. Umożliwia ona jednoczesne oznaczanie fluoksetyny, D-fenfluraminy oraz D-norfenfluraminy za pomocą chromatografii HPLC z detekcją fluorymetryczną. Uzyskany limit detekcji dla fluoksetyny w próbkach osocza wynosi $2 \text{ pmol/}\ell$, natomiast względne odchylenie standardowe $4,9\%$.

Suckow i współpracownicy [28] opracowali czułą i selektywną metodę oznaczania FLU i NFLU za pomocą chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną. Czynnikiem fluorescencyjnym jest chlorek dansylu (DNS-Cl), będący specyficznym odczynnikiem dla amin I- i II-rzędowych. Zastosowano chromatografię w odwróconym układzie faz. Fazę ruchomą stanowi bufor fosforanowy i acetonitryl. Wzorzec wewnętrzny oraz oznaczane składniki są wymywane z materiału endogennego w czasie krótszym niż 14 minut. Sporządzona krzywa wzorcowa miała charakter prostoliniowy w zakresie stężeń $25\text{--}800 \text{ ng/cm}^3$. Stwierdzono, że obecność środków przeciwdepresyjnych, w tym metabolitów leków, nie powoduje zakłóceń podczas oznaczania fluoksetyny. Jest to więc przydatna procedura analityczna do badań farmakokinetycznych.

Inną metodą umożliwiającą oznaczanie fluoksetyny bez konieczności uprzedniego przygotowania próbki jest procedura opisana przez Puopolo i Flooda [29]. Proponują oni oznaczenie tego związku w surowicy obok innych leków przeciwdepresyjnych, np. TLPD. Procedura opiera się na zastosowaniu chromatografii cieczowej z detekcją w nadfiolecie przy długości fali 254 nm .

Thomare [15] proponuje szybką, czułą i selektywną metodę jednoczesnego oznaczania FLU i NFLU w próbkach osocza ludzkiego. W oznaczeniach jest stosowana chromatografia cieczowa z detekcją w nadfiolecie przy $\lambda=226 \text{ nm}$. Granica wykrywalności poszczególnych związków wynosi 2 ng/cm^3 , natomiast zakres oznaczenia w przypadku fluoksetyny mieści się w przedziale $10\text{--}800 \text{ ng/cm}^3$, a dla norfluoksetyny – w przedziale $10\text{--}1000 \text{ ng/cm}^3$. Metoda ta umożliwia jednoczesne oznaczanie obu związków i stosowana jest do analiz w układach złożonych. Jej zaletą jest zużywanie bardzo małych objętości próbek osocza.

Orsulak i współpracownicy [30] do oznaczania fluoksetyny i norfluoksetyny w surowicy ludzkiej, zastosowali wielostopniową ekstrakcję ciecz–ciecz oraz metodę HPLC z kolumną fenylową w odwróconym układzie faz. Detekcję prowadzono w nadfiolecie przy $\lambda=226 \text{ nm}$. Zakres oznaczania wymienionych związków wynosi $25\text{--}800 \text{ ng/cm}^3$. Współczynnik korelacji obliczony z krzywych wzorcowych $r=1,000$.

Inną procedurę, opartą również na wykorzystaniu HPLC, zaproponowali Wong i wsp. [20]. Sposób wykonania analizy jest następujący: próbki zalkalizowanego osocza są ekstrahowane n-heksanem i alkoholem izoamylowym, a następnie rozcieńczonym kwasem fosforowym(V). Ekstrakty są wstrzykiwane na kolumnę C_{18} , w której fazą ruchomą jest fosforan (V) potasu i acetonitryl. Detekcję prowadzi się przy $\lambda=214 \text{ nm}$.

Wzorcem wewnętrznym jest klomipramina. Krzywa wzorcowa jest prostoliniowa do 800 ng/cm³. Opracowana metoda charakteryzuje się wysoką czułością oraz dobrą powtarzalnością wyników.

