

УДК: 615.214.3.099.074

©С.І. ДАВИДОВИЧ С.І., І.Й. ГАЛЬКЕВИЧ, 2016

*С.І. Давидович С.І., І.Й. Галькевич*

## ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА ТА РОЗРОБКА МЕТОДІВ ВИДІЛЕННЯ СЕРТИНДОЛУ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Львівський національний медичний університет імені Д. Галицького,  
м. Львів

**Вступ.** Сертиндол як антипсихотичний лікарський засіб нового покоління знайшов широке застосування при лікуванні шизофренії. Передозування ним часто супроводжується кардіотоксичними ефектами та летальними наслідками.

**Мета.** Вивчення ефективності ступеня ізолювання сертиндолу з біологічних тканин водою, що підкислена оксалатною кислотою та ацетонітрилом у суміші з перхлоратною кислотою.

**Матеріали і методи.** Ізолювання сертиндолу з печінки проводили водою, що підкислена насиченим розчином оксалатної кислоти та сумішшю ацетонітрил - 70 % перхлоратна кислота (1:1). Для екстракції з витяжок сертиндол екстрагували хлороформом і 1,2-дихлоретаном (pH=11). Очищення проб проводили на картриджах Oasis HLB 30 mg (Waters, USA). Кількісний вміст сертиндолу в пробах визначали методом УФ-спектрофотометрії (при 258 nm).

**Результати.** Водою, що підкислена оксалатною кислотою ізолюється до 27% сертиндолу, а ацетонітрилом з 70% перхлоратною кислотою (1:1) - до 60 % сертиндолу. Межа кількісного визначення сертиндолу, ізолюваного з тканин печінки сумішшю ацетонітрилу з 70 % перхлоратною кислотою становить 2 мкг препарату в 1 г біологічного органу. Відносна похибка УФ-спектрофотометричного визначення сертиндолу в біологічних пробах складає  $\pm 3,18\%$ .

**Висновки.** Опрацьовано оптимальні умови ізолювання сертиндолу з тканин печінки та очистки отриманих екстрактів методом твердофазної екстракції. Розроблений метод ізолювання препарату рекомендований для використання в хіміко-токсикологічному аналізі об'єктів біологічного походження при отруєннях сертинделом.

**Ключові слова:** сертиндол, ацетонітрил, УФ-спектрофотометрія, печінка.

**Вступ.** Сертиндол, 1-(2-(4-(5-хлоро-1-(4-фторфеніл)-1H-індол-3-іл)-1-піперіденіл)етил)-2-імідазолідинон, належить до класу атипичних антипсихотичних препаратів групи похідних індолу. Препарат ефективно усуває як позитивні так і негативні симптоми шизофренії, що обумовлено селективною блокадою дофамінових (D2), серотонінових (5HT<sub>2</sub>), та  $\alpha 1$ -адренергічних рецепторів [5]. Однак прийом сертиндолу з препаратами, що подовжують інтервал QT, пов'язаний з різким збільшенням ризику виникнення фатальних аритмій та раптової кардіогенної смерті [3,8]. Описані смертельні випадки отруєнь даним препаратом [1,4]. Згідно з останніми літературними даними, для визначення вмісту сертиндолу в плазмі, крові, сечі в основному використовують електродні та хроматографічні методи аналізу [2,6,7]. При смертельних отруєннях об'єктами судово-хімічного аналізу також є внутрішні органи, методи аналізу яких є недостатньо опрацьовані.

**Мета роботи.** Вивчення ефективності ступеня ізолювання сертиндолу з біологічних тканин водою, підкисленою оксалатною кислотою та ацетонітрилом у суміші з перхлоратною кислотою.

