

Рекомендована д. фармац. наук, проф. С. О. Васюк

УДК 615.218:54.062:542.8

МЕТОДИКА ІЗОЛЮВАННЯ ПАРОКСЕТИНУ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ПІДКИСЛЕНИМ АЦЕТОНІТРИЛОМ

© **І. Й. Галькевич, Б. С. Зіменковський**

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Резюме: розроблено методику ізолювання пароксетину із печінки ацетонітрилом, підкисленим оксалатною кислотою. Для очистки застосовують екстракцію хлороформом і ТФЕ на колонці Superclean LC-18. Ізолюється 37,84 – 44,67 % пароксетину. Максимальна внутрішньосерійна похибка методу не перевищує 5,84 %. Для ідентифікації та кількісного визначення пароксетину запропоновано умови ВЕРХ на колонці ACE 5 C 18 при 293 нм. Мінімальна кількість пароксетину, що детектується, 0,06 мкг/см³, найменша кількість, що визначається, 0,1 мкг/см³.

Ключові слова: пароксетин, печінка, ізолювання ацетонітрилом, метод ВЕРХ, твердофазна екстракція (ТФА).

Вступ. В останні роки значно зріс асортимент лікарських препаратів, що використовують у психіатричній практиці для лікування депресивних станів, в тому числі і серед селективних інгібіторів зворотного захоплення серотоніну. Одним із таких препаратів є пароксетин з високою селективністю і максимальною силою щодо гальмування зворотнього проникнення серотоніну в синаптичну щілину всередину нейрона. Призначають його як індивідуально, так і в комбінації з іншими лікарськими засобами для лікування депресій, панічних станів та послаблення конвульсій [1].

Аналіз джерел літератури показав, що пароксетин є одним із препаратів, який призначають дорослим та дітям, схильними до депресій, а передозування приводить до летальних наслідків [2]. При проведенні судово-хімічної експертизи для ізолювання пароксетину із внутрішніх органів використовують настоювання біологічного матеріалу з хлороформом, з підкисленим етанолом чи водою, але при цьому із печінки ізолюють незначну кількість пароксетину (10-22 %) [3, 4]. Для визначення пароксетину в досліджуваних пробах найчастіше використовують методи газової хроматографії (ГХ) та високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Детектування проводять за УФ-спектрами, флуоресценцією, мас-спектрометрією [5, 6, 7, 8]. Ці методики використовують для визначення вмісту пароксетину в сироватці, плазмі, фармацевтичних препаратах, і вони характеризуються різною чутливістю та селективністю і значною мірою залежать від підготовки проби.

Тому мета роботи полягала у виборі оптимальних умов ізолювання пароксетину із біологічного матеріалу (печінки) та опрацюванні умов очист-

ки екстрактів методом твердофазної екстракції (ТФЕ). Для визначення вмісту пароксетину у виділених пробах опрацьовано умови аналізу методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Методи дослідження. Ізолювання пароксетину проводили із модельних зразків біологічного матеріалу (печінка), які відбирали порціями по 25 г. В роботі використовували печінку людей, що загинули від травм. В проби гомогенізованого біологічного матеріалу вносили різні кількості пароксетину (100 – 500 мкг). Біологічний матеріал досліджували через 24 години. Протягом цього часу його зберігали при 5 – 7 °С. Ізолювання пароксетину проводили ацетонітрилом, для чого підготовлені зразки заливали до повного покриття гомогенізованої печінки цим розчином, перемішували і підкислювали насиченим розчином оксалатної кислоти до рН 2-3 (за універсальним індикатором). Перше настоювання тривало 1 год, два наступні – по 30 хв. Під час кожного із настоювань проби біологічного матеріалу з ізолюючою рідиною обробляли УЗ по 15 хв (частота 42 кГц, потужність 50 Вт, t = 25 °С). Витяжки об'єднували, центрифугували (5000 об/хв, 15 хв) і виміряли об'єм центрифугату.