Parodi i współpracownicy [31] proponują metodę oznaczania chlorowodorku fluoksetyny oraz innych leków zawartych w ziołowych mieszankach odchudzających. Otrzymano je przez dodanie fluoksetyny do syntetycznych mieszanin zawierających najwięcej zwykle używanych roślin. Autorzy do oznaczania wykorzystują technikę chromatograficzną – HPLC w odwróconym układzie faz. Do ilościowej analizy FLU zastosowano kolumnę z poliamidu. Metoda ta jest czuła i selektywna. Analityczny odzysk badanego związku jest dobry i wynosi 88–97%. Krzywa wzorcowa jest prostoliniowa w zakresie stężeń 30–500 µg/cm³ ($r > 0,995$).

Miształ i Paw [32] opracowali metodę oznaczania chlorowodorku fluoksetyny w kapsułkach preparatu „Prozac”. Jest to szybka, prosta metoda HPLC, w której jako wzorec wewnętrzny stosuje się chlorowodorek dezipraminy. Do oznaczania wykorzystano kolumnę RP-18; fazę ruchomą stanowi mieszanina acetonitrylu i buforu fosforanowego. Detekcję przeprowadza się przy 254 nm. Względne odchylenie standardowe jest mniejsze niż 1% dla analizowanego związku. W oznaczeniu fluoksetyny nie przeszkadzają obecne w sproszkowanych kapsułkach obojętne składniki. Metoda ta charakteryzuje się dużą precyzją. Współczynnik korelacji wynosi 0,9989.

Miształ i Skibiński [33] opracowali również metodę oznaczania fluoksetyny w kapsułkach preparatu „Prozac” opartą na wykorzystaniu spektrofotometrii pochodnej. Metoda ta, na podstawie krzywych pochodnych pierwszego, drugiego i trzeciego rzędu, umożliwia oznaczenie fluoksetyny w zakresie stężeń 15, 20, 25 i 30 µg mol⁻¹ l⁻¹. Detekcję wykonuje się w zakresie 190–250 nm. Proponowana metoda jest prosta i szybka.

Khan i wsp. [34] zaproponowali metodę opartą na tworzeniu barwnego połączenia fluoksetyny z jodanem (V) potasu oraz z nadtlenkiem benzoilu. Uzyskanie w temperaturze 30°C niebieskiego połączenia wyżej wymienionych związków z fluoksetyną stało się podstawą selektywnego, spektrofotometrycznego oznaczania fluoksetyny w zakresie stężeń od 0,1 mg/ml do 2,0 mg/ml. Detekcję wykonuje się przy 570 nm. Względne odchylenie standardowe wynosi 0,68%. Metoda ta jest precyzyjna, dokładna i umożliwia oznaczanie fluoksetyny w obecności benzodiazepin, kwasu barbiturowego i paracetamolu.

Elektrochemiczną redukcję fluoksetyny zaproponowali De Silva i współpracownicy [35]. Do badań wykorzystali wiszącą, rtęciową elektrodę kropłową. Zgodnie z ich propozycją badanie wykonuje się metodą adsorpcyjnej woltamperometrii square wave, w środowisku alkalicznym, w mieszaninie acetonitryl-woda (1:4). Zakres liniowości oznaczeń mieści się w przedziale 0,52–5,2 M. Proponowana metoda jest prosta, redukcja fluoksetyny zachodzi przy wysokich wartościach potencjałów. Użycie jako elektrolitu podstawowego acetonitrylu zapobiega adsorpcji FLU na powierzchni elektrody i zapewnia dużą czułość i powtarzalność wyników.

Jak wcześniej wspomniano, fluoksetyna i norfluoksetyna występują w odmianach izomerycznych (R)- i (S)-; współczesne metody pozwalają na rozdzielanie i oznaczanie enancjomerów tych związków.