**Матеріали і методи.** Для приготування модельних зразків біологічного матеріалу з препаратом використовували сертиндол, який виділяли з таблеток Сердолект, 4мг (Lundbeck Pharm Ind.) Для цього з 4-х таблеток знімали оболонку, таблетки розтирали і обробляли метанолом порціями по 10 мл (п'ять разів). Метанольний розчин фільтрували через мембранний фільтр, розчинник випаровували досуха. Сухий залишок висушували при 50°C та використовували для виготовлення розчину сертиндолу в 96% етанолі з вмістом препарату 320мкг/мл. Вміст сертиндолу у цьому розчині контролювали УФ-спектрофотометрично. Для розрахунку питомого показника поглинання сертиндолу використовували стандартний зразок сертиндолу гідро хлориду (Sigma, USA). Із відповідної наважки готували розчин препарату в 96% етанолі із вмістом сертиндолу 1 мг/мл. Шляхом розведення цього розчину 96% етанолом готували серію розчинів із вмістом препарату 1,0; 2,0; 5,0; 10,0, 15,0, 20,0, 30,0 мкг/мл. Оптичну густину отриманих етанольних розчинів виміряли на спектрофотометрі Ulab-101 при довжині хвилі 258 нм (l=1 см), розчин порівняння – 96% етанол. Ізолювали сертиндол із модельних зразків біологічного матеріалу. Для виготовлення проб використовували печінку трупів людей, які загинули від травм. Печінку, яка попередньо була перевірена на відсутність лікарських препаратів, отримували у ЛОБСМЕ. Біологічний орган зберігали при -40°C. Готували по дві серії біологічного матеріалу (n=5). Для цього печінку гомогенізували до розміру частинки 0,5-1 мм. Для виготовлення модельних проб відбирали по 10 г гомогенізату. В кожну пробу вносили по 120 мкг сертиндолу, проби перемішували та витримували при 36°C 12 год. Одночасно готували контрольні проби. З першої серії модельних зразків сертиндол ізолювали водою, підкисленою оксалатною кислотою (метод О.О. Васильєвої). Для цього біологічний матеріал заливали водою та доводили насиченим розчином оксалатної кислоти до рН 2-3 (за універсальним індикатором). Проби настоювали 1 год при струшуванні. Рідину зливали, а біологічний матеріал ще двічі настоювали з даною ізолюючою рідиною при струшуванні (1 год та 30 хв відповідно). Об'єднані витяжки центрифугували та доводили 25% розчином аміаку до рН=11.0. Тричі екстрагували сертиндол хлороформом (співвідношення між об'ємами витяжки і органічним розчинником 2:1). Хлороформні екстракти об'єднували, випаровували досуха, а сухі залишки розчиняли в 2мл 96% етанолу. З огляду на те, що сертиндол є ліпофільною речовиною, було вивчено ізолюючу здатність підкисленого ацетонітрилу для екстракції сертиндолу з біологічного матеріалу. Модельні проби заливали сумішшю ацетонітрилу з 70% перхлоратною кислотою (1:1) до повного покриття біологічного матеріалу і настоювали 1 годину при струшуванні. Витяжки зливали, а досліджувані проби ще двічі настоювали з цією ізолюючою рідиною (по 1 годині та 30 хв відповідно). Отримані витяжки об'єднували та центрифугували (15 хв при 10000 об/хв). Центрифугати доводили 30% розчином натрію гідроксиду до рН 11 (за універсальним індикатором). Для екстракції сертиндолу використовували 1,2-дихлоретан. Екстракцію проводили двічі (порціями розчинника по 15 мл). Дихлоретанові екстракти випаровували досуха в потоці азоту, а сухі залишки розчиняли в 2мл 96% етанолу. Спиртові розчини сухих залишків центрифугували (15 хв при 10000 об/хв). Для визначення кількісного вмісту сертиндолу в пробах проводили

очистку методом твердофазної екстракції. З цієї метою використовували картриджі Oasis HLB 30 mg (Waters, USA). Етанольні розчини сухих залишків упарювали до 0,4 мл, вносили по 1,6 мл води та отримані розчини пропускали через сорбент. Попередньо картриджі кондиціювали 1 мл 96% етанолу та 1 мл води. На стадії промивки використовували 1 мл універсального буферного розчину (pH=7,3) та 2 мл води. Як елюент застосовували 4 мл 96% етанолу. Швидкість пропускання всіх рідин через сорбент 1 мл/хв. Об'єм елюатів доводили 96% етанолом до 5 мл. В одержаних етанольних розчинах визначали вміст сертиндолу методом УФ-спектрофотометрії (при 258 нм).

