

І.Й. Галькевич, Б.С. Зіменковський, Г.С. Труш

## ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ МЕТОДИК ІЗОЛЮВАННЯ СЕРТРАЛІНУ ТА ЙОГО МЕТАБОЛІТУ ІЗ БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького,  
м. Львів, Україна

e-mail: galkirin@meduniv.lviv.ua

**Резюме:** Запропоновано умови ідентифікації та кількісного визначення сертраліну і його метаболіту (N-деметилсертраліну) методом вискоєфективної рідинної хроматографії. Рухома фаза ацетонітрил та 0,1% розчин трифторацетатної кислоти. Проведено порівняльну оцінку ефективності ізолювання сертраліну та його метаболіту із органів шурів (печінка та мозок) та плазми водою, підкисленою оксалатною кислотою та ацетонітрилом, підкисленим ацетатною кислотою. Очищення та концентрування виділених сполук проводили методами екстракції хлороформом при рН 8–9 та твердофазної екстракції на картриджах Oasis. Встановлено, що ацетонітрилом ізолюються у 2–2,5 рази вищі кількості сертраліну та деметилсертраліну із органів. Встановлено, що через 24 год. співвідношення між вмістом сертраліну та деметилсертраліну є практично однаковим у всіх органах, відібраних для аналізу. Вміст сертраліну становив 83,85–86,53%, а N-деметилсертраліну 13,47–16,15%.

**Ключові слова:** сертралін, N-деметилсертралін, виділення із біологічних об'єктів, твердофазна екстракція, вискоєфективна рідинна хроматографія.

**Вступ.** До числа лікарських засобів (ЛЗ), що характеризуються антидепресивною активністю, яка проявляється селективним блокуванням зворотнього захоплення серотоніну нейронами в головному мозку, належить сертралін<sup>1,2</sup>. Даний ЛЗ ефективний при лікуванні депресивних станів, що супроводжуються відчуттям тривоги, нав'язливих та мніакальних синдромів, посттравматичних розладів, несумісний з інгібіторами моноаміноксидази (MAO), при тривалому вживанні викликає анорексію<sup>3,4,6,12</sup>.

Сертралін належить до групи похідних нафтиламіну і у хімічному відношенні представляє собою (1S, 4S)-4-(3,4-дихлорфеніл)-1,2,3,4-тетрагідро-N-метил-1-нафталенамін гідрогенхлорид. Основним метаболітом сертраліну є N-деметилсертралін, який не виявляє фармакологічної активності, оскільки є неактивним у моделях депресій *in vivo*<sup>7,8,13</sup>.

Сертралін іноді використовується із суїцидальною метою. Описані випадки отруєнь даним ЛЗ, у тому числі летальні, внаслідок передозування<sup>9,10</sup>.

**Метою роботи** була розробка ефективної та експресної методики ізолювання сертраліну із внутрішніх органів та опрацювання умов ідентифікації та кількісного визначення даної сполуки в присутності основного метаболіту методом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

**Матеріали та методи дослідження.** При розробці методики ідентифікації та кількісного визначення сертраліну та N-деметилсертраліну методом ВЕРХ застосовували їх стандартні зразки (*Sigma*, США). Для побудови градууювальних графіків готували розчини сертраліну гідрогенхлориду та деметилсертраліну із вмістом 100 мкг/мл кожної сполуки. Шляхом розведення цих розчинів метанолом, готували серію розчинів сертраліну та N-деметилсертраліну із вмістом 0,4; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 та 20,0 мкг/мл. Виготовлені розчини хроматографували 6 разів згідно з рекомендаціями *GTFCh*<sup>1</sup>, а результати обробляли використовуючи програмне забезпечення «*Empover Pro*».

Експериментальні дослідження проводились на рідинному хроматографі «*Waters 2690 Separation Module*», детектор діодно-матричний, довжина хвилі детектування 210 нм, колонка «*Silica Type ACE 5C18*» (250 мм x 4,6 мм), робоча температура колонки 25°C. Розділення проводили в градієнтному режимі від 95% до 10% розчину А та від 5 до 90% розчину В за 30 хв. Розчин А – 0,1% водний розчин трифторацетатної кислоти (ТФА), розчин В – ацетонітрил. Швидкість рухомої фази 1 мл/хв, об'єм введеної проби 10 мкл.