Torok-Both i współpracownicy [17] opisali metodę umożliwiającą jednoczesne oznaczanie enancjomerów fluoksetyny i norfluoksetyny w próbkach biologicznych. Metoda ta oparta jest na technice chromatografii gazowej z detekcją ECD. Wykorzystano ją do wykrywania i oznaczania enancjomerów w osoczu i w moczu ludzi oraz w wątrobie i tkance mózgu szczurów. Do rozdzielania (R)- i (S)-izomerów fluoksetyny i norfluoksetyny użyto chiralnego związku – chlorowodoru (S)-(-)trifluoroacetylopropylu. Opisana metoda umożliwia oznaczanie pojedynczych enancjomerów w zakresie stężeń 10–1000 ng/cm³.

Inną metodę HPLC do oznaczania enancjomerów fluoksetyny i norfluoksetyny zaproponowali Potts i Parli [16]. Zastosowali kolumnę wypełnioną żel krzemionkowym o wielkości ziaren 5 μm oraz fazą ruchomą złożoną z mieszaniny izo-octanu i tetrahydrofuranu. Metoda okazała się czuła i umożliwiła oznaczanie diastereoizomerów do 5 ng/cm³ w osoczu i do 25 ng/cm³ w tkankach. Jest ona szybka, prosta i zapewnia dobry rozdział i ilościowe oznaczenie izomerów (S)- i (R)- fluoksetyny oraz (S)- i (R)- norfluoksetyny. Stosowana jest do badań farmakokinetycznych.

Kolejną metodę umożliwiającą rozdział enancjomerów fluoksetyny i norfluoksetyny zaproponowali Piperaki, Penn i Goodall [36]. Zastosowali elektroforezę kapilarną z detekcją spektrofotometryczną w zakresie UV przy λ=230 nm. Piperaki i Parissi-Poulou [37] do oznaczania enancjomerów fluoksetyny zaproponowali także technikę HPLC. W badaniach wykorzystano β-cyklodekstryny (β-CD) i β-hydroksypropylo-cyklodekstryny (HPβ-CD). Krzywa wzorcowa jest prostoliniowa w zakresie 50–500 ng/cm³, a granica wykrywalności wynosi 5 ng/cm³ dla FLU i 4 ng/cm³ dla NFLU.

Metodę oznaczania enancjomerów fluoksetyny i norfluoksetyny zaproponowali też Pichini i współpracownicy [38]. W badaniach stosuje się najpierw ekstrakcję do fazy stałej, a następnie rozdział stereoizomerów za pomocą technik HPLC z detekcją spektrofotometryczną w zakresie UV przy λ=220 nm. Jako wzorzec wewnętrzny stosuje się klozapinę. Granica oznaczalności dla pojedynczych składników wynosi 10 ng/cm³.

Większość metod chromatograficznych omówiono w pracy przeglądowej Eapa i Baumanna [24]. Wśród nich na szczególną uwagę zasługuje metoda zaproponowana przez Eapa i współpracowników [39], z zastosowaniem chromatografii gazowej w połączeniu ze spektrometrią mas. Metoda ta umożliwia oznaczania enancjomerów fluoksetyny i fluwoksaminy w zakresie odpowiednio 10–750 ng/ml dla FLU i NFLU oraz 50–500 ng/ml dla FLW.

Oprócz metod chromatograficznych, do oznaczania fluoksetyny opracowana została, przez Atmacę [40], metoda fluorymetryczna. Jest to prosta metoda, wykorzystująca 7-chloro-4-nitrobenzenofurazan (NBD-Cl), jako wysoce czuły i selektywny związek fluorescencyjny z I- i II-rzędowymi aminami. Reakcja zachodzi w środowisku alkalicznym (pH=8,5) i w temperaturze 70°C. W optymalnych warunkach istnieje liniowa korelacja pomiędzy intensywnością fluorescencji (I_p) i stężeniem w granicach 40–100 ng/cm³. Proponowana metoda jest czuła, specyficzna i może być wykorzystywana do badań próbek biologicznych.