**Результати дослідження.** Встановлено, що УФ-спектр сертиндолу в 96 % етанолі характеризується трьома смугами поглинання з максимумами при 224, 258 та 302 нм. При довжині хвилі 258 нм світло поглинання етанольних розчинів сертиндолу підпорядковується закону Бугер-Ламберта-Бера в межах концентрацій 1-30 мкг/мл. При довжині хвилі 258 нм питомий показник поглинання ( $A^{1\%}_{1\text{см}}$ ) становить 446,32 (коефіцієнт кореляції 0,9996). Відносна похибка кількісного визначення сертиндолу в етанольних розчинах методом УФ-спектрофотометрії сягає 0,78%. Попередніми дослідженнями встановлено, що область максимуму екстракції сертиндолу знаходиться при pH 10-11. При цих значеннях pH хлороформом екстрагується до 70%, а 1,2-дихлоретаном до 92% сертиндолу з водних розчинів при однократній екстракції. При застосуванні методу твердофазної екстракції із спиртоводних розчинів вилучається до 97% препарату. Водною, підкисленою оксалатною кислотою, із тканин печінки ізолюється до 27%, а ацетонітрилом у суміші з перхлоратною кислотою (1:1) - до 60 % сертиндолу. Результати ізолювання сертиндолу з модельних зразків печінки двома методами наведені в табл. 1.

Таблиця 1

**Порівняльна оцінка ізолювання сертиндолу з тканин печінки**

Метод виділення	Внесено сертиндолу до 10г гомогенізату (мкг)	Виділено сертиндолу		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
О.О. Васильєвої	120	29,64	24,7	$\bar{X} = 25,96$ $SD = 0,96$ $S_{\bar{X}} = 0,43$ $\Delta \bar{x} = 1,19$ $\bar{X} \pm \Delta \bar{x} = 25,96 \pm 1,19$ $\varepsilon = \pm 4,59\%$
		30,36	25,3	
		31,44	26,2	
		31,8	26,5	
		32,52	27,1	
Ацетонітрил – 70% перхлоратнак ислота (1:1)	120	67,8	56,5	$\bar{X} = 57,98$ $SD = 1,48$ $S_{\bar{X}} = 0,66$ $\Delta \bar{x} = 1,84$ $\bar{X} \pm \Delta \bar{x} = 57,98 \pm 1,84$ $\varepsilon = \pm 3,18\%$
		68,4	57,0	
		69,00	57,5	
		70,44	58,7	
		72,24	60,2	

Для підкислення ацетонітрилу було апробовано різні концентрації перхлоратної кислоти, найвищих результатів досягнуто при використанні її 70% розчину. В таблиці 2 наведено результати ізолювання сертиндолу ацетонітрилом у суміші з перхлоратною кислотою із модельних зразків біологічного матеріалу, в який внесено різні кількості досліджуваного препарату.

Таблиця 2

**Визначення сертиндолу, виділеного з модельних проб печінки**

Внесено сертиндолу до 10г гомогенізату печінки, мкг	Визначено сертиндолу методом УФ-спектрофотометрії		Метрологічні характеристики (n = 5; p = 0,95)
	мкг	%	
20,0	11,3	56,5	$\bar{X}=58,15$ $SD=1,49$ $S_{\bar{x}}=0,66$ $\Delta \bar{x}=1,85$ $\bar{X} \pm \Delta \bar{x}=58,15 \pm 1,85$ $\varepsilon = \pm 3,18\%$
40,0	22,76	56,9	
60,0	34,56	57,6	
80,0	46,64	58,3	
100,0	59,1	59,1	
120,0	72,6	60,5	

З даних, наведених у табл. 2, випливає, що відносна невизначеність середнього результату при кількісному визначенні сертиндолу в екстрактах з печінки методом УФ-спектрофотометрії не перевищує  $\pm 3,18\%$ . Межа кількісного визначення сертиндолу, ізолюваного з тканин печінки ацетонітрилом у суміші з 70% перхлоратною кислотою, методом УФ-спектрофотометрії становить 2 мкг препарату в 1 г біологічної тканини.

