

УДК 547.551:615.917:615.277.3:340.67

СОХРАНЯЕМОСТЬ ФЛУТАМИДА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

© Шорманов В.К.¹, Андреева Ю.В.¹, Омельченко В.А.²¹ Курский государственный медицинский университет, Курск;² Экспертно-криминалистический центр УМВД России по Орловской области, ОрелE-mail: R-WLADIMIR@yandex.ru

Проведено изучение особенностей сохраняемости флутамида в гнилостно разлагающемся биологическом материале (ткань печени) при трех температурных режимах сохранения: 18-22°C, 8-10°C, 1,5-2°C. Исследуемое вещество изолировали из модельных смесей с биологическим материалом путём настаивания с ацетоном дважды по 30 минут. Очистку извлечённого вещества проводили в колонке силикагеля L 40/100 мкм, элюируя смесью растворителей гексан-ацетон (8:2). Предложены оптимальные условия идентификации и количественного определения флутамида, извлечённого из гнилостно-измененной ткани печени методами ТСХ, ГХ-МС и спектрофотометрии в УФ и видимой областях спектра. Установлено, что при увеличении температуры от 2°C до 22°C длительность сохранения флутамида сокращается с 32 до 52 суток.

Ключевые слова: флутамид, изолирование, очистка, определение, сохраняемость, биологический материал, химико-токсикологический анализ.

PERSISTENCE OF FLUTAMIDE IN BIOLOGICAL MATERIAL

Shormanov V.K.¹, Andreyeva Yu.V.¹, Omelchenko V.A.²¹ Kursk State Medical University, Kursk; ² Forensic Center of Home Office Department of Orel Region, Orel

The flutamide persistence in decomposing organic matter (liver tissue) at three temperature regimes of conservation: 18-22°C, 8-10°C, and 1.5-2°C was investigated. The substance under test was isolated from the model mixtures with biological matter by infusing with acetone for 30 minutes twice. The purification of the extracted substance was carried out in a silica gel column L 40/100 mkm, eluting hexane-acetone with a mixed solvent (8:2). The optimum conditions for the identification and quantification of flutamide extracted from putrid liver tissue by TLC, GC-MS and spectrophotometry in the UV and visible regions of the spectrum. It is found that the increase in temperature from 2°C to 22°C reduces the duration of flutamide persistence from 32 to 52 days.

Keywords: flutamide, isolation, purification, identification, storage ability, biological material, chemical and toxicological analysis.

Флутамид 2-метил-N-(4-нитро-3-(трифторметил)фенил) пропанамид применяется в медицине как противоопухолевое лекарственное средство для лечения рака предстательной железы. Синонимы: 4-нитро-3-трифторметилизобутиранид, флуцином, андраксан, флутамид Плива, флутамид Штада, флутакан, фругил, флютамид, нифтолид, флутаплекс [3, 6].

По физическим свойствам флутамид – это светло-желтый порошок, без запаха с температурой плавления 111–113°C. Молекулярная масса – 276,21; брутто формула - C₁₁H₁₁F₃N₂O₃. Температура кипения 400,3°C при 760 мм рт.ст. Оптически неактивен. Флутамид практически нерастворим в воде (9,45 мг/л), легко растворим в ацетоне, этилацетате, этаноле (50 г/л) и в метаноле. Растворим в ацетонитриле [1, 3].

Данное соединение является токсичным для теплокровных животных и человека. LD₅₀ флутамида для крыс при пероральном введении 787 мг/кг, при внутривенном - 289 мг/кг. LC₅₀ у крыс, отравленных ингаляционно, превышает 0,25 мг/л. LD₅₀ флутамида для собак при пероральном введении >2 мг/кг. Токсичность

данного соединения чаще всего сопряжена с нарушением функций печени, почек и щитовидной железы [5, 7, 8, 9].

Токсичность флутамида, его широкое применение и наличие случаев летального отравления обуславливают необходимость изучения этого соединения в химико-токсикологическом отношении. До настоящего времени остается недостаточно изученным вопрос сохраняемости флутамида в гнилостно-измененном биологическом материале [2, 10].

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей сохраняемости флутамида в гнилостно-разлагающемся биологическом материале (ткань печени) при трех температурных режимах сохранения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования явилась субстанция флутамида, соответствующая требованиям нормативной документации (ООО «Фармакон», ФСП 42-0008574004).

В качестве биоматериала была взята мелкоизмельчённая (до размеров частиц 0,2-0,5 см) печень человека. Для эксперимента отбиралось 5 порций мелкоизмельчённой печени по 500 г. В каждую из них вносили по 500 мг флутамида и тщательно перемешивали биологическую ткань с веществом. Для контрольного опыта брали 500 г мелкоизмельчённой биологической ткани, не содержащей флутамид. Полученные модельные смеси и контрольные образцы сохраняли при следующих температурных режимах: 1,5-2 °С, 8-10 °С, 18-22 °С.