Для досліджень застосовували 1/4 об'єму ацетонітрильної витяжки, яку розводили дистильованою водою (1:2) і доводили 25 % розчином гідроксиду амонію до рН 9-10 (за універсальним індикатором). Тричі екстрагували пароксетин хлороформом. Об'єми водно-ацетонітрильної фази та хлороформу співвідносились як 4:1. Тривалість однократної екстракції 5 хв. Об'єднані хлороформові екстракти випаровували при кімнатній температурі в потоці повітря. Сухі залишки розчиняли в 2 см³ метанолу. Метанольні

розчини очищали на катриджах "Superclean LC-18 SPE Tubes 1 ml" Supelco (США).

Очистка проби методом твердофазної екстракції. До 1 см³ метанольного розчину, отриманого при розчиненні сухих залишків, вносили по 0,2 см³ 20 % розчину амонію сульфату, по 2 краплі 0,1 М розчину кислоти хлоридної та воду до об'єму 3 см³. Проби центрифугували 15 хв при 10000 об/хв. Всю рідку фазу пропускали через колонку Superclean LC-18, яку попередньо кондиціонували 1 см³ метанолу та 1 см³ дистильованої води. Після внесення проби колонку промивали 2,5 см³ універсальної буферної суміші з рН 6,85 і 1 см³ дистильованої води. Елюювали пароксетин 2 см³ метанолу. Метанольний елюат випаровували досуха в потоці азоту і розчиняли у 200 мкл метанолу кваліфікації для хроматографії (Merck). Отримані розчини аналізували методом ВЕРХ.

Умови ідентифікації та кількісного визначення пароксетину методом ВЕРХ. Дослідження проводились на хроматографі Waters 2690 (Separation Module). Колонка ACE 5 C18 (250 мм x 4, 6 мм), температура колонки в робочому стані 25 °С. Рухома фаза: суміш ацетонітрилу (розчин А) та 0,1 % водний розчин трифлуорацетатної кислоти (TFA) (розчин В). Застосовували градієнтний режим подачі рухомої фази. Співвідношення між об'ємами розчинів А та В протягом першої хвилини 90:10, з другої по двадцять хвилину 40:60, з 21 по 25 хвилини 10:90 і з двадцять шостої по тридцять хвилину 95:5. Швидкість рухомої фази 1 см³/хв, об'єм введеної проби 10 мкл. Хроматограму за-

писували при 293 нм (діодно-матричний детектор). Для побудови градувального графіка готували метанольні розчини пароксетину в діапазоні концентрацій 0,05 – 40 мкг/см³. Розчини готували із стандартного зразка пароксетину гідрогенхлориду (Sigma, США).

Результати й обговорення. Встановлено, що при трикратній екстракції хлороформом із водно-ацетонітрильної витяжки ізолюється 97,1 – 99,2 % пароксетину. При очистці на колонці Superclean LC-18 досягається 98,2-99,3 % вихід пароксетину. У метанольний розчин сухих залишків необхідно вносити амонію сульфат та проводити центрифугування для усунення жирів. Додавання 0,1 М розчину хлоридної кислоти підвищує розчинність пароксетину у водно-метанольній фазі.

Ідентифікацію ізолюваного пароксетину проводили за УФ-спектром (рис.1) та часом утримування (17,81 ± 0,12) хв (рис. 2, б). Кількість пароксетину у пробах розраховували за рівнянням градувального графіку, який в межах кон-

Рис. 1. УФ-спектр пароксетину, ізолюваного із печінки.

