

СИНТЕЗ ТА АНАЛІЗ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

УДК 615.065:54.061/062:547.712.22:001.8

<https://doi.org/10.24959/nphj.23.107>

С. В. Баюрка, С. А. Карпушина

Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України

Розроблення умов ізолювання сертраліну з біологічних рідин

Токсикологічне значення лікарських речовин антидепресивної дії постійно зростає. Розроблення ефективних методів прободготовки є актуальним завданням хіміко-токсикологічного аналізу антидепресантів.

Мета дослідження – розробити умови ізолювання антидепресанту сертраліну з крові та сечі методом рідинно-рідинної екстракції.

Матеріали та методи. Дослідження виконували з модельними пробами крові та сечі, які містили сертралін. Під час дослідження крові попередньо осаджували формені елементи додаванням 10 % розчину кислоти трихлорацетатної. Екстракційне очищення виконували гексаном за рН 1 та екстрагували препарат з біологічних рідин хлороформом за рН 8. Отримані екстракти додатково піддавали ТШХ-очищенню. Сертралін в елюатах з хроматограм визначали УФ-спектрофотометричним методом.

Результати та їх обговорення. Значення R_f сертраліну в рухомій фазі метанол – 25 % розчин амонію гідроксиду (100:1,5) становило $0,42 \pm 0,02$. УФ-спектри елюатів з хроматограм мали максимуми світлопоглинання за довжини хвиль 268 ± 2 , 275 ± 2 та 283 ± 2 нм, а за характером світлопоглинання збігалися з УФ-спектром стандартного розчину сертраліну в 0,1 моль/л етанольному розчині кислоти хлоридної. Кількісне визначення виконували за λ_{\max} 275 нм за рівнянням калібрувального графіка $y = 0,00216x - 0,03$. Розроблені методики дозволили виділити з сечі $80,0 \pm 4,0$ % сертраліну, з плазми крові – $39,0 \pm 2,0$ % та з осаду крові після його відокремлення від плазми ще додатково $8,0 \pm 0,7$ % зазначеного антидепресанту.

Висновки. Визначено ефективні умови прободготовки біологічних рідин методом рідинно-рідинної екстракції відносно антидепресанту сертраліну. Отримані результати мають практичне значення для створення алгоритму токсикологічного дослідження біологічних об'єктів на наявність зазначеного антидепресанту в разі летальних інтоксикацій лікарськими препаратами.

Ключові слова: сертралін; біологічні рідини; екстракція; УФ-спектрофотометрія

S. V. Baiurka, S. A. Karpushyna

National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine

Development of conditions for sertraline isolation from biological fluids

The toxicological significance of antidepressant drugs is steadily increasing. Development of the effective methods of the sample preparation is a topical issue of the chemical-toxicological analysis of antidepressants.

Aim. To develop conditions for isolating the antidepressant sertraline from the blood and urine by the liquid-liquid extraction.

Materials and methods. The studies were performed with model blood and urine samples spiked with sertraline. In the study of the blood, the formed blood elements were pre-precipitated by adding a 10 % solution of trichloroacetic acid. Extraction purification was performed with hexane at pH 1, and the drug was extracted from biological fluids with chloroform at pH 8. The extracts obtained were further subjected to the TLC purification. Determination of sertraline in eluates from chromatograms was performed by the UV spectrophotometric method.

Results and discussion. The R_f value of sertraline in the mobile phase of methanol – 25 % ammonium hydroxide solution (100:10.5) was 0.42 ± 0.02 . The UV spectra of the eluates from the chromatograms had absorption maxima at wavelengths of 268 ± 2 , 275 ± 2 and 283 ± 2 nm and matched with the UV spectrum of a standard solution of sertraline in 0.1 mole/L ethanol solution of hydrochloric acid. The quantitative determination was performed at λ_{\max} 275 nm according to the equation of the calibration curve $y = 0,00216x - 0,03$. The methods developed allowed to isolate 80.0 ± 4.0 % of sertraline from the urine, 39.0 ± 2.0 % from the blood serum, and additionally 8.0 ± 0.7 % of the antidepressant studied from the blood sediment after its separation from the blood serum.

Conclusions. The effective conditions for the sample preparation of biological fluids using the liquid-liquid extraction method for the antidepressant sertraline have been determined. The results obtained are of practical importance for creating an algorithm for the toxicological study of biological samples for the presence of this antidepressant in case of fatal drug intoxications.

