

ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СЕРТРАЛИНА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

С.В. Баюрка, канд. фарм. наук, С.А. Карпушина*, канд. хим. наук,
В.П. Мороз, канд. фарм. наук

Национальный фармацевтический университет,
Украина; 61002, Харьков, ул. Пушкинская, 53

*E-mail: sveta.karpushina.63@mail.ru

Установлена степень изолирования сертралина из биологического материала с помощью общепринятых в химико-токсикологическом анализе методов. Наиболее эффективным оказался метод А.А. Васильевой, с помощью которого выделено $20,8 \pm 1,9\%$ сертралина. Идентификацию и количественное содержание сертралина в элюатах проводили методом ВЭЖХ с мультиволновым УФ-детектированием.

Ключевые слова: сертралин, биологический материал, ВЭЖХ, мультиволновой УФ-детектор.

Сертралин [(1S,4S)-4-(3,4-дихлорфенил)-1,2,3,4-тетрагидро-N-метил-1-нафтиламина гидрохлорид] – активный селективный ингибитор обратного нейронального захвата серотонина. Его в основном применяют для лечения тяжелых депрессивных состояний [3]. Возможны серьезные осложнения при сочетанном применении сертралина с ингибиторами МАО, ТЦА, алкоголем и другими психоактивными веществами [3]. Отмечены случаи смертельных отравлений сертралином, летальная концентрация препарата в печени – 17 мг/кг [4].

Описаны методы анализа сертралина в плазме и сыворотке крови с помощью газожидкостной хроматографии – ГЖХ (МС-, электронно-захватный детектор), высокоэффективной жидкостной хроматографии – ВЭЖХ (УФ-, МС-детектор) [5]. Методы анализа биологического материала на указанный антидепрессант разработаны недостаточно.

Цель настоящего исследования – определение степени изолирования сертралина из ткани печени с помощью общепринятых в химико-токсикологическом анализе методов А.А. Васильевой, В.Ф. Крамаренко и Стаса-Отто [2], а также разработка условий идентификации и количественного определения указанного антидепрессанта с помощью ВЭЖХ с мультиволновым УФ-детектированием.

Экспериментальная часть

В работе использовали сертралин гидрохлорид, выделенный из таблеток «Стимулотон», содержащий 100 мг сертралина в таблетке в виде 111,9 мг сертра-

лина гидрохлорида (чистоту выделенной субстанции подтверждали методами тонкослойной хроматографии – ТСХ, УФ-спектроскопии, ВЭЖХ). Все реактивы имели квалификацию не ниже «ч.д.а.».

Для изолирования сертралина из ткани печени к 20 г модельных проб измельченной печени трупа человека, погибшего от механической травмы, добавляли водные растворы сертралина гидрохлорида, содержащие в пересчете на основание 2000 мкг препарата, и оставляли на сутки. Изолирование сертралина проводили водой, подкисленной шавелевой кислотой по методу А.А. Васильевой, этиловым спиртом, подкисленным шавелевой кислотой, по методу Стаса-Отто, водой, подкисленной серной кислотой, по методу В.Ф. Крамаренко [1, 2]. Полученные в результате изолирования «щелочные» хлороформные экстракты подвергали дополнительно экстракционной очистке. Для этого экстракты упаривали досуха на водяной бане, остаток растворяли в 20 мл 0,1 М хлористоводородной кислоты и экстрагировали примеси 2 порциями n-гексана по 10 мл (рН 1). Далее водную фазу подщелачивали до рН 8 с помощью 20% раствора натрия гидроксида и сертралин экстрагировали 3 порциями хлороформа (10, 10, 5 мл). Полученные экстракты количественно переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили их объем до метки хлороформом.

Отбирали 3–5 мл полученных экстрактов, упаривали до минимального объема (0,05 мл) и наносили полосой на хроматографическую пластинку Merck (силикагель 60 F254, размер 10×20 см). Рядом полосой наносили такой же объем экстракта, полученного из ткани печени в «холостом» опыте, и стандартный раствор сертралина в хлороформе (10 мкг в пробе). Хроматограмму развивали в хлороформе, а затем – в подвижной фазе метиловый спирт–аммония гидроксид 25% раствор (100:1,5). Детектировали сертралин с помощью реактива Драгендорфа по Мунье. Значения Rf-пятен препарата составили $0,42 \pm 0,02$. Сертралин элюировали с непроявленной полосы хроматограммы метиловым спиртом (степень элюирования – 99,5%), элюат упаривали, остаток растворяли в 1 мл метило-