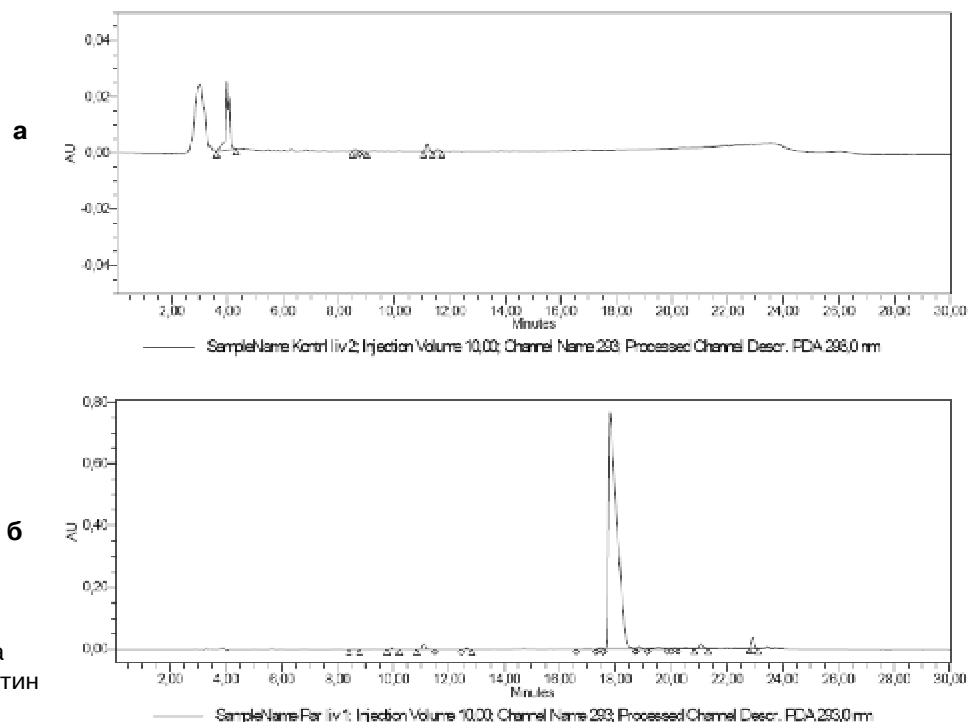
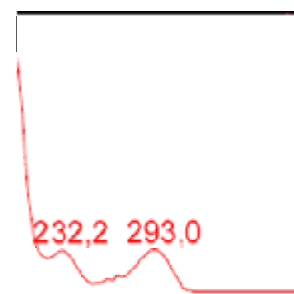


Рис. 2. Хроматограми контрольної проби (а) та проби, що містить пароксетин (б).

центрацій 0,1 – 40 мкг/см³ описується залежністю: $Y = 7,2 \cdot 10^3 X + 3,09 \cdot 10^2$ (при $r = 0,9998$), де Y – площа піку пароксетину, X – концентрація пароксетину, мкг/см³.

Хроматограма контрольних проб не містить піків, які б виписувалися на місці виписування піку пароксетину та його метаболітів (рис. 2, а).

Мінімальна кількість пароксетину, яку можна

ідентифікувати методом ВЕРХ, 0,06 мкг/см³ (співвідношення між сигналом та шумом не перевищує 3), найменша кількість, яку можна визначити, – 0,1 мкг/см³.

У таблиці 1 наведено абсолютні значення залежності ступеня ізолювання пароксетину із печінки від кількості введеного препарату у досліджувану пробу.

Таблиця 1. Результати ізолювання пароксетину із тканини печінки (n=5 для кожної серії концентрацій)

Внесено пароксетину до 25 г печінки, мкг	Ізольовано пароксетину		Відносне стандартне відхилення (R.S.D., %)
	мкг ± S. D.	%	
100	37,84 ± 2,21	37,84	5,84
200	79,21 ± 1,02	39,60	1,30
300	121,38 ± 2,40	40,46	1,97
400	168,48 ± 8,39	42,12	4,98
500	223,34 ± 6,25	44,67	2,80

Застосовуючи для ізолювання пароксетину ацетонітрил, підкислений оксалатною кислотою, ізолюється в середньому 37,84 – 44,67 % пароксетину, внесеного до гомогенізованої печінки із розрахунку 4–20 мкг/г.

Максимальна внутрішньосерійна похибка цієї методики не перевищує 5,84 %.

Методом найменших квадратів розраховане рівняння лінійності між кількістю внесеного в біологічний матеріал пароксетину та кількістю ізолюваного пароксетину, яке описується залежністю $Y = 0,4603X - 12,031$, де Y – визначено пароксетину в пробі біологічного матеріалу (мкг); X – внесено пароксетину (мкг) до тканини печінки масою 25 г. Коефіцієнт кореляції (r)

при цьому складає 0,9982. Методика може бути рекомендована для використання в практиці судово-хімічного аналізу.