Metody oznaczania fluwoksaminy

W przypadku oznaczania fluwoksaminy, podobnie jak fluoksetyny, przeważają metody chromatograficzne. Pullen i Fatmi [23] zaproponowali szybką, czułą i niedrogą metodę oznaczania fluwoksaminy w osoczu, niezbędną w terapeutycznej kontroli leku. Fluwoksaminę i nortryptylinę – jako wzorzec wewnętrzny oznaczania – wyekstrahowano z osocza octanem etylu i poddano reakcji z chlorkiem dansylu. Dzięki zastosowaniu chlorku dansylu otrzymano fluoryzujące pochodne fluwoksaminy. Pochodne oznaczono metodą HPLC w odwróconym układzie faz i detekcją fluorescencyjną. Metoda ta pozwala na oznaczenie fluwoksaminy w zakresie stężeń 10–1000 ng/cm³. Do badań wykorzystuje się 1 cm³ próbki osocza. Uzyskany tą metodą czas rozdziału jest krótki i wynosi 12 minut. Autorzy proponują zastosowanie tej metody do oznaczania próbek klinicznych.

Van der Meersch-Mougeot i Diquet [41] zaproponowali metodę oznaczania fluwoksaminy w osoczu ludzi i szczurów. Wykorzystali technikę chromatografii cieczowej HPLC, natomiast wzorcem wewnętrznym była klowoksamina. Zastosowano detekcję w nadfiolecie ($\lambda=254$ nm) i otrzymano krzywą wzorcową pozwalającą na oznaczenie fluwoksaminy w zakresie stężeń 2–400 ng/cm³. Granica wykrywalności metody wynosiła 0,5 ng/cm³. Obecność innych leków przyjmowanych podczas terapii nie powoduje analitycznych zakłóceń. Metoda ta jest przydatna do rutynowego monitorowania leku i badań farmakokinetyki FLW w płynach ustrojowych.

Foda [42] opracował metodę chromatograficznego oznaczania maleinianu fluwoksaminy w preparatach farmaceutycznych. Jest to czuła, szybka i specyficzna metoda oparta na technice HPLC w odwróconym układzie faz, z detekcją spektrofotometryczną przy $\lambda=240$ nm. Zakres oznaczania uzyskany tą metodą wynosi 0,5–12 µg/cm³, a współczynnik korelacji $r>0,9997$. Umożliwia ona rutynowe analizy FLW oraz kontrolę jakości leków zawierających fluwoksaminę.

Fluwoksaminę w tabletkach można również oznaczać metodą opracowaną przez Alhaidera i współpracowników [43]. Wykorzystali oni procedurę HPLC z kolumną C₁₈, w której fazę ruchomą stanowi mieszanina CH₃CN i CH₃COONa (80–20%). Detekcję prowadzono w nadfiolecie przy $\lambda=240$ nm. Ci sami autorzy opracowali metodę spektrofotometryczną oznaczania fluwoksaminy opartą na tworzeniu kompleksów charge-transfer z chloranilem. Fluwoksamina reaguje z chloranilem w wodnoetanolowym środowisku (w buforze o pH=9) tworząc kompleks o maksimum absorpcji przy 347 nm. Autorzy przeprowadzili badania kompleksu i jego trwałości. Metoda pozwala na oznaczenie 2–25 µg/cm³ fluwoksaminy. Granica wykrywalności wynosi 0,4 ng/cm³. Reakcję wykorzystano do oznaczania zawartości fluwoksaminy w tabletkach „Fevarin” zawierających 50 mg maleinianu fluwoksaminy.