Дослідження ефективності ізолювання сертраліну та його метаболіту вивчали на тваринах. В роботі використовували самки щу-

рів масою 200–240 г, яким через зонд вводили водну суспензію, отриману із таблеток *Zoloft* (50 мг, Pfizer).

Протягом одного дня сертралін вводили тваринам у дозі, яка становила 1/5 від LD<sub>50</sub>. Для щурів LD<sub>50</sub> сертраліну гідрогенхлориду коливається в межах від 1327 до 1591 мг/кг<sup>14</sup>. Розрахунок необхідної кількості сертраліну проводили, виходячи із дози 1500 мг/кг. Експериментальним тваринам вводили перорально розраховану кількість сертраліну (за 3 прийоми, проміжок між введенням становив 5 год.), а через 24 год. після останнього введення ЛЗ здійснювали декапітацію тварин. Для дослідження використовували печінку, мозок та кров, з якої одержували плазму, шляхом центрифугування останньої (20 хв. при 15000 об/хв).

Відібрані органи (печінку та мозок) подрібнювали і розділяли на 2 рівні частини (за масою). Із 1-ої порції відповідного органу ізолювали сертралін водою, підкисленою оксалатною кислотою. Дана методика застосовується у вітчизняних відділеннях судово-медичної токсикології бюро судово-медичної експертизи для виділення низки токсичних речовин із зразків біологічного матеріалу, що не піддавався процесам гниття<sup>5</sup>.

2-гу частину біологічного матеріалу піддавали дослідженню, застосовуючи методику, яка опрацьована нами для ізолювання психотропних та наркотичних речовин.

Методика ізолювання сертраліну із біологічного матеріалу ацетонітрилом. Подрібнений біологічний матеріал заливали ацетонітрилом до повного покриття частинок і підкислювали 30% розчином ацетатної кислоти (до рН 2–3 за універсальним індикатором).

Досліджувані проби обробляли ультразвуком (15 хв., частота 42 кГц та потужність 50 Вт) і залишали на 15 хв., періодично перемішуючи проби.

Ацетонітрильні фази зливали, а біологічний матеріал повторно настоювали 30 хв. з ацетонітрилом, із додаванням 30% розчину ацетатної кислоти та обробкою проб ультразвуком протягом 15 хв.

Ацетонітрильні витяжки об'єднували і проводили трикратну екстракцію сертраліну хлороформом при рН 8–9, яке створювали додаванням до кислих ацетонітрильних витяжок 25% розчину аміаку. В цьому інтервалі рН середовища також екстрагується і метаболіт сертраліну. Об'єм хлороформу, що брали для екстракції, становив 1/4 від об'єму витяжки.

Органічний розчинник із хлороформових екстрактів, отриманих при ізолюванні сертраліну 2-ма методами, випаровували досуха в потоці азоту, а сухі залишки розчиняли в 5 мл метанолу. Метанольні розчини розводили водою у об'ємному співвідношенні 1:1 і піддавали додатковій очистці методом твердофазної екстракції (ТФЕ). По 1 мл метанольно-водних розчинів пропускали через картриджі *Oasis HLB 30 mg (Waters)*. Попередньо картриджі кондиціонували 1 мл метанолу та 1 мл води. Після пропускання проби картриджі промивали 1 мл розчином хлоридної кислоти (рН 2,78) і елюювали досліджувані сполуки 1 мл метанолу. Нами встановлено, що при таких умовах застосування ТФЕ елююється із метанольно-водних розчинів 99,8–100,1% сертраліну та N-деметилсертраліну. Метанольні фази випаровували досуха в потоці азоту, розчиняли в 200 мкл метанолу і цей розчин використовували для дослідження методом ВЕРХ.