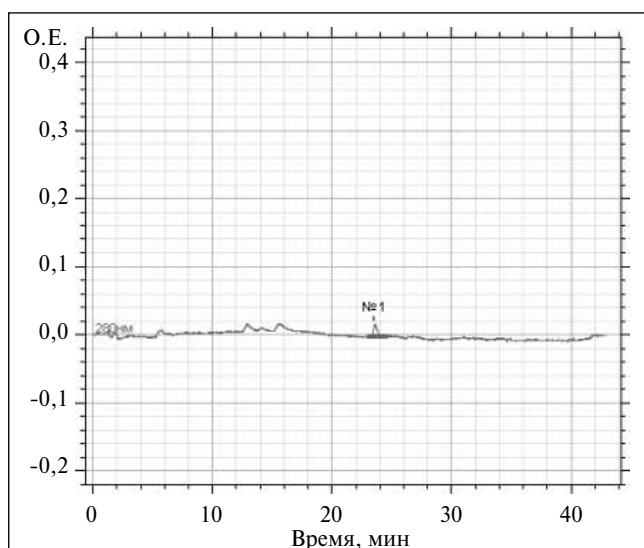


Рис. 1. Хроматограмма сертралина, выделенного из печени по методу А.А. Васильевой (λ детектирования – 280 нм)

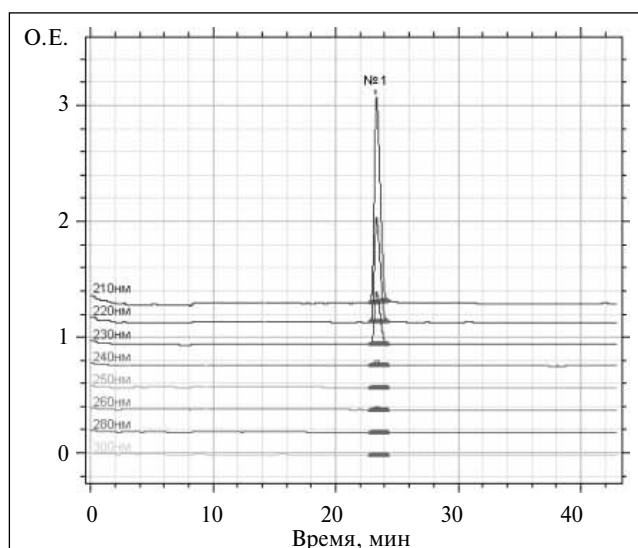


Рис. 2. Хроматограмма стандартного раствора сертралина (100 мкг/мл)

вого спирта, отбирали 10 мкл раствора и исследовали на микроколонном жидкостном хроматографе «Милихром А-02». Условия хроматографирования: колонка размером 2×75 мм с обращенной фазой C_{18} (ProntoSIL-120-5-C18 AQ); элюент А – 0,2 М раствор перхлората лития – 0,005 М раствор перхлорной кис-

лоты, элюент Б – ацетонитрил, режим элюирования – градиентный (от 5% Б до 100% Б за 4 мин, 100% Б в течение 3 мин); скорость подачи подвижной фазы – 100 мкл/мин; температура термостата колонки – 40 °С; объем вводимой пробы – 10 мкл; детектор мультиволновой УФ-спектрофотометрический.

Таблица 1

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ОТНОШЕНИЯ ($R=S_{\lambda}/S_{210}$) ДЛЯ СЕРТРАЛИНА

λ , нм	220	230	240	250	260	280	300
$R=S_{\lambda}/S_{210}$	0,507	0,254	0,027	0,007	0,016	0,013	0,00017
$\Delta\bar{X}$ ($P=95\%$, $\nu=2$)	0,009	0,003	0,002	0,003	0,003	0,001	$8,7 \cdot 10^{-5}$
ϵ , %	1,70	1,02	7,41	43,03	16,14	9,64	51,38

Детектировали сертралин при 8 длинах волн: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм. Идентификацию проводили по времени удерживания (t_R) и спектральным характеристикам ($R=S_{\lambda}/S_{210}$). Значения t_R и R для сертралина в элюатах (рис. 1) совпадали с соответствующими параметрами, полученными для стандартного

раствора сертралина в метаноле (100 мкг/мл), – рис. 2 и составили: $t_R=23,32 \pm 0,01$ мин ($n=3$, $RSD=0,02\%$, $\epsilon=0,05\%$); значения R приведены в табл. 1. Предел обнаружения сертралина в стандартных растворах составил 5 мкг/мл (критерий: $S_s/S_n=3:1$ для $\lambda=280$ нм).