Анализ сохраняемых образцов на присутствие флутамида проводили через 24 часа и далее – по истечении 2, 4, 10, 24, 32, 35 и 52 суток. В каждом случае параллельно анализировали по 25,0 г исследуемой и контрольной пробы. Исследование проводили по нижеприведенной методике.

Методика определения флутамида в биологическом материале

Изолирование. Изолирование флутамида из биологического материала осуществляли ацетоном в режиме двукратного настаивания при массовом соотношении изолирующего агента и биоматериала в каждом случае 2:1 и продолжительности отдельного настаивания 30 минут. Изолирующий агент сливали с твердого остатка, а процесс настаивания повторяли. Извлечения объединяли в выпарительной чашке, растворитель испаряли.

Очистка извлечений. Остаток, полученный после удаления ацетона, растворяли в 2-3 мл ацетона, смешивали полученный раствор с 1,5 г силикагеля L 40/100 мкм и после испарения растворителя вносили данную смесь в стеклянную хроматографическую колонку 490×11 мм, предварительно заполненную 8,5 г силикагеля L 40/100 мкм. Содержимое колонки уплотняли.

Хроматографировали, используя подвижную фазу гексан-ацетон (8:2). Высоту столба элюента поддерживали при хроматографировании на уровне 28-29 см от верхнего края сорбента (скорость элюирования – 0,70-0,72 мл/мин). Элюат собирали фракциями по 2 мл. Фракции с 9 по 14 включительно объединяли, испаряли в токе воздуха при температуре 20-22 °С. Остаток растворяли в 10 мл ацетона. По 1,0-2,5 мл полученного раствора вносили в две выпарительные чашки № 1, № 2 и испаряли растворитель.

Идентификация методом ТСХ. Остаток в чашке № 1 растворяли в незначительном объеме ацетона и количественно переносили на линию старта хроматографической пластины «Сорбфил» марки ПТСХ-АФ-В-УФ в виде полосы.

Хроматографировали, используя элюент гексан-ацетон (7:3) в присутствии вещества-свидетеля. Хроматограммы проявляли в УФ свете. Флутамид идентифицировали по величине $R_f = 0,79 \pm 0,02$.

В дальнейшем анализируемое вещество элюировали из сорбента этанолом и идентифицировали по УФ спектру, а также проводили количественное определение по интенсивности поглощения в области длинноволнового максимума (297 нм).

Идентификация методом электронной спектрофотометрии. Пятно анализируемого вещества вырезали из хроматограммы и элюировали вещество 10 мл этанола в течение 15 минут. Элюат отделяли и исследовали его светопоглощение в интервале длин волн 190-500 нм, используя спектрофотометр СФ-56 и кварцевые кюветы с длиной оптического пути 10 мм. Раствор сравнения - элюат, полученный в контрольном опыте. В случае присутствия больших концентраций анализируемого вещества элюат предварительно разбавляли этанолом. Извлечения из контрольных образцов (без флутамида) также исследовали по вышеприведенной схеме.

Идентификация методом хромато-масс-спектрометрии. Остаток в чашке № 2 растворяли в 1 мл метанола. 4 мкл полученного раствора вводили в хроматограф фирмы «Agilent Technologies» (США) модели 7890В с масс-селективным квадрупольным детектором модели 5977А (Agilent Technologies).

При исследовании методом ГХ МС применяли капиллярную колонку HP-5MS (30 м×0,2 мм) с неподвижной фазой (5%-фенил)-метилполисилоксан (толщина слоя 0,25 мкм).

В качестве газа-носителя использовали гелий, скорость его подачи - 1,0 мл/мин. Температура инжектора - 250 °С, интерфейса детектора - 290 °С. Начальная температура термостата колонки - 70 °С, она выдерживалась 2 минуты, затем осуществляли подъем температуры со скоростью 40 °С в минуту до 200 °С с последующим нагревом со скоростью 12,5 °С до 290 °С. Деление потока в инжекторе осуществлялось в соотношении 5:1. Объем вводимой пробы равнялся 4 мкл.

Масс-селективный детектор работал в режиме электронного удара (70 эВ). Регистрацию сигналов проводили по полному ионному току в диапазоне 45-550 m/z.

Обнаружение флутамида проводили по специфическому набору характеристических положительно заряженных ионов (осколков бомбардированной электронами молекулы анализируемого вещества). Также при идентификации учитывали характерное время

удерживания в неподвижной фазе капиллярной колонки.

Количественное определение. По величине оптической плотности элюата в этаноле ($\lambda = 297$ нм) определяли количественное содержание флутамида, используя уравнение градуировочного графика.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При идентификации методом ТСХ анализируемое вещество проявляли на хроматограммах в УФ свете (тёмное пятно на более светлом общем фоне пластины в УФ свете). Величина R_f его составляла $0,79 \pm 0,02$, что соответствовало величине R_f стандарта флутамида.