Key words: sertraline; biological fluids; extraction; UV spectrophotometry

Вступ. Сертралін ((1S,4S)-4-(3,4-дихлорфеніл)-1,2,3,4-тетрагідро-N-метил-1-нафтиламіну гідрохлорид)) – сучасний антидепресант з групи селективних інгібіторів зворотного нейронального захоплення серотоніну, який використовують для фармакокорекції депресивних станів з відчуттям тривоги, що характеризуються їх важким перебігом [1]. За певних умов сертралін здатний викликати серйозні ускладнення в разі його одночасного використання з антидепресантами інших груп, зокрема інгібіторами моноамінооксидази, трициклічними антидепресантами, алкоголем та іншими психоактивними речовинами, а також серотоніновий синдром – рідкісну, потенційно небезпечну для життя побічну реакцію на лікарський засіб [2].

У літературі наведено умови визначення сертраліну в плазмі, цільній крові та сечі з використанням методу високоефективної рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням [3-5], газової хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням після пробопідготовки методом твердофазної екстракції [6]. Зазначені методики потребують спеціальних матеріалів, високоартісного обладнання, що не завжди є доступними для токсикологічної лабораторії.

Метою дослідження було розробити умови ізолювання антидепресанту сертраліну з крові та сечі методом рідинно-рідинної екстракції.

Матеріали та методи. Під час дослідження використовували сертраліну гідрохлорид, виділений з таблеток «Стимулотон» (EGIS, Будапешт, Угорщина), що містили 100 мг сертраліну в таблетці у вигляді 111,9 мг сертраліну гідрохлориду (чистоту отриманої субстанції підтверджували методами ТШХ, УФ-спектроскопії, ВЕРХ). Усі реактиви мали кваліфікацію не нижче «ч.д.а.».

Методика ізолювання сертраліну з сечі. До 50 мл сечі людини додавали 1 мл водного розчину сертраліну, що містив від 200 до 1000 мкг препарату, і суміш залишали на 24 год. Паралельно ставили «сліпі» досліді. Після цього до проб сечі додавали 0,1 моль/л розчин кислоти хлоридної до значення рН 1 і для видалення біологічних домішок суміш збовтували з 10 мл *n*-гексану. Фазу органічного розчинника відкидали й далі не досліджували. Потім до підкисленої сечі, що залишилась, додавали 20 % розчин натрій гідроксиду до рН 8 і тричі екстрагували сертралін хлороформом по 15 мл кожного разу. Емульсії, що утворювались, руйнували центрифугуванням протягом 15 хв зі швидкістю 3000 об/хв. Центрифугат фільтрували через паперовий фільтр з 0,5 г безводного натрій сульфату до мірної колби місткістю 50 мл і доводили хлороформом до позначки.

Методика ізолювання сертраліну з крові. До 10 мл донорської крові додавали по 1 мл водного розчину сертраліну, що містив від 100 до 500 мкг препарату, перемішували та залишали на добу. Через добу до 10 мл модельної суміші сертраліну з кров'ю додавали 10 мл 10 % розчину кислоти трихлорацетатної та перемішували. Після цього суміш центрифугували

протягом 15 хв зі швидкістю 3000 об/хв. Центрифугат зливали й екстрагували домішки з кислого середовища 10 мл гексану. Фазу органічного розчинника відокремлювали та відкидали, а потім, після підлогування кислої водної фази до рН 8 за допомогою 20 % розчину натрій гідроксиду, тричі екстрагували сертралін хлороформом по 10 мл кожного разу. Одержані «лужні» екстракти фільтрували через паперовий фільтр з 0,5 г безводного натрій сульфату до мірної колби місткістю 50 мл та доводили до позначки хлороформом.

Методика ізолювання сертраліну з осаду крові. Осад крові, що залишився у склянці для центрифугування після відокремлення плазми, зважували та переносили до порцелянової ступки. Осад ретельно розтирали з потрібною кількістю безводного натрій сульфату до отримання однорідної сипкої маси, якою наповнювали скляну колонку заввишки 25 см та діаметром 1 см. Попередньо перед заповненням колонки до неї вносили невеличкий ватний тампон, що запобігало попаданню розтертої маси у скляний кран. Обережним постукуванням по колонці сипку масу ущільнювали. Над колонкою закріплювали ділільну лійку, що вміщувала 50 мл хлороформу, який пропускали через колонку зі швидкістю 60-80 крапель за хв. Хлороформний елюат випаровували в порцеляновій чашці до видалення органічного розчинника на водяній бані за температури, не вищій 40 °С. Залишок розчиняли в 0,1 моль/л етанольному розчині кислоти хлоридної та екстрагували домішки з кислого середовища 10 мл *n*-гексану. Фазу органічного розчинника відокремлювали та відкидали, а потім, після підлогування кислої водної фази до рН 8 за допомогою 20 % розчину натрій гідроксиду, тричі екстрагували сертралін хлороформом по 10 мл кожного разу. Одержані «лужні» екстракти фільтрували через паперовий фільтр з 0,5 г безводного натрій сульфату до мірної колби місткістю 50 мл та доводили до позначки хлороформом.