Ізолювання сертраліну із плазми. При ізолюванні сертраліну із плазми застосовували концентрування та очистку на картриджах *Oasis*. Підготовка картриджів полягала в їх кондиціонуванні 1 мл метанолу та 1 мл дистильованої води. Після цього через картриджі пропускали по 1 мл плазми і промивали їх 0,1 М розчином хлоридної кислоти. Елювання проводили 2 мл метанолу із 0,1% вмістом хлоридної кислоти. Елюати випаровували в потоці азоту, сухі залишки розчиняли в 200 мкл метанолу та піддавали дослідженню методом ВЕРХ.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Ідентифікацію сертраліну та його метаболіту на хроматографах проводили за часом утримування та за УФ-спектрами. Час утримування N-деметилсертраліну становив 18,69±0,03 хв., а сертраліну 19,65±0,03 хв. (рис. 1).

Коефіцієнт розділення 2-ох піків 1,45. На УФ-спектрах сертраліну, виділеного із органів та плазми, максимумами смуг світлобілення спостерігались при 205–207 нм та 271,5 нм, а для N-деметилсертраліну при 201–202 нм та 271,5 нм.

Кількості сертраліну та його метаболіту в досліджуваних пробах визначали за рівняннями прямих, розрахованих методом найменших квадратів.

Для сертраліну в діапазоні концентрацій від 0,4 до 1 мкг/мл рівняння мало вигляд:

$$Y=0,0536X-0,003,$$

а для вищих концентрацій:

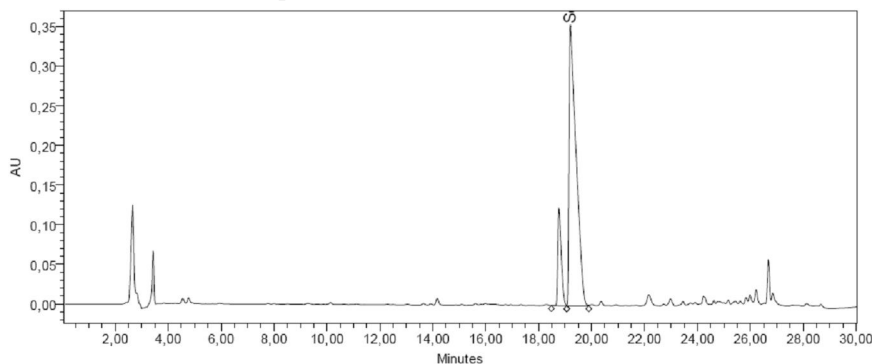
$$Y=0,0215X-0,0018.$$

Відповідно для N-деметилсертраліну в діапазоні концентрацій 0,4–1 мкг/мл рівняння описувалося залежністю:

