

Doxepin-hidroklorid fotostabilitásának vizsgálata

Székely Pál, Gyéresi Árpád

Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Gyógyszerészeti Kémiai Tanszék

Photostability study of doxepine hydrochloride

In this paper, we studied the photostability of the doxepine hydrochloride, a dibenzo-oxepine derivative from the tricyclic antidepressant class. The aqueous solution of doxepine hydrochloride, was exposed to UV light (Vilber Louromat VL-4-LC lamp), and with this procedure, at well established time intervals, we have determined the content of doxepine by high-pressure liquid chromatography (HPLC). For the separation of doxepine and its degradation products we have used a reversed-phase chromatographic column (Zorbax Extend C₁₈ 250 × 4,5 mm 5 μm) and as mobile phase under isocratic conditions a mixture containing potassium dihydrogenophosphate 20 mM (pH=4,5) and acetone (65:35 v/v), with a flowing-rate of 1ml/min, at a temperature of 25°C. Under these analytical conditions the retention time of doxepine was 5,8 minutes, and for the degradation products varied between 2 and 4,5 minutes. For the calibration graphs we used solutions with concentrations between 5 and 250 μg/ml. The correlation coefficient was above 0,995 in all the determinations (using quadratic regression 1/y). From these results we were able to determine the decomposition grade of the doxepine hydrochloride.

Keywords: doxepine hydrochloride, photostability, degradation products, high pressure liquid chromatography.

Studiul de fotostabilitate a clorhidratului de doxepină

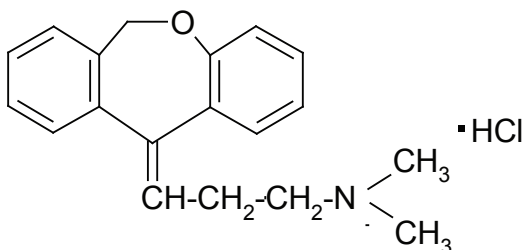
Am studiat fotostabilitatea clorhidratului de doxepină, derivat de dibenzo-oxepină, din grupa antidepressivelor triciclice. Soluția apoasă a clorhidratului de doxepină am expus-o acțiunii luminii UV (lampă Vilber Louromat VL-4-LC), după care, în intervale bine definite am determinat conținutul de doxepină prin metoda cromatografiei de lichide sub presiune (CLP). Pentru separarea doxepinei și a produșilor de degradare am utilizat o coloană cu fază inversă (Zorbax Extend C₁₈, 250 × 4,5 mm, 5 μm), și ca fază mobilă în condiții izocratice, un amestec de soluție de dihidrogenofosfat de potasiu 20 mM (pH=4,5) și acetonă (65:35 v/v), cu o viteză de 1 ml/minut, la o temperatură de 25°C. În aceste condiții timpul de retenție al doxepinei a fost de 5,8 minute, iar al produșilor de descompunere a variat între 2 și 4,5 minute. Pentru trasarea curbei de calibrare, am folosit soluții cu concentrații între 5 și 250 μg/ml. Coeficientul de corelație în toate cazurile a fost mai mare de 0,995 (folosind regresia cvadratică 1/y). Din rezultatele obținute am determinat gradul de descompunere al clorhidratului de doxepină.

Cuvinte cheie: clorhidrat de doxepină, fotostabilitate, produși de degradare, cromatografie de lichide. Bevezetés

Orvostudományi Értesítő, 2008, 81 (4): 263-266

www.orvtudert.ro

A doxepin az első generációs, triciklus antidepresszánsok csoportjába tartozó vegyület. Kémiai szerkezetét tekintve egy dibenzo-oxepin származék, [(E)-3-dibenzo[b,e]oxepin-11(6H)-ilidén]-N,N-dimetilpropán-1-amin (1. ábra) [2, 6, 8, 9-11].



