

ФАРМАКОКІНЕТИКА

ДІАГНОСТИКА СМЕРТЕЛЬНИХ ОТРУЄНЬ СУЛЬПІРИДОМ
ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ ТОКСИКОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ*С.В.Баюрка, В.В.Болотов, С.А.Карпушина, В.І.Степаненко, Г.І.Северіна*

Національний фармацевтичний університет

Ключові слова: нейролептики; антидепресанти; сульпірид; біологічний матеріал; тонкошарова хроматографія; кольорові реакції; УФ-спектрофотометрія

Встановлено ефективність відносно сульпіриду методу ізолювання лікарських речовин елююванням їх хлороформом з біологічної тканини, гомогенізованої розтиранням з натрію сульфатом безводним, який дозволив виділити 14,1±1,9 % зазначеного препарату. Виявляли сульпірид у біологічних екстрактах за допомогою кольорових реакцій, тонкошарової хроматографії та УФ-спектроскопії. Кількісний вміст препарату встановлювали УФ-спектрофотометричним методом. Світлопоглинання розчинів підлягало закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 20 до 200 мкг сульпіриду, відносна помилка кількісного визначення не перевищувала 1,9%. Показана необхідність попередньої додаткової очистки отриманих витяжок від супутніх домішок, для чого використовували методи екстракції та ТШХ.

Отруєння препаратами психотропної дії посідають одне з перших місць серед отруєнь лікарськими речовинами [6, 12, 15, 21]. Більшість з них є комбінованими та згадуються у зв'язку з сумісним прийомом антидепресантів, транквілізаторів, нейролептиків та алкоголю [9, 10, 11, 14, 17]. Клінічна та патоморфологічна картини зазначених отруєнь здебільшого є нехарактерними [6, 11, 18, 19]. Тому результати токсикологічних досліджень мають вирішальне значення для підтвердження клінічного діагнозу отруєння.

Сульпірид (N-[(етил-2-піролідиніл)метил]-2-метокси-5-сульфамойлбензамід) є одним з сучасних психотропних лікарських засобів. Препарат поєднує помірну антипсихотичну та антидепресивну активність, а також проявляє стимулюючі властивості [4, 5]. Сульпірид неодноразово був причиною гострих та смертельних отруєнь [11, 19, 20]. Таким чином, розробка

методів аналізу сульпіриду в біологічних об'єктах є актуальною задачею.

Для виявлення сульпіриду в біологічних рідинах запропоновано скринінгові системи з використанням методу тонкошарової хроматографії [11]. Опрацьовано методики аналізу сульпіриду в плазмі та сечі за допомогою газо-рідинної хроматографії [11], високоефективної рідинної хроматографії [7, 8, 11, 13, 20, 22], капілярного електрофорезу [16]. Вищеперелічені методики характеризуються високою чутливістю та специфічністю, але потребують ретельної пробопідготовки (твердофазної екстракції [22], рідиннофазної мікроекстракції [16]) та спеціального коштовного обладнання, що робить їх малодоступними.

Дані з методів дослідження біологічного матеріалу на сульпірид у літературі відсутні.

Метою нашого дослідження стало встановлення розрізняльної спроможності по від-

ношенню до сульпіриду методу ізолювання лікарських речовин з використанням хлороформу як екстрагенту. Цей метод впроваджено в практику хіміко-токсикологічного аналізу лікарських речовин різних фармакологічних груп [1, 2].

Виявлення та кількісне визначення сульпіриду в отриманих біологічних екстрактах проводили за допомогою методів [3, 11] (хімічного, тонкошарової хроматографії (ТШХ), УФ-спектрофотометрії), широко впроваджених у практику хіміко-токсикологічного аналізу.

Матеріали та методи

До модельних проб печінки (5 г) додавали водні розчини сульпіриду, що містили 500 мкг препарату. Об'єкти залишали на добу при кімнатній температурі, а потім виділяли сульпірид за наступною методикою.