Паралельно одержували екстракти у «сліпих» досліді з біологічними рідинами.

Методика ТШХ-очищення. Відбирали 3-5 мл біологічних екстрактів, випаровували їх до мінімального об'єму (приблизно 0,05 мл) та наносили смугою на хроматографічну пластинку Merck (Silica gel 60 F254). Поруч зі смугою наносили такий же об'єм екстракту, отриманого з біологічних рідин у «сліпому» досліді, та стандартний розчин сертраліну в хлороформі (10 мкг у пробі). Хроматограму спочатку розвивали в хлороформі, а потім у рухомій фазі метанол – амонію гідроксид 25 % розчин (100:1,5). Детектували сертралін за допомогою підкисленого розчину калій йодоплатинату (спостерігали фіолетове забарвлення плями препарату на пластинці, чутливість виявлення становила 0,5 мкг сертраліну в пробі). Під час дослідження екстракту, отриманого у «сліпому» досліді, відповідної плями не спостерігали.

Препарат елюювали метанолом з непроявленої зони хроматограми на рівні, який відповідав місцю перебування плями «свідка» сертраліну, елюат

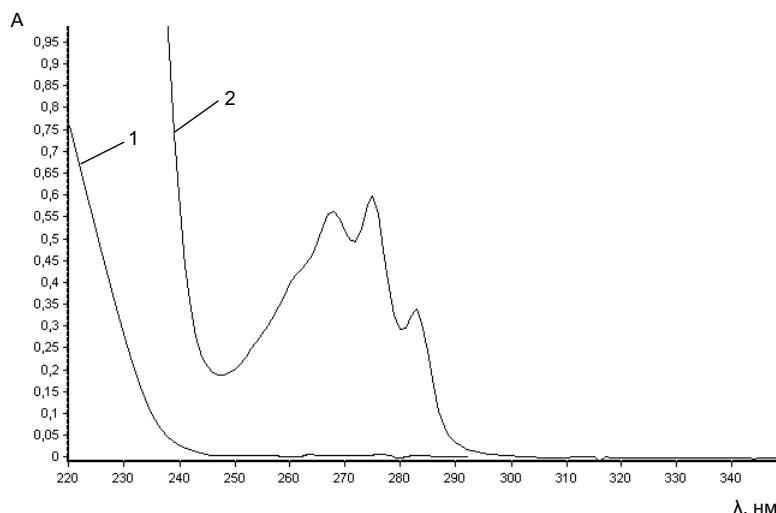


Рис. УФ-спектр світлопоглинання сертраліну в 0,1 моль/л етанольному розчині кислоти хлоридної (1 – концентрація $6 \cdot 10^{-5}$ моль/л; 2 – концентрація $8 \cdot 10^{-4}$ моль/л)

фільтрували через паперовий фільтр та випаровували (ступінь елюювання сертраліну з шару сорбенту метанолом складав 99,4 %). Отриманий залишок розчиняли в 4 мл 0,1 моль/л етанольного розчину кислоти хлоридної.

Кількісне визначення сертраліну в екстрактах методом УФ-спектрофотометрії. Світлопоглинання елюатів вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 за $\lambda_{\max} = 275$ нм, використовуючи кювету з шаром рідини завтовшки 10 мм. Як розчин порівняння застосовували розчин, отриманий у «сліпому» досліді.

Для побудови калібрувального графіка готували стандартний розчин (СР) і робочі стандартні розчини (РСР) сертраліну. 0,02800 г сертраліну гідрохлориду, що в перерахунку відповідало 0,02500 г сертраліну-основи, розчиняли у 0,1 моль/л етанольному розчині кислоти хлоридної в мірній колбі місткістю 50,00 мл (отримано СР з концентрацією 500,0 мкг/мл сертраліну-основи). Для приготування РСР у мірній колбі місткістю 10,00 мл вносили по 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 8,00 та 9,00 мл СР і доводили об'єми розчинів до мітки 0,1 моль/л етанольним розчином кислоти хлоридної (РСР 1–9, концентрація – 25,0; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0; 300,0; 400,0 та 450,0 мкг/мл відповідно). Вимірювали світлопоглинання отриманих СР і РСР.