Количественное содержание сертралина в элюатах устанавливали ВЭЖХ-методом при длине волны 280 нм, соответствующей области максимума светопоглощения препарата в метиловом спирте (λ_{max} при 268, 275 и 283 нм). При 280 нм отсутствовал вклад в поглощение элюатов примесей, которые детектировались в коротковолновой области УФ-спектра (210–230 нм) – рис. 3.

С использованием стандартных растворов сертралина в метиловом спирте была установлена градуировочная зависимость площади хроматографического пика (Y) от концентрации (X), которая описывалась уравнением: $Y=(1,75 \cdot 10^{-4} \pm 3 \cdot 10^{-6})X$ (метрологические характеристики градуировочной зависимости: $r=0,999$; $S_0^2=3 \cdot 10^{-8}$; $S_0=1,1 \cdot 10^{-6}$).

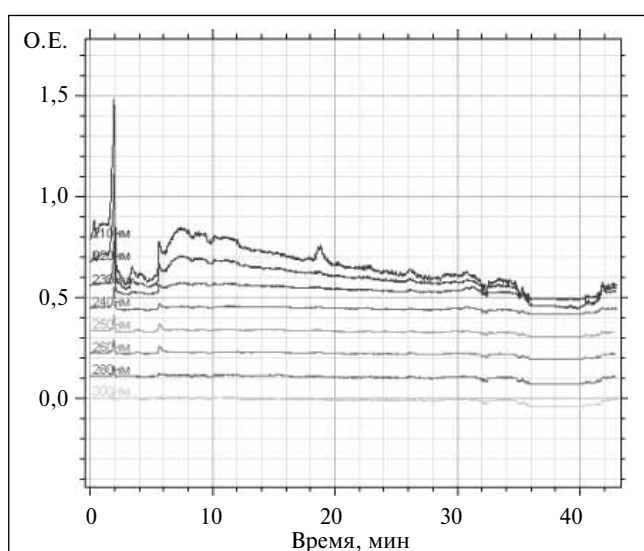


Рис. 3. Хроматограмма элюата, полученного в «холостом» опыте при изолировании по методу А.А. Васильевой

**РЕЗУЛЬТАТЫ ВЭЖХ-ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЕРТРАЛИНА,
ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ПЕЧЕНИ**

Добавлено сертралина к 20 г печени, мкг	Выделено сертралина, X, %	Метрологические характеристики			
		S	S _x	$\Delta\bar{X}$ (P=0,95%, n=4)	ϵ , %
Метод А.А. Васильевой					
2000	20,8	1,54	0,69	1,9	9,2
Метод Стаса-Отто					
2000	11,1	1,11	0,50	1,4	12,5
Метод В.Ф. Крамаренко					
2000	14,8	1,41	0,63	1,8	11,9

ЛИТЕРАТУРА

1. Баяурка С.В., Рибалка Л.И. Розробка методу ізолювання пароксетину з біологічного матеріалу за допомогою хлороформу. Український біофармацевтичний журнал. 2012; 5-6. (22-23): 118-122.
2. Вергейчик Т.Х. Токсикологическая химия. М.: МЕДпресс-информ, 2012. 432.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства: 15-е изд. М.: Новая Волна», 2006; 105.
4. Baselt C. Randall. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. Seal Beach, California: Biomedical Publications, 9th edition, 2011; 1900.
5. Clark's analysis of Drugs and Poisons: Third edition (Электронный ресурс). – Электрон. текстовые, граф. дан. – London: Pharmaceutical Press, 2005: 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). Загл. с экрана.
6. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1) (Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005) (Электронный ресурс). Режим доступа: http://www.bioforum.org.il/Uploads/Editor/karen/q2_r1_step4.pdf.

Поступила 30 декабря 2014 г.