Наважку печінки переносили в ступку, додавали потрібну кількість натрію сульфату безводного і розтирали до утворення однорідної сипкої маси. Отриманий об'єкт переносили

до скляної колонки діаметром 20 мм, в нижню частину якої заздалегідь перед заповненням вміщували невеликий ватний тампон. Через відкритий кран колонку заповнювали хлороформом за допомогою гумової груші до утворення «дзеркала» над поверхнею об'єкта завтовшки до 2 см. Кран закривали і над колонкою встановлювали ділильну лійку з хлороформом (100 мл). Через колонку пропускали хлороформ із швидкістю 60-80 крапель за хвилину. Елюати збирали у порцелянові чашки і випарювали на водяній бані при температурі не вище, ніж 40°C до видалення органічного розчинника.

Елюати, отримані таким чином, містили певну кількість супутніх домішок, які видаляли за допомогою додаткової екстракційної очистки.

За даними, отриманими нами при вивченні екстракції сульпіриду з водних розчинів органічними розчинниками, було встановлено, що з кислого середовища (рН 1-2) вказана речовина у найменшій мірі екстрагувалась діетиловим етером (ступінь одноразової екстракції складала близько 8-10%). З лужного середовища сульпірид у найбільшій кількості екстрагувався етилацетатом при рН 10-11, ступінь екстракції при цьому складав 60-92%. Таким чином, для видалення співекстрактивних речовин з біологічного матеріалу найбільш придатними умовами є використання діетилового етеру як екстрагенту домішок при рН 1-2. Екстрагували сульпірид з очищених водних витяжок етилацетатом при рН 10-11.

Для видалення домішок екстракційним методом хлороформні екстракти переносили до фарфорової чашки, випаровували їх на водяній бані при температурі не вище, ніж 40°C до видалення органічного розчинника. Потім до сухого залишку у фарфоровій чашці додавали 20 мл

0,1 М розчину кислоти хлоридної, вміст чашки ретельно перемішували, переносили до ділильної лійки і кислий розчин двічі збовтували з діетиловим етером по 10 мл кожного разу. Фазу органічного розчинника відкидали і у подальшому не досліджували. Після цього кислий водний залишок підлогували 20% розчином натрію гідроксиду до рН 10-11 і тричі екстрагували сульпіриду етилацетатом по 10 мл кожного разу. Органічні витяжки фільтрували через паперовий фільтр з 0,5 г безводного натрію сульфату у мірну колбу об'ємом 50 мл і доводили до позначки етилацетатом. Паралельно проводили «холості» досліді з біологічним матеріалом для отримання розчинів порівняння.

Після цього проводили ідентифікацію та кількісне визначення сульпіриду в отриманих екстрактах.

Виявлення сульпіриду в екстрактах за методом ТШХ проводили з використанням скляних хроматографічних пластинок для високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) виробництва Естонії (сорбент КСКТ, фракція – 5÷20 мкм, товщина шару – 130±25 мкм, розмір пластинок – 20x20 см), Sorbfil (силікагель СТХ-1 ВЕ, тип підложки – ПЕТФ, зв'язуюча речовина – силіказоль, фракція – 8÷12 мкм, товщина шару – 100 мкм, розмір пластинок – 10x10 см). Від 5 до 30 мл хлороформної витяжки випаровували до мінімального об'єму (0,05 мл) і наносили в одну точку на лінію старту хроматографічної пластинки. На відстані 2 см від вказаної точки наносили розчин «свідка» сульпіриду (5 мкг у пробі). У третю точку наносили 5 мл випареної витяжки, одержаної у «холостому» досліді. Хроматограми розвивали послідовно з використанням двох рухомих фаз: хлороформу і метанол-амонію гідроксиду 25% розчин (100:1,5), а також хлороформу і бензин-

метанол-діетиламіну (90:10:10). Після цього пластинки висушували на повітрі і проявляли за допомогою реактиву Драгендорфа у модифікації за Мунье (жовтогарячий колір плям сульпіриду на жовтому фоні; чутливість виявлення складала 1,0-2,0 мкг препарату у пробі). Плями сульпіриду, виділеного з печінки, та сульпіриду-стандарту за величинами Rf співпадали та складали у системі рухомих розчинників метанол – амонію гідроксиду 25% розчин (100:1,5) 0,53±0,02 (для пластинок ВЕТШХ), 0,55±0,02 (для пластинок Sorbfil); у системі рухомих розчинників бензин-метанол-діетиламін (90:10:10) – 0,60±0,02 (для пластинок ВЕТШХ), 0,52±0,02 (для пластинок Sorbfil). Витяжки з «холостих» дослідів не давали плям з вказаними значеннями Rf.