Висновки. 1. Розроблено методику ізолювання пароксетину із трупної печінки ацетонітрилом, підкисленим оксалатною кислотою та очисткою методом рідинної екстракції та ТФЕ. Абсолютний вихід такої методики 38,84 – 44,67 %. Максимальні внутрішньосерійні похибки цієї методики не перевищують 5,84 %.

2. Опрацьовано умови ідентифікації та кількісного визначення пароксетину методом ВЕРХ на колонці ACE 5 C18. Межа виявлення пароксетину у розчинах 0,06 мкг/см³, межа кількісного визначення 0,1 мкг/см³.

Література

1. Компендиум 2010 – лекарственные препараты / под ред. В. Н. Коваленко, А. П. Викторова. – К. : Морин, 2010. – 1280 с.
2. 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 [et al] // J. Forensic Sci. – 2000. – V. 45. – N 3. – P. 633–648.
3. Аполлонская Я. Е. Химико-токсикологический анализ пароксетина в крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Я. Е. Аполлонская // Токсикологический вестник. – 2010. – С. 44–46.
4. Баюрка С. В. Розробка методу ізолювання пароксетину з біологічного матеріалу за допомогою хлороформу / С. В. Баюрка, Л. І. Рибалка // Український біофармацевтичний журнал. – 2012. – № 5-6. – С. 118–121.
5. Determination of paroxetine in pharmaceutical preparations using HPLC with electrochemical detection /

- N. Agrawal, J. Esteve-Romero, N. P. Dubey [et al] // The Open Analytical Chemistry Journal. – 2013, N 7. – P. 1–5.
6. Amundsen I. 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 / I. Amundsen, A. M. Oiestad, D. Ekeberg [et al] // J. Chromatogr. B – 2013, N 927. – P. 112–123.
7. Massaroti P. Validation of a selective method for determination of paroxetine in human plasma by LC-MS/MS / P. Massaroti, N. M. Cassiano, L. F. Duarte [et al] // J. Pharm. Pharmaceut. Sci. – 2005. – Vol. 8, N 2. – P. 340–347.
8. Development of a solid phase extraction for 13 new generation antidepressants and their active metabolites for gas chromatographic-mass spectrometric analysis / S. M. R. Wille, K. E. Maudens, C. H. Van Peteghem [et al] // J. Chromatogr. A. – 2005. – Vol. 1098. – P. 1–2.

МЕТОДИКА ИЗОЛИРОВАНИЯ ПАРОКСЕТИНА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ПОДКИСЛЕННЫМ АЦЕТОНИТРИЛОМ

И. И. Галькевич, Б. С. Зименковский

Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого

Резюме: разработано методику изолирования пароксетина из печени ацетонитрилом, подкисленным оксалатной кислотой. Для очистки используют экстракцию хлороформом и ТФЭ на колонке Superclean LC-18. Изолируется 37,84 – 44,67 % пароксетина. Максимальная внутрисерийная ошибка метода не превышает 5,84 %. Для идентификации и количественного определения пароксетина предложены условия ВЭЖХ на колонке ACE 5 C 18 при 293 нм. Предел обнаружения пароксетина этим методом 0,06 мкг/см³, предел определения 0,1 мкг/см³.

Ключевые слова: пароксетин, печень, изолирование ацетонитрилом, метод ВЭЖХ, твердофазная экстракция (ТФА).

METHOD OF PAROXETINE ISOLATION FROM BIOLOGICAL MATERIALS WITH ACIDIFIED ACETONITRILE

I. Y. Halkevych, B. S. Zimenkovsky

Danylo Halytsky Lviv National Medical University

Summary: the technique of Paroxetine isolation from liver with acetonitrile acidified by oxalatic acid is worked out. Extraction by chloroform and SPE on Superclean LC-18 cartridges were applied for purification. 37,84 – 44,67 % of paroxetine was isolated. The highest inter serial error is not above 5,84 %. For paroxetine identification and quantification is proposed HPLC on ACE 5 C18 column at 293 nm. Limit of paroxetine detection is 0,06 g/ml, limit of quatification is 0,1 g/ml.

Key words: paroxetine, liver, isolation with acetonitrile, HPLC, SPE.