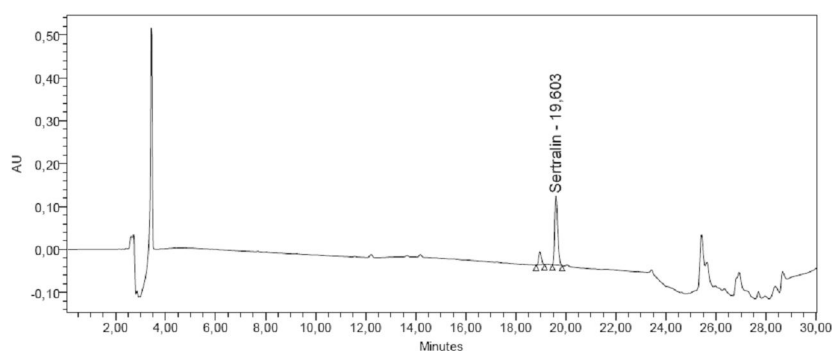
$$Y=0,0529X-0,0029,$$

а для вищих концентрацій

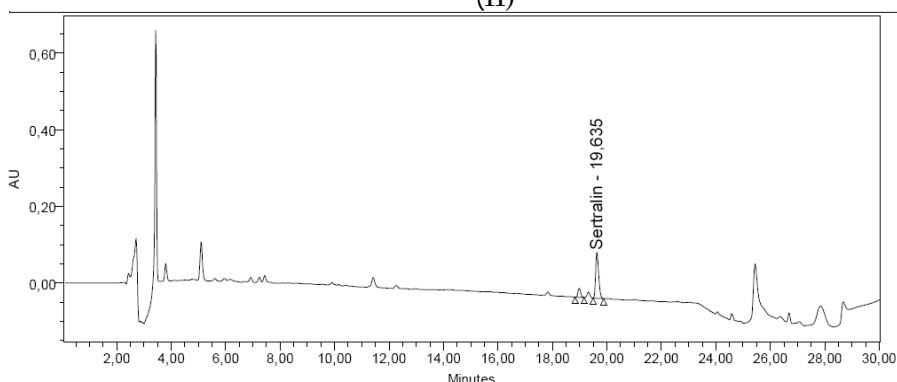
$Y=0,0209X-0,0021,$   
де Y – площа піку, X – концентрація відповідної сполуки (мкг/мл).



(I)



(II)



(III)

Рис. 1. Хроматограми проб, отриманих при ізолюванні сертраліну із печінки (I), мозку (II) та плазми (III) щурів

Межа кількісного визначення сертраліну та N-деметилсертраліну при даних умовах хроматографування становила 0,4 мкг/мл.

Метод внутрішньої нормалізації використовували для визначення вмісту сертраліну та його метаболіту (у %) в аналізованих пробах. Результати ізолювання сертраліну із печінки, мозку та плазми тварин наведені в таблиці 1.

Наведені дані свідчать, що через 24 год. після останнього введення, сертралін та його метаболіт виявляється в усіх органах, взятих для дослідження.

Найбільші кількості сертраліну містяться в печінці, дещо нижчі кількості сертраліну можна визначити в мозку, а найменша концентрація спостерігається у плазмі.

При кількісному визначенні досліджуваних сполук методом внутрішньої нормалізації встановлено, що у відібраних органах та плазмі вміст сертраліну становить 83,85–86,53%, а N-деметилсертраліну 13,47–16,15% у всіх досліджуваних пробах.

При ізолюванні сертраліну із органів ацетонітрилом, підкисленим ацетатною кислотою, ізолюється у 2–2,5 рази вищі кількості,

як досліджуваного ЛЗ, так і його метаболіту у порівнянні із методом, що ґрунтувався на використанні води, підкисленої оксалатною кислотою.

Таблиця 1. Результати визначення сертраліну та його метаболіту в біологічних пробах

Метод ізолювання	Об'єкт аналізу	Виділено із 1 г біологічної проби, мкг		Вміст сполуки в аналізованій пробі	
		N-деметилсертраліну	Сертраліну	N-деметилсертраліну	Сертраліну
Водою, підкисленою оксалатною кислотою	печінка	42	220	15,55	84,45
		37	227	13,85	86,15
		51	258	15,76	84,24
		46	256	14,70	85,30
		35	208	14,85	85,15
				$\bar{X} = 14,94$	$\bar{X} = 85,06$
			$S = 0,76; S_{\bar{x}} = 0,34$		
			$\bar{X} \pm \Delta X = 14,94 \pm 1,56$ $\varepsilon = 10,42 \%$	$\bar{X} \pm \Delta X = 85,06 \pm 1,56$ $\varepsilon = 1,83 \%$	
	мозок	17	94	15,02	84,98
		12	75	14,20	85,80
		23	140	14,56	85,44
		19	103	14,67	85,33
		20	108	14,50	85,50
				$\bar{X} = 14,59$	$\bar{X} = 85,41$
		$S = 0,30; S_{\bar{x}} = 0,13$			
		$\bar{X} \pm \Delta X = 14,59 \pm 0,62$ $\varepsilon = 10,42 \%$	$\bar{X} \pm \Delta X = 85,41 \pm 0,62$ $\varepsilon = 0,72 \%$		
Ацетонітрилом, підкисленим ацетатною кислотою	печінка	103	540	15,81	84,19
		85	507	14,16	85,84
		122	619	16,15	83,85
		99	553	14,90	85,10
		84	451	15,48	84,52
				$\bar{X} = 15,30$	$\bar{X} = 84,70$
			$S = 0,79; S_{\bar{x}} = 0,35$		
			$\bar{X} \pm \Delta X = 15,30 \pm 1,62$ $\varepsilon = 10,58 \%$	$\bar{X} \pm \Delta X = 84,70 \pm 1,62$ $\varepsilon = 1,91 \%$	
	мозок	36	188	15,35	84,65
		26	166	14,57	85,43
		54	322	14,22	85,78
		38	209	14,89	85,11
		48	259	14,65	85,35
				$\bar{X} = 14,74$	$\bar{X} = 85,26$
		$S = 0,41; S_{\bar{x}} = 0,18$			
		$\bar{X} \pm \Delta X = 14,74 \pm 0,84$ $\varepsilon = 5,69 \%$	$\bar{X} \pm \Delta X = 85,26 \pm 0,84$ $\varepsilon = 1,10 \%$		
Твердофазна екстракція на катриджах Oasis	плазма	15	75	13,47	86,53
		11	75	14,56	85,44
		20	113	14,92	85,08
		17	94	15,17	84,83
		19	101	13,60	86,40
			$\bar{X} = 14,34$	$\bar{X} = 85,66$	
			$S = 0,77; S_{\bar{x}} = 0,34$		
		$\bar{X} \pm \Delta X = 14,34 \pm 1,58$ $\varepsilon = 11,01 \%$	$\bar{X} \pm \Delta X = 85,66 \pm 1,58$ $\varepsilon = 1,85 \%$		