**Висновки.** Вивчено залежність ступеня екстракції сертиндолу з водних розчинів від рН розчину та природи екстрагента. Встановлено, що 1,2-дихлоретаном при рН 10.0-11.0 екстрагується  $90 \pm 2,5\%$ . Встановлено, що ізолювання сертиндолу з біологічних об'єктів сумішшю ацетонітрил-70% перхлоратна кислота є більш придатним для судово-токсикологічного дослідження, ніж застосування загальноприйнятих в хіміко-токсикологічному аналізі методів, оскільки при цьому ізолюється до 60% препарату. Для очистки отриманих екстрактів від співекстрактивних речовин запропоновано використовувати метод твердофазної екстракції. Показана можливість використання УФ-спектроскопії для визначення сертиндолу, виділеного з біологічного матеріалу. Отримані результати можуть бути використані для судово-токсикологічних досліджень біологічного матеріалу при отруєннях сертинделом.

**Література**

1. Drugs afety and efficacy evaluation of sertindol eforschizophrenia. / Karamatskos E, Lambert M, Mulert C, Naber D. // Expertopinion on drug safety. – 2012. – Vol. 11, №6. – P.1047–1062.
2. Karaaslan C. Electrochemical behaviorof biologically important in dole-derivatives / C.Karaaslan, S.Suzen// International Journal of Electrochemistry. – 2011. – 2011. – P.1-10

3. Neckelmann D. Sertindole and fluoxetine over dose with benign outcome / D. Neckelmann, E. Mæhlum, I. M. Waage // Nordic journal of psychiatry. – 2010. - №64(4). - P.288-288.

4. Pae C. U. Sertindole: dilemmas for its use in clinical practice / C.U. Pae // Expert opinion on drug safety. - 2013. – Vol. 12, №3. – P.321-326.

5. Sertindol einschizophrenia: efficacy and safety issues/ M. R.Muscatello, A.Bruno, P.M. Bellinghieri [ etal. ] // Expert opinion on pharmacotherapy. – 2014. –Vol. 15, №13. – P.1943-1953.

6. The analysis of antipsychotic drugs in human matrices using LC-MS ( / MS) / E. Saar, J. Beyer, D. Gerostamoulos, O. H. Drummer // Drug testing and analysis. – 2012. - №4(6). - P.376-394.

7. The use of dried blood spots for quantification of 15 antipsychotics and 7 metabolites with ultra-high performance liquid chromatography and mass spectrometry / L.Pattee, K.E.Maudens, C. P. Stove [ etal. ] // Drug testing and analysis. – 2015. - Vol.7, №6. – P.502-511.

8. Waldman W. Acute poisoning with sertindole - a case report/ W.Waldman, K.Kaletha, J.SeinAnand // Przegląd Lekarski. – 2013. – Vol. 70, №8. – P.669-670.

*С.И. Давыдович, И.Е. Галькевич*

## Сравнительная оценка и разработка методов выделения сертиндола из биологического материала

Львовский национальный медицинский университет  
имени Даниила Галицкого, г. Львов

**Введение.** Сертиндол как антипсихотическое лекарственное средство нового поколения нашел широкое применение при лечении шизофрении. Передозировка сертинделом часто сопровождается кардиотоксическими эффектами и летальными исходами.

**Цель.** Изучение эффективности степени изоляции сертиндола из биологических тканей водой, подкисленной оксалатной кислотой и ацетонитрилом в смеси с хлорной кислотой.

**Материалы и методы.** Изолирование сертиндола из печени проводили водой, подкисленной насыщенным раствором оксалатной кислоты и смесью ацетонитрил - 70% хлорная кислота (1:1). Для экстракции из вытяжек сертиндол экстрагировали хлороформом и 1,2-дихлорэтаном (pH = 11). Очистку проб проводили на картриджах Oasis HLB 30 mg (Waters, USA). Количественное содержание сертиндола в пробах определяли методом УФ-спектрофотометрии (при 258 нм).