Inną spektrofotometryczną metodę oznaczania FLW w tabletkach zaproponował Atmaca [44]. Metoda ta oparta jest na barwnej reakcji fluwoksaminy z kwasem 2,4,6-trinitrobenzenosulfonowym. Badania przeprowadzono w środowisku zasadowym przy pH=8 i w temperaturze pokojowej. Maksimum absorbancji uzyskano przy 420 nm. Przy tej długości fali wykonano krzywą wzorcową. Zależność prostoliniową uzyskano w zakresie stężeń 2,5–20 µg/cm³. Współczynnik korelacji obliczony z krzywej wzorcowej wynosi 0,9999. Zmian absorbancji nie stwierdzono w ciągu 2 godzin. Proponowana metoda jest prosta i czuła ($\epsilon = 2 \cdot 10^4$ dm³·mol⁻¹·cm⁻¹), charakteryzuje się dużą precyzją i dokładnością. Można ją polecić do rutynowych analiz fluwoksaminy.

Ekstrakcyjno-spektrofotometryczne metody oznaczania fluwoksaminy i fluoksetyny opracowała Starczewska i wsp. [45, 46]. Polegają one na tworzeniu barwnych połączeń tych związków z chromazurolem S oraz eriochromocyjaniną R. Proponowane metody pozwalają na oznaczanie fluwoksaminy w zakresie stężeń 7–100ppm oraz fluoksetyny w zakresie 5–50ppm dla układów z chromazurolem S oraz na oznaczanie fluwoksaminy w zakresie stężeń 2–40ppm oraz fluoksetyny w zakresie 2–20ppm dla układów z eriochromocyjaniną R. Są one czułe i z powodzeniem mogą być zaproponowane do oznaczania fluwoksaminy i fluoksetyny w preparatach farmaceutycznych.

Nevado i współpracownicy [47] opracowali metodę jednoczesnego oznaczania fluoksetyny i fluwoksaminy za pomocą elektroforezy kapilarnej. Uzyskany limit detekcji dla obu związków wynosił 1mg/l. Do badań stosowano elektrolit podstawowy – bufor fosforanowy o stężeniu 40mM i potencjał 8kV. Metoda ta umożliwiła oznaczanie fluoksetyny i fluwoksaminy w czasie nie dłuższym niż 2,5 godziny. Zaproponowaną metodę autorzy wykorzystali do oznaczenia wyżej wymienionych związków w 9 preparatach farmaceutycznych.

Wydaje się, że wymienione powyżej procedury analityczne dotyczące metod oznaczania fluoksetyny i fluwoksaminy potwierdzają bardzo duże zainteresowanie lekami psychotropowymi. Z przytoczonego przeglądu metod wynika, że do oznaczania tych związków mogą być stosowane zarówno skomplikowane metody badawcze, np.: HPLC czy elektroforeza kapilarna, jak i metody chemiczne nie wymagające specyficznej aparatury analitycznej, np. spektrofotometria. Coraz szersze zastosowanie tej grupy związków w leczeniu psychiatrycznym prawdopodobnie wymusi konieczność poszukiwań nowych, coraz szybszych i dokładniejszych, metod ich oznaczania zarówno w postaci czystej, jak i w preparatach farmaceutycznych i płynach ustrojowych.

Čáđáříúí éłńáú íđ'ďłáléłič' ôēōíēńłńčír ě ôēōáíēńřččíř

Ňřáđčéríčí

Čńňēłáírítú áár číáčáčńđř íáđřńíē ná'čē űđńńíčír (SSRI): ôēōíēńłńčír ě ôēōáíēńřččí. ěčńđřńōđíúł árříúł ôēřčúárřń íř ēřáí-čńēłíúł éłńáú íđ'ďłáléłič' ýńčō űłáčílíčē á ôřđēřōłáńč-łńē-čō đ'ďł'đřđńřō ě đ'ēřčēł á đřáčōńł ēříōłńđřōčē íčēł íá/ēē, +ńń íēřčúárřńń' đ'đčáírítúē đ'đē űłđřđ'łáńč-łńēē čō đ'đčēłíłíčē. Áíēüřčínňáí đ'đłáērárłēúō đ'đíōłáōđ íđ'čđřłńń' íř čńňēłáírítčē ýńčō űłáčílíčē űđ'łēńđíōńńíēłńđč-łńēčēč, ýēłēńđíōčēč-łńēčēč ě ôđíēřńáđřōč-łńēčēč éłńářčē ű čńđ'řēüčírítčēłē đřčēč-íúō áłńłēńđíá.