Результати та їх обговорення. Оптимізацію умов ізолювання сертраліну з біологічних рідин було проведено на основі попереднього вивчення ефективності екстракції препарату з водних розчинів органічними розчинниками. Найнижчий ступінь екстракції сертраліну отримано для гексану за рН 1 (23 %), ці умови й було обрано для видалення з екстрактів біологічних домішок. У найбільших кількостях сертралін екстрагувався хлороформом за рН 8 (ступінь екстракції складав 79 %).

Ідентифікацію сертраліну в біологічних екстрактах виконували методом ТШХ за величиною з R_f , яка в рухомій фазі метанол – 25 % розчин амонію гідроксиду (100:10,5) складала $0,42 \pm 0,02$. Також досліджували УФ-спектри елюатів з хроматограм, які за

Таблиця 1

Результати кількісного визначення сертраліну, виділеного з сечі, УФ-спектрофотометричним методом (пересічне з п'яти визначень)

Додано сертраліну до 50 мл сечі, мкг	Виділено сертраліну		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
200	154,2	77,1	$\bar{X} = 80,0$ $S = 2,9$ $S_{\bar{x}} = 1,3$ $\Delta\bar{X} = 4,0$ $\epsilon = 4,5$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 80,0 \pm 4,0$
300	243,6	81,2	
500	402,5	80,5	
700	592,2	84,6	
1000	783,0	78,3	

характером світлопоглинання збігалися з УФ-спектром стандартного розчину сертраліну в 0,1 моль/л етанольному розчині кислоти хлоридної та мали максимуми світлопоглинання за довжини хвиль 268 ± 2 , 275 ± 2 та 283 ± 2 нм (рис.).

Кількісне визначення сертраліну в екстрактах проводили методом УФ-спектрофотометрії за довжини хвилі 275 нм, що відповідала більш інтенсивному світлопоглинанню. Значення світлопоглинання для СР і 9 РСР ($m = 10$; $n = 2$) було оброблено методом лінійної регресії та отримано рівняння калібрувального графіка: $y = 0,00216x - 0,03$ ($r = 0,999$; $S_{\sigma}^2 = 1,3 \cdot 10^{-4}$). Лінійність спостерігали в межах концентрацій сертраліну 25,0-500,0 мкг/мл. Значення LOD та LOQ було розраховано з величини стандартного відхилення вільного члена в рівнянні калібрувального графіка (S_d) згідно з формулами: $LOD = 3,3 \cdot S_d/b$ та $LOQ = 10 \cdot S_d/b$. Вони становили 7,4 мкг/мл та 22,6 мкг/мл відповідно.

Результати кількісного визначення сертраліну, виділеного з сечі, а також з плазми крові та осаду крові після його відокремлення від плазми, наведено в табл. 1-3.

Як бачимо, за допомогою розроблених методик із сечі можливо виділити $80,0 \pm 4,0$ % сертраліну, з плазми крові – $39,0 \pm 2,0$ %, а з осаду крові після його відокремлення від плазми ще додатково

Таблиця 2

Результати кількісного визначення сертраліну, виділеного з плазми крові, УФ-спектрофотометричним методом (пересічне з п'яти визначень)

Додано сертраліну до 10 мл крові, мкг	Виділено сертраліну		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
100	38,4	38,4	$\bar{X} = 39,0$ $S = 1,7$ $S_x = 0,8$ $\Delta\bar{X} = 2,0 \quad \varepsilon = 5,4$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 39,0 \pm 2,0$
200	82,6	41,3	
300	110,4	36,8	
400	158,4	39,6	
500	200,5	40,1	

$8,0 \pm 0,7$ % зазначеного антидепресанту. Отже, аналіз осаду з крові на вміст у ньому сертраліну суттєво підвищує ступінь його ізолювання із зазначеної біологічної рідини.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Визначено ефективні умови пробопідготовки біологічних рідин методом рідинно-рідинної

Таблиця 3

Результати кількісного визначення сертраліну, виділеного з осаду крові після відокремлення його від плазми, УФ-спектрофотометричним методом (пересічне з п'яти визначень)

Додано сертраліну до 10 мл крові, мкг	Виділено сертраліну		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
100	8,1	8,1	$\bar{X} = 8,0$ $S = 0,5$ $S_x = 0,2$ $\Delta\bar{X} = 0,7 \quad \varepsilon = 8,1$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 8,0 \pm 0,7$
200	16,6	8,3	
300	21,9	7,3	
400	34,8	8,7	
500	39,0	7,8	

екстракції відносно антидепресанту сертраліну. Отримані результати мають практичне значення для створення алгоритму токсикологічного дослідження біологічних об'єктів на наявність зазначеного антидепресанту в разі летальних інтоксикацій лікарськими препаратами.