1. ábra. A doxepin hidroklorid kémiai szerkezete

A X. Román Gyógyszerkönyvben [10], a 6. Európai Gyógyszerkönyvben [9] a doxepin hidrokloridja hivatalos. Nagy lipofilitása következtében jó eloszlási képességgel rendelkezik, behatol a központi idegrendszerbe, valamint a különböző szövetekbe. Fényérzékeny vegyület, amelyre a gyógyszerkönyvek is felhívják a figyelmet. Irodalmi adatok utalnak a triciklikus antidepresszánsok fényérzékenységére és ennek következtében fellépő fotobomlásra, valamint a keletkező bomlástermékek fototoxikus tulajdonságaira [1, 5, 7]. Jelen dolgozatban a doxepin-hidroklorid UV fénybesugárzás hatására bekövetkező bomlását vizsgáltuk, folyadék-kromatográfiai módszerrel. A vizsgálatok során módszert dolgoztunk ki a doxepin és a bomlástermékek szétválasztására, mely alkalmas a bomlás mértékének mennyiségi követésére is [3,4].

Ugyanakkor a mérési adatok alapján meghatároztuk a lejátszódó fotobomlási reakciók kinetikáját.

Anyag és módszer

Doxepin-hidroklorid (99,2%) (Dipharma, Italy), kálium-dihidrogén-foszfát Merck (Merck KgaA, Darmstadt, Germany), acetonitril Merck (HPLC minőség). A felhasznált desztillált, deionizált vizet Direct Q-5 Millipore készülékkel állítottuk elő.

Először egy 250 μg/ml doxepin-hidroklorid alapoldatot készítettünk, majd ezt hígítva állítottuk elő a 8 oldatot (5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 250 μg/ml). A módszer pontosságát és precizitását 15, 125, 200 μg/ml koncentrációjú oldatok felhasználásával ellenőriztük. A minták elemzése során, két sorozat (QC - Analitikai kontroll minták) QCA 15 μg/ml, QCB 125 μg/ml, QCC 200 μg/ml koncentrációjú oldatot használtunk.

Merck Hitachi LaChrom típusú nagynyomású folyadék-kromatográfiai rendszert használtunk, a következő tartozékokkal: D7000 interface, L-7100 pumpa, L-7612 gáztalanító, L-7200 hűtő, L-7200 mintavevő, L-7360 oszloptároló és egy L-7455 diódasoros detektor. A kromatogramok feldolgozása a HMS manager program felhasználásával történt.

A kromatográfiai elválasztás, Zorbax Extend C₁₈ (4,6 × 250 mm, 5 μm-es gömbök) – oktadecilszililezett oszlopon történt (Agilent Technologies), 25°C-os oszlophőmérsékleten, 1 ml/perc áramlási sebességgel, 115 bar nyomáson, 5 μl injektált próbátérfogattal, 8 perces kromatografálási idővel, 206 nm-en történő detektálással.

A mozgófázis 65 térfogatszázalékban 20 mM-os KH₂PO₄



oldatból és 35 térfogatszázalék acetonitrilből állt, minden az oldatot eluálás előtt 10 percig (Elma Transsonic 700/H) ultrahangos fürdővel gázmentesítettük.

A besugárzást egy 100 µg/ml koncentrációjú doxepin-hidroklorid oldat esetén, Vilber Louromat VL-4-LC UV lámpa (4W-365 nm, 4W-254 nm fénycső) felhasználásával egy kvarc küvetában 1 cm távolságból, 4 órán át végeztük.

A vizsgált oldatból időközönként (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 105, 120, 180, 240 percenként) 5 µl térfogatú mintát vettünk ki és ezt kromatografáltuk. A minták koncentrációját, a csúcs alatti területből határoztuk meg a kalibrációs görbe segítségével, a külső standard módszerét használva. A kalibrációt öt különböző alkalommal, végeztük el. Az alkalmazott kalibrációs modellt a legkisebb négyzetek módszerével határoztuk meg.

Eredmények és megbeszélés

Módszer validálása

A módszer szelektivitását öt különböző vakpróba elemzésével határoztuk meg, más vizsgálandó anyaggal való átfedés megállapítása végett. A szelektivitási próbákat a kalibrációs görbe segítségével vizsgáltuk. A vakpróbák nem mutattak jelentős átfedést a vizsgált csúcs retenciós idejénél.

Egy sorozaton belül nyolc különböző koncentrációjú kalibrációs standardot készítettünk és vizsgáltunk. A kalibrációs görbék paramétereit, az öt analitikai sorozatnál, az **1. táblázatban** foglaltuk össze.