Ausgewählte Methoden der Markierung von Fluoxetine und Fluvoxamine

Zusammenfassung

Es wurden zwei Inhibitoren Rückabsorption der Serotonin (SSRIs) untersucht: Fluoxetine und Fluvoxamine. Aus der Literaturübersicht geht hervor, dass viele quantitative Methoden zum Kennzeichnen dieser Verbindungen in pharmakologischen Präparaten und im Plasma angewandt werden, besonders im Bereich der Konzentrate unter ng/ml, was im therapeutischen Monitoring dieser Medikamente nützlich ist.

Die meisten vorgeschlagenen Vorgänge stützen sich auf die Untersuchungen dieser Verbindungen mit spektrofotometrischen, elektrochemischen und chromatografischen Methoden mit Anwendung unterschiedlicher Detektoren.

Les méthodes choisies de la détermination de fluoxetine et de fluvoxamine

Résumé

On analyse deux inhibiteurs sélectifs de l'absorption réversible de sérotonine (SSRIs) – fluoxetine et fluvoxamine. La revue de la littérature en question démontre que l'on utilise plusieurs méthodes quantitatives de la détermination de SSRIs dans les produits pharmaceutiques et dans le plasma, surtout pour la concentration ng/ml, qui servent au monitoring thérapeutique de ces médicaments. La plupart de ces procédures base sur les recherches spectrophotométriques, électrochimiques, chromatographiques liées avec plusieurs détecteurs.

Piśmiennictwo

1. Pużyński S. *Nieselektywne i selektywne inhibitory wchłaniania zwrotnego monoamin w terapii depresji*. Post. Psychiatr. Neurol. 1995; 1: 251–268.
2. Pużyński S. *Postępy farmakoterapii stanów depresyjnych*. Lęk i Depresja 1996; 1 2: 99–120.
3. Pużyński S. *Selektywne inhibitory wychwytu serotoniny (SI-5HT) w leczeniu zaburzeń psychicznych, zwłaszcza depresji*. Lek. Psychotr. 1993; 1: 11–24.
4. Pużyński S. *Leki przeciwdepresyjne pierwszej i drugiej generacji*. Farm. Pol. 1995; 51: 93–105.
5. Habrat B. *Selektywne inhibitory wychwytu serotoniny (SI-5HT) w leczeniu uzależnienia od alkoholu*. Lek. Psychotr. 1993; 1: 49–57.
6. Bogdanowicz E, Kalinowski A. *Objawy niepożądane w czasie stosowania selektywnych inhibitorów wychwytu serotoniny (SI-5HT)*. Lek. Psychotr. 1993; 1: 32–40.
7. Bogdanowicz E. *O depresjach*. Farm. Pol. 1995; 51: 555–565.
8. Kostowski W. *Mechanizmy działania leków przeciwdepresyjnych*. W: Kostowski W, Pużyński S, red. *Psychofarmakologia doświadczalna i kliniczna*. Warszawa: PZWL; 1996; s. 162–180.
9. Bilikiewicz S. *Psychiatria kliniczna*. Warszawa: PZWL; 1989.
10. Pużyński S, Rybakowski J, Kocur J, Rydzewski Z, Beręsewicz M., Bogdanowicz E, Duszyk S, Gruszczyński W, Kaliszowski A, Koszewska I, Pilaczyńska E, Święcicki Ł. *Ocena kliniczna fluoksetyny (wyniki badań wielośrodkowych)*. Psychiatr. Pol. 1994; 28: 593–600.
11. Pużyński S, Gałuszko P, Strzyżewski W, Beręsewicz M, Bogdanowicz E, Czerwiński A, Formanowicz J, Kalinowski A, Koszewska I, Landowski J, Nowicki Z, Rajewska J, Święcicki Ł, Wichowicz H. *Fluwoksamina w leczeniu depresji typu endogennej (wyniki badań wielośrodkowych w Polsce)*. Lek. Psychotr. 1994; 1: 7–23.
12. Święcicki Ł. *Interakcje selektywnych inhibitorów wychwytu serotoniny (SI-5HT)*. Lek. Psychotr. 1993; 2: 41–48.
13. *European Pharmacopoeia*, London 1997; 867–869.
14. *The Merck Index*, Twelfth edition, Merck&Co., Inc., 1996; 709–715.
15. Thomare P. *Sensitive micromethod for column liquid chromatographic determination of fluoxetine and norfluoxetine in human*. Chromatogr. B. 1999; 583: 217–221.
16. Potts B, Parli C. *Analysis of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine in plasma and tissue using chiral derivatization and normal-phase liquid chromatography*. J. Liq. Chromatogr. 1992; 15: 665–681.
17. Torok-Both G, Baker G, Coutts R, McKenna K, Aspeslet L. *Simultaneous determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in biological samples by gas chromatography with electron-capture detection*. J. Chromatogr. 1992; 579: 99–106.
18. Komoroski R. *In vivo NMR*. Anal. Chem. 1994; 66: 1024A–1033A.
19. Jacobs LS. *Farmakologia*. Warszawa: Urban&Partner; 1994.