Конфлікт інтересів: відсутній.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Comparison of vortioxetine and sertraline for treatment of major depressive disorder in elderly patients: A double-blind randomized trial / F. Borhannejad et al. *J. Clin. Pharm. Ther.* 2020. Vol. 45, Iss. 4. P. 804–811. DOI: 10.1111/jcpt.13177.
2. Duignan K. M., Quinn A. M., Matson A. M. Serotonin syndrome from sertraline monotherapy. *Am. J. Emerg. Med.* 2020. Vol. 38, Iss. 8. P. 1695.e5-1695.e6. DOI: 10.1016/j.ajem.2019.158487.
3. Determination of Sertraline in Human Plasma by UPLC–MS/MS and its Application to a Pharmacokinetic Study / Y. Xiao-Hong et al. *J. Chromatogr. Sci.* 2016. Vol. 54, Iss. 2. P. 195–199. DOI: 10.1093/chromsci/bmv128.
4. Das R., Agrawal Y. K. Monitoring of Selective Reuptake Inhibitors in Human Urine, Plasma and Oral Fluid by Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 2013. Vol. 51, Iss. 2. P. 146–154. DOI: 10.1093/chromsci/bms119.
5. Amundsen I., Oiestad A. M., Ekeberg D., Kristoffersen L. Quantitative determination of fifteen basic pharmaceuticals in ante- and post-mortem whole blood by high pH mobile phase reversed phase ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2013. Vol. 927, Iss. 1. P. 112–123. DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.12.039.
6. Analysis of Sertraline in Postmortem Fluids and Tissues in 11 Aviation Accident Victims / R. G. Lewis et al. *J. Analyt. Toxicol.* 2013. Vol. 37, Iss. 4. P. 208–216. DOI: <https://doi.org/10.1093/jat/bkt014>.

REFERENCES

1. Borhannejad, F., Shariati, B., Naderi, S., Shalbafan, M., Mortezaei, A., Sahebolzamani, E. et al. (2020). Comparison of vortioxetine and sertraline for treatment of major depressive disorder in elderly patients: A double-blind randomized trial. *Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 45 (4), 804–811. doi: <https://doi.org/10.1111/jcpt.13177>.
2. Duignan, K. M., Quinn, A. M., Matson, A. M. (2020). Serotonin syndrome from sertraline monotherapy. *American Journal of Emergency Medicine*, 38 (8), 1695.e5-1695.e6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2019.158487>.
3. Xiao-Hong, Y., Zhen, W., Dong-Dong, T., Jian-Wei, Z., Kang, Z., Qiang, Y. (2016). Determination of Sertraline in Human Plasma by UPLC–MS/MS and its Application to a Pharmacokinetic Study. *Journal of Chromatographic Science*, 54 (2), 195–199. doi: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmv128>.
4. Das, R., Agrawal, Y. K. (2013). Monitoring of Selective Reuptake Inhibitors in Human Urine, Plasma and Oral Fluid by Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography Science*, 51 (2), 146–154. doi: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bms119>.
5. Amundsen, I., Oiestad, A. M., Ekeberg, D., Kristoffersen, L. (2013). Quantitative determination of fifteen basic pharmaceuticals in ante- and post-mortem whole blood by high pH mobile phase reversed phase ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical Life Sciences*, 927 (1), 112–123. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.12.039>.
6. Lewis, R. J., Mike, K. A., Williamson, K. S., Johnson, R. D. (2013). Analysis of Sertraline in Postmortem Fluids and Tissues in 11 Aviation Accident Victims. *Journal of Analytical Toxicology*, 37 (4), 208–216. doi: <https://doi.org/10.1093/jat/bkt014>.

Відомості про авторів:

Баюрка С. В., доктор фармацевт. наук, професор кафедри аналітичної хімії та аналітичної токсикології, Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України. E-mail: serhii.baiurka@gmail.com. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7505-6322>

Карпушина С. А., кандидатка хім. наук, доцентка кафедри аналітичної хімії та аналітичної токсикології, Національний фармацевтичний університет Міністерства охорони здоров'я України. E-mail: svitkrp@gmail.com. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8834-4286>

Information about authors:

Baiurka S. V., Doctor of Pharmacy (Dr. habil.), professor of the Department of Analytical Chemistry and Analytical Toxicology, National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine. E-mail: serhii.baiurka@gmail.com. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7505-6322>

Karpushyna S. A., Candidate of Chemistry (Ph.D), associate professor of the Department of Analytical Chemistry and Analytical Toxicology, National University of Pharmacy of the Ministry of Health of Ukraine. E-mail: svitkrp@gmail.com. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8834-4286>

Надійшла до редакції 17.01.2023 р.