**Результаты.** Водой, подкисленной оксалатной кислотой изолируется до 27% сертиндола, а ацетонитрилом с 70% хлорной кислотой (1: 1) - до 60% сертиндола. Предел количественного определения сертиндола, изолированного из тканей печени смесью ацетонитрила с 70% хлорной кислотой составляет 2 мкг препарата в 1 г биологического органа. Относительная погрешность УФ-спектрофотометрического определения сертиндола в биологических пробах составляет ± 3,18%.

**Выводы.** Предложены оптимальные условия изолирования сертиндола из тканей печени и очистки полученных экстрактов методом твердофазной экстракции. Разработанный метод изолирования препарата рекомендован для использования в химико-токсикологическом анализе объектов биологического происхождения при отравлениях сертинделом.

**Ключевые слова:** сертиндол, печень, ацетонитрил, УФ-спектрофотометрия.

*S.I.Davydovych, I.J.Halkevych*

## Comparative assessment and elaboration of methods of sertindole isolation from biological material

Danylo Halytsky Lviv National Medical University

**Objectives.** Serindole is new generation antipsychotic remedy for schizophrenia treatment. Cardiotoxic effects and death frequently follow on sertindole overdosage.

**Aim.** Investigation of efficacy of sertindole isolation from biological tissues with water acidified by oxalic acid and mixture of acetonitrile with perchlorate acid.

**Materials and methods.** Sertindole was isolated from liver with water acidified by oxalic acid and with mixture of acetonitrile – 70 % perchlorate acid (1 : 1). Sertindole was extracted by chloroform and 1,2-dichloro ethane (pH 11). Samples were purified on Oasis HLB 30 mg (Waters, USA) cartridges. Sertindole in samples was quantified by UV-spectrometrically at 258 nm.

**Results.** Water acidified by oxalic acid isolates 27 % of sertindole and acetonitrile with 70 % perchlorate acid – 60 %. Limit of sertindole quantification in samples of liver is 2 µg/g of biological material. Relative error of UV-spectrometric determination of sertindole in biological samples is ±3.18%.

**Conclusions.** Optimal conditions of sertindole isolation from liver and extracts purification with solid-phase extraction is chosen. The technique of sertindole isolation from objects of biological origin is recommended for chemical-toxicological practice.

**Key words:** sertindole, acetonitrile, UV-spectrometry, liver.

### *Відомості про авторів:*

**Давидович Софія Ігорівна** – аспірант кафедри токсикологічної та аналітичної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Адреса: Львів, вул. Пекарська, 69.

**Галькевич Ірина Йосипівна** – к. фарм. н., зав. кафедри, доцент кафедри токсикологічної та аналітичної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Адреса: Львів, вул. Пекарська, 69.

УДК: 615.32:001.891.53

© К.О.ДЕГТЯРЬОВА, В.І.ГОРЛАЧОВА, 2016

*К.О.Дегтярьова, В.І.Горлачова*

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ З ВИБОРУ ОПТИМАЛЬНОГО ЕКСТРАГЕНТУ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН В ЛРС

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

**Вступ.** На сьогодні, вміст біологічно активних речовин (БАР) вичавок м'якоти гарбуза залишається майже не дослідженим. Однак, за даними літературних джерел [1], в фармацевтичній та медичній практиці застосовується насіння гарбуза, яке виявляє такі фармакологічні властивості: протизапальні (каротиноїди, ненасичені жирні кислоти), антиоксидантні (токофероли), простатопротекторні (фітостерини), гепатопротекторні (фосфоліпіди) та ін. Отже, результати огляду літератури підтверджують доцільність розробки екстракту та подальшого дослідження вичавок м'якоти гарбуза.

**Мета.** Тому, головним завданням нашої роботи стало експериментальне дослідження з вибору оптимального екстрагенту для визначення вмісту БАР з вичавок м'якоти гарбуза.