20. Wong S, Dellafera S, Fernandes R. *Determination of fluoxetine and norfluoxetine by high-performance liquid chromatography*. J.Chromatogr. 1990; 499: 601–608.
21. *Martindale*, Thirty-first Edition by J.E.F. Reynolds, London 1996, 312–316.
22. Podlewski J, Chwalibogowska-Podlowska A. *Leki współczesnej terapii*. Warszawa: Wydawnictwo Fundacji Büchnera; 1996.
23. Pullen R, Fatmi A. *Determination of fluvoxamine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. J.Chromatogr. 1992; 574: 101–107.
24. Eap CB, Baumann P. *Analytical methods for the quantitative determination of selective serotonin reuptake inhibitors for therapeutic drug monitoring purposes in patients*. J.Chromatogr.B. 1996; 686: 51–63.
25. Fontanille P, Jourdil N, Villier C, Bessard G. *Direct analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection*. J.Chromatogr. B. 1997; 692: 337–343.
26. Lantz R, Farid Z, Koons J, Tenbarger B, Bopp R. *Determination of fluoxetine and norfluoxetine in human plasma by capillary gas chromatography with electron-capture detection*. J.Chromatogr. 1993; 614: 175–179.
27. Clausing P, Rushing L, Newport G, Bowyer J. *Determination of D-norfenfluramine and fluoxetine in plasma, brain tissue and brain microdialysate using high-performance liquid chromatography after precolumn derivatization with dansyl chloride*. J. Chromatogr. B. 1997; 692: 419–426.
28. Suckow R, Zhang M., Cooper T. *Sensitive and selective liquid-chromatographic assay of fluoxetine and norfluoxetine in plasma with fluorescence detection after precolumn derivatization*. Clin.Chem. 1992; 38: 1756–1761.
29. Puopolo P, Flood J. *Fluoxetine (Prozac) interference in CN column liquid-chromatographic assays of tricyclic antidepressants and metabolites*. Clin. Chem. 1991; 37: 1304–1305.
30. Orsulak J, Kennley T, Debus J, Crowley G, Wittman R. *Determination of antidepressant fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in serum by reversed-phase HPLC, with ultraviolet detection*. Clin. Chem. 1988; 34: 1875–1878.
31. Parodi B, Caviglioli G, Bachi A, Cafaggi S, Romussi G. *Herbal mixtures with claimed slimming activity: Determination by TLC and HPLC of illegally added drugs*. Pharmazie 1993; 48: 678–681.
32. Misztal G, Paw B. *Determination of fluoxetine hydrochloride in capsules Prozac by HPLC*. Acta Polon. Pharm. 1996; 53: 177–179.
33. Misztal G, Skibiński R. *Determination of fluoxetine hydrochloride in capsules and moclobemide in tablets by first, second and third derivative spectrophotometry*. Pharmazie 1999; 54: 550–551.
34. Khan I, Aman T, Iqbal M., Kazi A. *Spectrophotometric quantitation of fluoxetine hydrochloride using benzoyl peroxide and potassium iodide*. Microchim. Acta 2000; 134: 27–31.
35. De Silva A, Lima J, Teles M, Brett A. *Electrochemical studies and square wave adsorptive stripping voltammetry of the antidepressant fluoxetine*. Talanta 1999; 49: 611–617.
36. Piperaki S, Penn S, Goodall D. *Systematic approach to treatment of enantiomeric separations in capillary electrophoresis and liquid chromatography. II A study of the enantiomeric separation of fluoxetine and norfluoxetine*. J Chromatogr. A 1995; 700: 59–67.
37. Piperaki S, Parissi-Poulou M. *Evaluation of the chromatographic behaviour of fluoxetine and norfluoxetine using different cyclodextrins as mobile phase additives and fluorimetric detection*. J. Liq. Chrom&Rel.Technol. 1996; 19: 1405–1421.
38. Pichini S, Pacifici R, Altieri I, Pellegrini M., Zuccaro P. *Stereoselective determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in plasma samples by high-performance liquid chromatography*. J. Lig. Chrom& Rel.Technol. 1996; 19: 1927–1935.