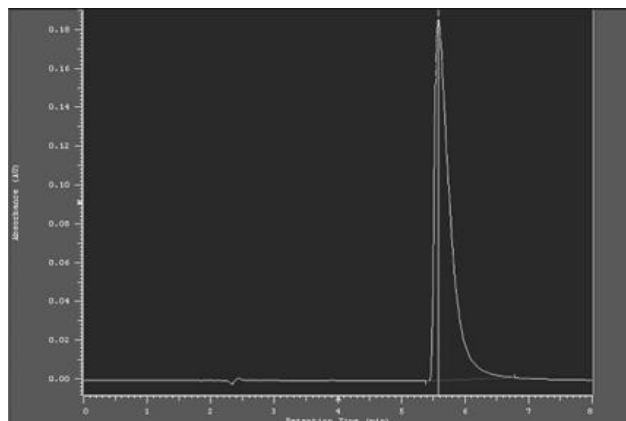
1. táblázat. A kalibrációs görbék paramétereit

Sorozat Sorszám	A	B	C	R ²
1	20,96	120,98	206,84	0,996
2	20,45	116,65	193,13	0,996
3	21,40	123,80	204,92	0,999
4	21,53	122,88	202,38	0,998
5	18,89	124,14	207,32	0,999
Pontosság	103,23	97,35	101,45	
SD	1,06	3,07	5,80	

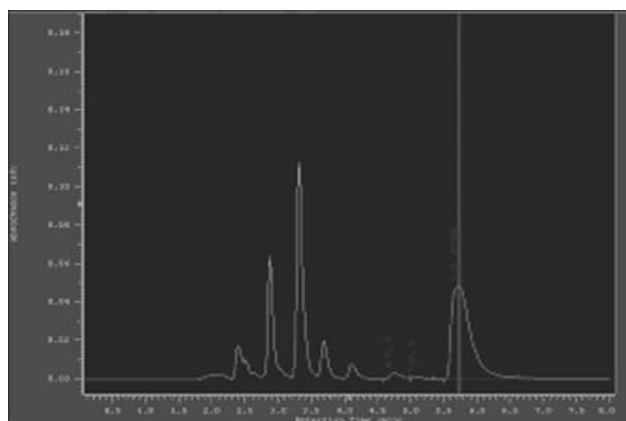
R² = korrelációs koeficiens; SD = relatív standard deviáció

A reziduálisokat (a visszaszámolt koncentráció százalékos különbsége a feltüntetett értékhez viszonyítva) minden kalibrációs standardnál kiszámoltuk. Ezek értékei a meghatározási határ esetében (LLOQ - Low limit of quantification) +/- 10% és a többi kalibrációs standard esetében +/- 5% között változtak.

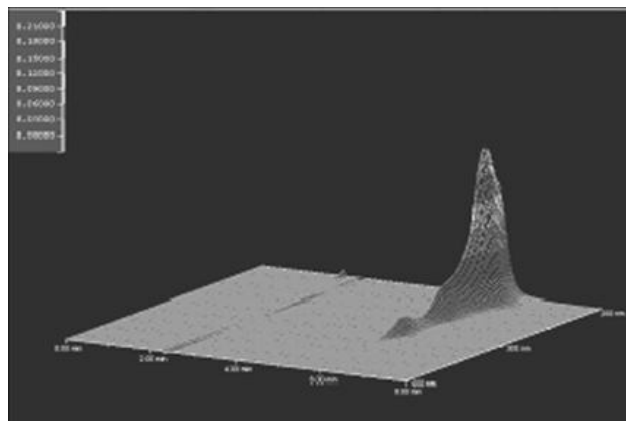
A pontosság és a precizitás meghatározásához három különböző koncentrációjú analitikai kontroll mintát használtunk fel (20 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml doxepin-hidroklorid). Minden egyes koncentrációnál kiszámoltuk az átlagos koncentrációt, a pontosságot és a relatív standard deviációt.