В процессе идентификации методом электронной спектрофотометрии сравнение спектральных кривых флутамида, извлечённого из анализируемых образцов по вышеописанной схеме, со спектром чистого вещества в этаноле обнаруживалось совпадение формы спектральной кривой и положения точек экстремумов (в области 204, 228 и 297 нм).

При исследовании извлечений из ткани трупной печени контрольных образцов установлено отсутствие в них данного вещества. Измеренное при 297 нм фоновое поглощение элюатов из участков контрольных хроматограмм не превышало 0,012 единиц оптической плотности.

При идентификации методом ГХ-МС время удерживания флутамида совпадало с временем удерживания стандарта (8,06 мин) (рис. 1).

В масс-спектрах присутствовали характерные осколки для молекулы флутамида с m/z 43, 57, 71, 88, 113, 132, 146, 160, 187, 206, 233, 242, 261, 276. (см. табл. 1).

Осколок, имеющий значение 276 m/z соответствует молекулярной массе флутамида и его интенсивность принята за 100%.

Уравнение градуировочного графика для фотометрического определения флутамида по поглощению в УФ области спектра имело вид:

$$A = 0,02992 \cdot C + 0,02635,$$

где A – оптическая плотность, C – концентрация анализируемого вещества в фотометрируемом растворе (мкг/мл). Коэффициент корреляции (r) составляет не менее 0,99.

Таблица 1

Сопоставление масс-спектров стандарта флутамида и флутамида, изолированного из ткани печени

Анализируемые вещества	Характеристические заряженные частицы, m/z
Стандарт флутамида	43, 57, 71, 88, 113, 132, 146, 160, 187, 206, 233, 242, 261, 276.
Флутамид, извлечённый из ткани печени	43, 57, 71, 88, 113, 132, 146, 160, 187, 206, 233, 242, 261, 276.

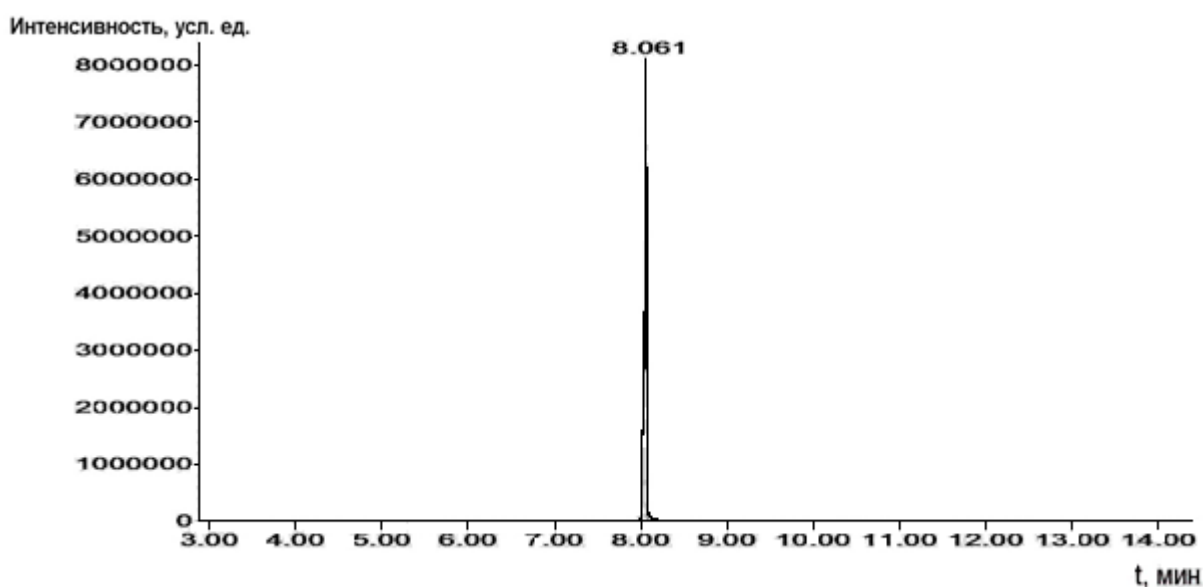


Рис. 1. Газовая хроматограмма флутамида.