**Висновки:**

1. Розроблено умови ідентифікації та кількісного визначення сертраліну та N-деметилсертраліну при 210 нм на колонці *Silica Type ACE 5C18*, та градієнтному режимі подачі рухомої фази. Межа кількісного визначення двох сполук 0,4 мкг/мл.
2. Проведено порівняльну оцінку ефективності ізолювання із органів тварин сертраліну та його метаболіту водою, підкисленою оксалатною кислотою, та ацетонітрилом, підкисленим ацетатною кислотою. Встановлено, що при використанні ацетонітрилу ефективність ізолювання зростає у 2–2,5 рази.
3. Встановлено, що через 24 год. після останнього перорального введення сертра-

ліну у досліджуваних органах тварин (печінка, мозок та плазма) вміст сертраліну

становить 83,85–86,53%, а вміст N-деметилсертраліну 13,47–16,15%.

#### Література:

1. Громов Л.А. Селективные ингибиторы обратного захвата серотонина: современное положение в терапии депрессий / Л.А. Громов, Л.А. Чайка, О.Н. Гомон [и др.] // Рациональная фармакотерапия. – 2008. – №3. – С. 27–30.
2. Дробизев М.Ю. Использование современных антидепрессантов у больных с терапевтической патологией / М.Ю. Дробизев // Consilium medicum. – 2002. – Т. 4. – № 5. – С. 35-42.
3. Малин И.Б. Побочное действие антидепрессантов / И.Б. Малин, В. М. Медведев // Психиатрия и психофармакотерапия. – 2002. – Т. 4. – № 5. – С. 10-19.
4. Порошина Е.Г. Психофармакотерапия в клинике внутренних болезней / Е.Г. Порошина // ФАРМиндекс-Практик. – 2004. – вып. 6. – С. 12-23.
5. Правила проведения судебно-медицинских экспертиз (досліджень) у відділеннях судово-медичної токсикології бюро судово-медичної експертизи. Міністерство охорони здоров'я України від 17.01.1995 р. №6. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: [http://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z\\_0248-95](http://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z_0248-95)
6. Baldessarini R.J. Drug therapy of depression and anxiety disorders / R.J. Baldessarini. // The pharmacological basis of therapeutics, 11<sup>th</sup> ed. New.York: The McGraw-Hill Companies, 2006. – 445 p.
7. Carrasco J.L. Clinical effects of pharmacological variations in selective serotonin reuptake inhibitors: an overview / J.L.Carrasco, C. Sandner // Int. J. Clin. Pract. – 2005. – №12. – P. 1428-1434.
8. Chander W.P. Serotonin syndrome in maintenance haemodialysis patients following sertraline treatment for depression / W.P. Chander, N. Singh, G.K. Mukhija // J.Indian.Assoc. – 2011. – № 1. – P. 36-37.
9. Garcia-Aparicio J. Toxic hepatitis following sequential treatment with cotrimoxazol, levofloxacin, doxycycline and sertraline in a patient with a respiratory infection / J. Garcia-Aparicio, J.I. Herrero-Herrero // Farm. Hosp. – 2010. – № 3. – P. 152-154.
10. Goeringer K.E. Postmortem forensic toxicology of selective serotonin reuptake inhibitors: a review of pharmacology and report of 168 cases / K.E. Goeringer, L.Raymon, G.D.Christian // J. Forensic Sci. – 2000. – № 3. – P. 633-648.
11. Peters F.T. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology / F.T. Peters, H.H. Maurer // Accred. Qual. Assur. – 2002. – № 7. – P. 441-449.
12. Potter W.Z. Antidepressant agents / W.Z. Potter, L.E. Hollister. Basic and clinical pharmacology. 10th ed. – 2007.- New York: The McGraw-Hill Companies, 2007. – 475 p.
13. Sanchez C. Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding / C. Sanchez, J. Hyttel. // Cell Mol. Neurobiol. – 1999. – № 4. – P. 467-489.
14. Sertraline Hydrochloride Oral Concentrate -20 mg/ml. Material safety data sheet, Pfizer. [Електронний ресурс]. – 2006. – Режим доступу: <http://www.pfizer.com/files/products/material.safety.data/268.pdf>