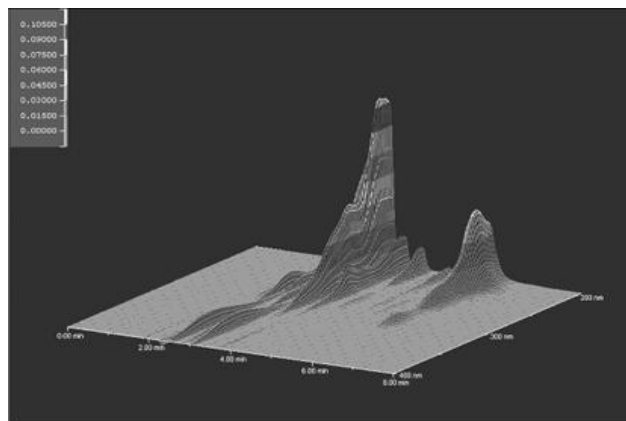
2. ábra. A doxepin kromatogramja besugárzás előtt (0 perc)



3. ábra. A doxepin kromatogramja 4 óra besugárzás után (240 perc)



4. ábra. 3 dimenziós kromatogram besugárzás előtt (0 perc)



5. ábra. 3 dimenziós kromatogram 240 perc besugárzás után

2. táblázat. A doxepin-hidroklorid koncentrációjának változása az idő függvényében

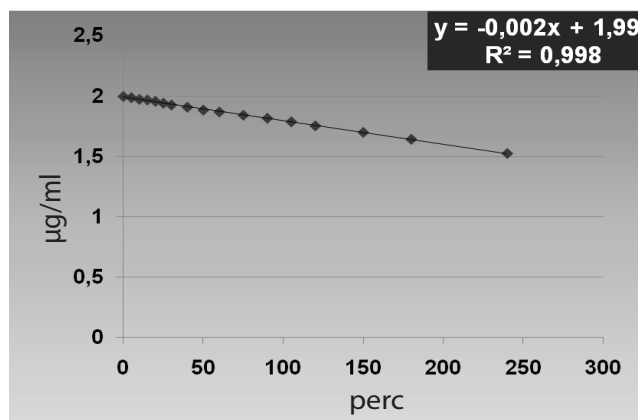
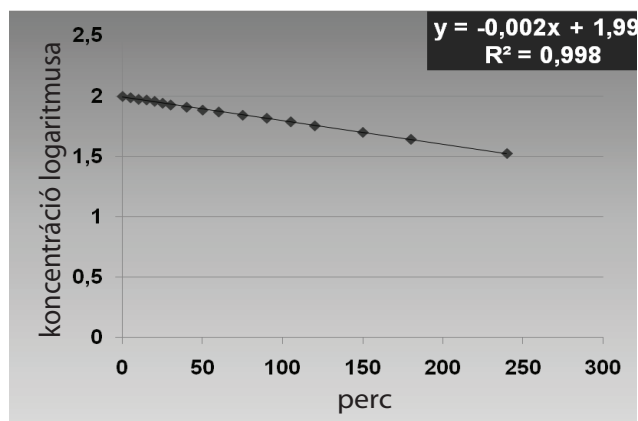
Besugárzási idő (perc)	Csúcs alatti terület	Doxepin kezdeti koncentráció $\mu\text{g/ml}$	Doxepin koncentráció besugárzás után (%)	Koncentráció logaritmus
0	1570085	99,37	100,00	1,99
5	1529770	96,94	97,43	1,98
10	1480429	93,95	94,29	1,97
15	1461844	92,83	93,11	1,96
20	1422634	90,46	90,61	1,95
25	1369123	87,23	87,20	1,94
30	1321121	84,32	84,14	1,92
40	1263478	80,84	80,47	1,90
50	1192022	76,52	75,92	1,88
60	1146978	73,80	73,05	1,86
75	1073181	69,33	68,35	1,84
90	1008719	65,44	64,25	1,81
105	937510	61,13	59,71	1,78
120	862904	56,62	54,96	1,75
150	752201	49,93	47,91	1,69
180	650072	43,75	41,40	1,64
240	477666	33,33	30,42	1,52

Mind az azonos sorozaton belül, mind a különböző sorozatok között az átlagkoncentráció, valamint a variációs koefficiens is a megengedett értéken belül ($\pm 5\%$) található.

A kapott kromatogramokat a **2., 3., 4., 5. ábrák** mutatják be.

A kapott kromatogramok csúcs alatti területéből a kalibrációs görbe segítségével meghatároztuk a vizsgált oldatok koncentrációját, a doxepin koncentrációjának csökkenését és a koncentráció logaritmusát (**2. táblázat**). A 2. táblázat adatai alapján grafikusán ábráztuk a doxepin koncentráció változását az idő függvényében (**6. ábra**).