39. Eap CB, Gaillard N, Powell K, Baumann P. *Simultaneous determination of plasma levels of fluvoxamine and of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine by gas chromatography-mass spectrometry.* J.Chromatogr.B. 1996; 682: 265–272.
40. Atmaca S. *Fluorimetric determination of fluoxetine hydrochloride.* Pharmazie 1995; 50: 300–301.
41. Van der Meersch-Mougeot V, Diquet B. *Sensitive one-step extraction procedure for column liquid chromatographic determination of fluvoxamine in human and rat plasma.* J.Chromatogr. 1991; 67: 441–449.
42. Foda H. *Quantitative analysis of fluvoxamine maleate in tablet formulations by HPLC.* J.Liq. Chromatogr. 1995; 18: 1591–1601.
43. Alhaider A, Haggga M, Alawady M, Gad-Kariem E. *Spectrophotometric determination of fluvoxamine in tablets based on charge-transfer complex with chloranil.* Anal. Lett. 1993; 26: 887–901.
44. Atmaca S. *Spectrophotometric determination of fluvoxamine maleate in tablets.* Pharmazie 1994; 49: 458–459.
45. Starczewska B, Mielech K. *Application of chrome azurol S for the extractive spectrophotometric determination of fluoxetine and fluvoxamine.* J. Pharm. Biomedic. Anal. 2000; 23: 243–247.
46. Starczewska B, Puzanowska-Tarasiewicz H, Baranowska K. *Investigation and analytical application of the reactions of eriochrome cyanine R with fluvoxamine and fluoxetine.* J. Pharm. Biomedic. Anal. 2000; 23: 477–481.
47. Neva do J, Salcedo A, Lierena V, Nuevo A. *Method development and validation for the simultaneous determination of fluoxetine and fluvoxamine in pharmaceutical preparations by capillary electrophoresis.* Anal. Chem. Acta. 2000; 20: 169–176.

Otrzymano: 07.07.2001

Zrecenzowano: 03.10.2001

Przyjęto do druku: 02.01.2002

Adres: Uniwersytet w Białymstoku
Instytut Chemii
15-443 Białystok, al. Piłsudskiego
11/4
tel. (085) 7457667, (085) 7457587
fax. (085) 7457581