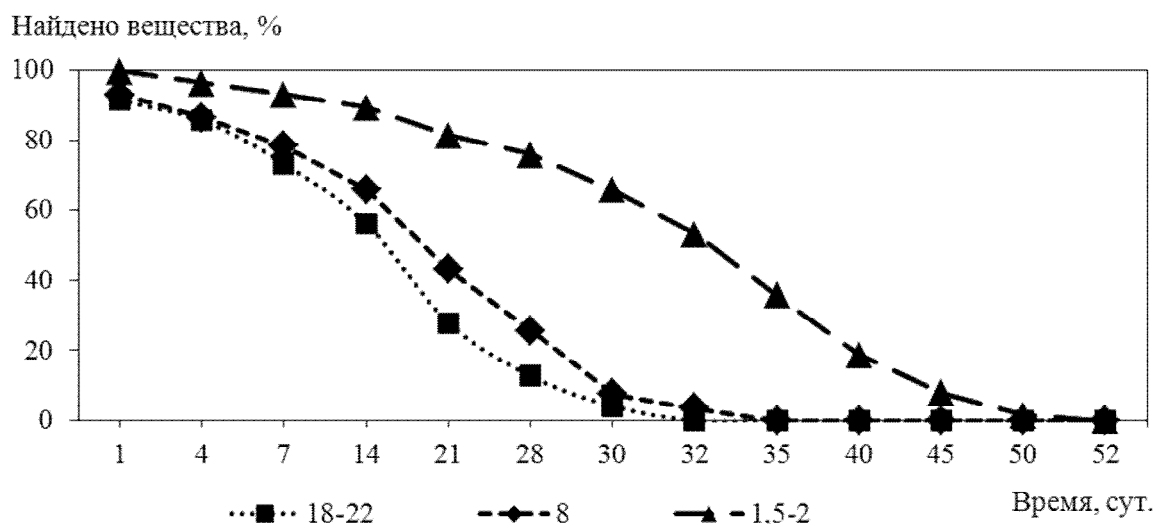


Рис. 2. Зависимость количественного содержания флутамида в биологическом материале от температурного режима и продолжительности сохранения.

Относительная ошибка среднего результата при определении флутамида методом спектрофотометрии составила 0,74% ($n=6$; $P=0,95$).

Результаты изучения сохраняемости флутамида в трупном материале представлены на рис. 2.

Как свидетельствуют полученные данные, устойчивость флутамида в биологическом материале уменьшается с ростом температуры. Сроки сохранения рассматриваемого соединения при температурах 18-22°C, 8-10°C, 1,5-2°C составляют соответственно 32, 35 и 52 суток.

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Предложена методика определения флутамида в гнилостно-разлагающемся биологическом материале с использованием методов ТСХ, ГХ-МС и электронной спектрофотометрии.
2. Изучена сохраняемость флутамида в модельных смесях с тканью печени при трех температурных режимах.
3. Установлено, что при уменьшении температуры от 22°C до 2°C продолжительность сохранения вещества увеличивается с 32 до 52 суток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шорманов В.К., Андреева Ю.В., Герасимов Д.А. Применение производной спектрофотометрии для определения флутамида в таблетках // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Медицина, фармация. – 2014. – № 24. – С. 231-234.
2. Шорманов В.К., Андреева Ю.В., Омельченко В.А. Экстракция флутамида из водных растворов // Судебно-медицинская экспертиза. – 2014. – Т. 57, № 5. – С. 18-20.
3. Ярушок Т.А., Шохин И.Е., Савченко А.Ю., Картиева Ю.С. Определение равновесной биофармацевтической растворимости субстанции флутамида // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2012. – № 1 – С. 30-35.
4. Alvarez-Lueje A., Pena C., Nunez-Vergara L.J., Squella J.A. Electrochemical study of flutamide, an anticancer drug, and its polarographic, UV spectrophotometric and HPLC determination in tablets // Electroanalysis. – 1998. – Vol. 10, N 15. – P. 1043-1051.
5. Bakdash A., Ganswindt M., Herre S. Lethal Poisoning with p-Nitroaniline // Toxichem+Krimtech. – 2006. – Vol. 73, N 2. – P. 61-65.
6. Generali J.A., Cada D.J. Flutamide: Hirsutism in Women // Hospital pharmacy. – 2014. – Vol. 49, N 6. – P. 517-520.
7. Goel A., Saini S., Chowdhry V. Pharmacokinetic solubility and dissolution profile of anti-cancer drugs // International Journal of Pharma Professional's Research. – 2011. – Vol. 2, N 4. – P. 502-539.
8. Gomez J. L., Dupont A., Cusan L. Incidence of liver toxicity associated with the use of flutamide in prostate cancer patients // The American Journal of Medicine. – 1992. – Vol. 92, N 5. – P. 465-470.
9. Martelli A., Campart G.B., Carrozzino R. Evaluation of flutamide genotoxicity in rats and in primary human hepatocytes // Pharmacology & Toxicology. – 2000. – N 86. – P. 129-134.
10. Matsuzaki Y., Nagai D., Ichimura E. Metabolism and hepatic toxicity of flutamide in cytochrome P450 1A2 knockout SV129 mice // Journal of Gastroenterology. – 2006. – Vol. 41, N 3. – P. 231-239.