После проверки значимости свободного члена а в уравнении линейной регрессии был сделан вывод о возможности перехода к уравнению вида $y = b'X$. Были установлены некоторые валидационные характеристики методики: линейность наблюдали в пределах от 12,2 до 100 мкг/мл, LOQ=12,2 мкг/мл (рассчитывали на основе величины стандартного отклонения свободного члена а (S_a) по уравнению: $LOQ = 10S_a^2/b$ [6]). Правильность и точность методики составили (n=5): область низких концентраций – 98,9 %, RSD=1,6%; средних – 100,8%, RSD=1,4%; высоких – 100,5%, RSD=1,0%. Результаты изолирования сертралина с помощью указанных методов приведены в табл. 2.

Выводы

1. Установлена степень изолирования сертралина из биологического материала с помощью общепринятых методов. Наиболее эффективным является метод А.А. Васильевой, с его помощью выделено $20,8 \pm 1,9\%$ сертралина.

2. Учитывая липофильность сертралина, оптимизацию методов его выделения из биологического материала следует проводить с использованием амфифильных (ацетонитрил, ацетон) или липофильных (хлороформ) экстрагентов.

CHEMOTOXICOLOGICAL ANALYSIS OF SERTRALINE IN BIOLOGICAL MATERIAL

S.V. Bayurka, PhD; S.A. Karpushina, PhD*; V.P. Moroz, PhD

National Pharmaceutical University; 53 Pushkinskaya St., Kharkov 61002, Ukraine

SUMMARY

Sertraline, an antidepressant of the selective serotonin reuptake inhibitor class, one of the most potent of reversible serotonin inhibitors, is used to treat severe depressions, but it was on repeated occasions a cause of fatal poisoning. The trial established the degree of sertraline isolation from biological material, by using the universally accepted chemotoxicological methods described by A.A. Vasilyeva, V.F. Kramarenko, and Stas-Otto. Sertraline was found in the alkaline-chloroform extracts that had been previously subjected to additional extraction and TLC purifications. Sertraline eluates were analyzed by HPLC and multi-wave UV detection. The drug was identified from its retention time ($t_r = 23.32 \pm 0.01$ min) and spectral characteristics; LOD = 5 µg/ml (criterion, $S_y/S_n = 3:1$ for $\lambda = 280$ nm). The quantity of sertraline in the eluates was determined using the calibration ratio of the area of the chromatographic peak (Y) to the concentration (X) (detected at a wavelength of 280 nm), which was described by the equation: $Y = (1.75 \cdot 10^{-4} \pm 3 \cdot 10^{-6}) \times X$ ($r = 0.999$; $S^2 = 3 \cdot 10^{-9}$). There were some validation characteristics of the methods: linearity was observed in the range from 12.2 to 100 µg/ml; LOQ = 12.2 µg/ml (criterion, 10σ). The correctness and accuracy of the procedure were (n = 5): the range of low (98.9%, RSD = 1.6%); moderate (100.8%; RSD = 1.4%), and high (100.5%, RSD = 1.0%) concentrations. Sertraline was isolated from the liver in a quantity of $20.8 \pm 1.9\%$ by the Vasilyeva method, $11.1 \pm 1.4\%$ by Stas-Otto method, and $14.8 \pm 1.8\%$ by the Kramarenko method. The methods to isolate sertraline from biological material should be further optimized using amphiphilic or lipophilic extragents.

Key words: sertraline, biological material, high performance liquid chromatography, multi-wave UV detector.

REFERENCES

1. Baiurka S.V., Rybalka L.I. Development of the isolation method of paroxetine from the biological material by means of chloroform. Ukrainian biopharmaceutical journal. 2012; 5-6 (22-23): 118-122 (in Russian).
2. Vergeichik T. Kh. Toxicological chemistry: a textbook. 3rd ed. Moscow: MEDpress-inform, 2012: 432 (in Russian).
3. Mashkovski M.D. Medicinal Means. Moscow: New Wave Publishing, 2006: 105 (in Russian).
4. C. Baselt. Randall. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man: 9th ed. Seal Beach, California: Biomedical Publications, 2011: 1900.
5. Clark's analysis of Drugs and Poisons: 3th ed. (electronic resource) / Man. Ed. Laurent Y. Galichet. Electron. text., graph. data. London: Pharmaceutical Press, 2005. – 1 electron. opt. disk (CD-ROM). Title from screen.
6. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1) (Complementary Guideline on Methodology dated 6 November 1996 incorporated in November 2005) (Электронный ресурс). – Available at: http://www.bioforum.org.il/Uploads/Editor/karen/q2_r1_step4.pdf.