A koncentráció logaritmusát ábrázolva az idő függvényében, egy egyenest kaptunk, ami egy elsőrendű bomlászkinetikára utal (**7. ábra**).

**6. ábra.** A doxepin koncentráció változása a besugárzás folyamán**7. ábra.** A doxepin koncentráció logaritmusának ábrázolása a besugárzási idő függvényében

Megbeszélés

Nem történt jelentős átfedés a doxepin retenciós ideje (5,8 perc) és a bomlástermékek retenciós ideje között (2, 3, 3,5, 3,8, 4, 4,5 perc). A két próba közötti átfedést egy vakpróba beinjektálásával vizsgáltuk, közvetlenül a leghosszabb ideig besugárzott próba után.

A doxepin-hidroklorid koncentrációjának meghatározásához felhasznált kalibrációs görbe 5-250 $\mu\text{g/ml}$ koncentráció határon belül precíznek bizonyult, a korrelációs koefficiens 0,996-nál nagyobbak adódott. A reziduálisok a legkisebb meghatározási határ (LLOQ) esetében $\pm 10\%$ és a többi kalibrációs standard esetében $\pm 5\%$ között változtak. A módszer a bioanalitikai módszerek nemzetközi validálási követelményeinek megfelelő pontosságot és precizitást mutatott.

A validált módszert a doxepin-hidroklorid fotostabilitásának a vizsgálata során ellenőriztük. Segítségével sikerült a doxepin és bomlástermékeinek szétválasztása viszonylag rövid idő alatt, jó érzékenységgel.

Következtetések

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a validált módszer jó precizitással és pontossággal alkalmazható a doxepin-hidroklorid oldatban történő fotobomlásának mennyiségi követésére. Ugyanakkor a bomlástermékek megfelelő elválasztását is biztosítja, ami lehetőséget nyújt ezen termékek jövőbeni azonosítására. A doxepin-hidroklorid koncentrációja a besugárzás teljes ideje alatt (4 óra, 365 nm-en) 28,7%-ra csökkent. A koncentráció logaritmusának az idő függvényében való ábrázolása és ennek értékelése elsőrendű bomlászkinetikát mutat.

Irodalom

- Badenhorst D., Sutherland F.C.W., de Jager A.D. et al. – *Determination of doxepin and desmethyldoxepin in human plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry,*

- Journal of Chromatography B, 2000, 742: 91-98.
2. Bernáth G. – *Gyógyszerkémia III*, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Egyetem, Szeged, 1998, 47-80.
 3. Bojița M., Săndulescu R., Roman L. et al. – *Analiza și controlul medicamentelor, volumul 1. Bazele teoretice și practice*, Editura Intelcredo, Deva, 2002, 439-488.
 4. Bojița M., Săndulescu R., Roman L. et al. – *Analiza și controlul medicamentelor, volumul 2. Metode instrumentale în analiza și controlul medicamentelor*, Editura Intelcredo, Deva, 2003, 65-66.
 5. Canudas N., Conteras C. – *Isolation and identification of the photodegradation products of the photosensitizing antidepressant drug clomipramine. Phototoxicity studies on erythrocytes*, *Pharmazie*, 2002, 75:405-408.
 6. Cristea N. A. (szerk.) – *Tratat de farmacologie*. Ediția I., Ed. Medicală, București, 2005, 84-106.
 7. Queiroz R.H., Lanchote V.L., Bonato P.S. et al. – *Simultaneous HPLC analysis of tricyclic antidepressants and metabolites in plasma samples*, *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 1995, 70:181-186.
 8. Takácsné Novák K., Szász Gy. – *Az antidepresszív szerek gyógyszerészeti kémiája*, *Acta Pharm. Hung.*, 2005, 75(2):93-108.
 9. *** *European Pharmacopoeia 6th edition*, Council of Europe, Strasbourg, 2007, vol.2 1757-1759.
 10. *** *Farmacopeea Română, ediția a X-a*, Editura Medicală, București, 1993, 383-384.
 11. *** *Pharmacopoea Hungarica ed. VIII*, II. k., Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2004, 1757-1758.