УДК 615.214.24:543.05:543.544.5.068.7

### ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДИК ИЗОЛИРОВАНИЯ СЕРТРАЛИНА И ЕГО МЕТАБОЛИТА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

И.И. Галькевич, Б.С. Зименковский, Г.С. Труш

Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, г Львов, Украина

**Резюме:** Предложены условия идентификации и количественного определения сертраліна и его метаболита (N-деметилсертраліна) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Подвижная фаза ацетонитрил – 0,1% раствор трифторацетатной кислоты. Проведено сравнительную оценку эффективности изолирования сертраліна и его метаболита из органов крыс (печень и мозг) и плазмы водой, подкисленной оксалатной кислотой и ацетонитрилом, подкисленным ацетатной кислотой. Очистку и концентрирование изолированных соединений проводили методами экстракции хлороформом (при pH=9) и твердофазной экстракции на катриджах Oasis. Установлено, что ацетонитрилом изолируется в 2–2,5 раза большее количество сертраліна и N-деметилсертраліна из органов. Изучено, что через 24 часа соотношение между содержанием сертраліна и деметилсертраліном практически одинаково во всех органах, которые были взяты для анализа. Содержание сертраліна составляло 83,85–86,53%, а N-деметилсертраліна 13,47–16,15%.

**Ключевые слова:** сертралін, N-деметилсертралін, выделение из биологических объектов, твердофазная экстракция, высокоэффективная жидкостная хроматография.

UDC 615.214.24:543.05:543.544.5.068.7

### THE TECHNIQUES EFFICIENCY ESTIMATION OF SERTRALINE AND ITS METABOLITE ISOLATION FROM BIOLOGICAL OBJECTS

I.J. Halkevych, B.S. Zimenkovsky, G.S. Trush

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

**Summary:** The conditions for sertraline and its metabolite (N-demethylsertraline) identification and quantitative determination by means of high performance liquid chromatography were determined. The mobile phase

ISSN 2070-3112

«Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація»

2011, №3–4

---

consisted of acetonitrile and trifluoroacetic acid solution (0,1%). The comparative efficiency estimation of sertraline and its metabolite isolation from rats' organs (liver, brain, plasma) by means of water acidified with oxalatic acid and acetonitrile acidified with acetic acid was performed. The purification and concentration of defined compounds were conducted by extraction with chloroform (pH =8-9) and by solid-phase extraction on Oasis cartridges. It was found that isolation with acetonitrile provided 2-2,5 times higher amounts of sertraline and demethylsertraline from organs. It was determined that in 24 hours the correlation of sertraline and demethylsertraline was virtually equal in all organs taken for the analysis. The sertraline content was 83,85-86,53%, and demethylsertraline content was 13,47-16,15%.

**Keywords:** sertraline, N-demethylsertraline, isolation from biological objects, solid-phase extraction, high performance liquid chromatography.

---

*Надійшла до редакції 21.11.2011 р.*