Підтвердження присутності сульпіриду в екстрактах проводили також УФ-спектроскопічним методом. Для цього елюювали сульпірид з непроявленої смуги хроматограми на рівні, що відповідав місцю знаходження плями «свідка» сульпіриду, метанолом, елюат фільтрували через паперовий фільтр та випаровували. Попередньо нами було встановлено, що ступінь елюювання сульпіриду з шару сорбенту метанолом складав 99,2%. Отриманий залишок розчиняли в 4 мл 0,1 М розчині кислоти хлоридної. Оптичну густину визначали на спектрофотометрі СФ-46 при $\lambda_{\max}=293$ нм, використовуючи кювету з товщиною шару рідини 10 мм. УФ-спектр одержаного розчину був аналогічним спектру розчину сульпіриду-стандарту в 0,1 М розчині кислоти хлоридної та мав смугу поглинання при $\lambda_{\max}=293\pm 2$ нм.

При виявленні сульпіриду у витяжках використовували кольорові реакції з реактивами Маркі (зеленувате забарвлення, чутливість – 20 мкг у пробі) та Фреде (зеленувато-бла-

Таблиця

Результати УФ-спектрофотометричного визначення сульпіриду, виділеного з печінки, за допомогою хлороформу (середнє з п'яти визначень)

Додано сульпіриду до 5 г печінки, мкг	Виділено сульпіриду		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
500	64,0	12,8	$\bar{X} = 14,1$ $S = 1,5$ $S_{\bar{x}} = 0,7$ $\Delta\bar{X} = 1,9$ $\varepsilon = 13,2$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 14,1 \pm 1,9$
500	73,0	14,6	
500	65,5	13,1	
500	82,5	16,5	
500	68,0	13,6	

китне забарвлення, що переходило у зелене, чутливість – 15,0 мкг у пробі). Паралельно проводили контрольні дослідження зі стандартним розчином сульпіриду в хлороформі (30 мкг/мл) та витяжкою з «холостого» досліджу.

Кількісний вміст сульпіриду в очищених методом ТШХ витяжках визначали УФ-спектрофотометричним методом з використанням попередньо встановленого нами рівняння залежності оптичної густини від концентрації: $A = 0,00629C - 0,027$ ($r = 0,9998$; $S^2 = 7 \cdot 10^{-5}$). Світлопоглинання розчинів підлягало закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 20 до 200 мкг/мл, відносна невизначеність середнього результату становила $\pm 1,9\%$. Як розчин порівняння застосовували розчин, отриманий у «холостому» досліді.

Результати та їх обговорення

При ізолюванні сульпіриду з біологічного матеріалу хлороформом було встановлено, що

отримані біологічні екстракти містили значну кількість домішок, які заважали подальшому виявленню та кількісному визначенню сульпіриду. Так, результати вимірювань показників оптичної густини, отримані УФ-спектрофотометричним методом для екстрактів з «холостого» досліджу, становили 0,687-0,693.

Для видалення супутніх домішок проводили додаткову екстракційну очистку витяжок за методикою, наведеною вище. Після такої очистки відповідні значення оптичної густини становили 0,047-0,052. Для проведення УФ-спектрофотометричного визначення навіть незначна кількість співекстрактивних речовин заважала дослідженню. У зв'язку з цим ми проводили додаткову хроматографічну очистку отриманих витяжок. Для цього хроматографічну пластинку з нанесеними екстрактами з біологічного матеріалу двічі вміщували в хроматографічну камеру з хлороформом (фронт розчинника – 8 см). Попередніми дослідженнями

з витяжками з «холостих» проб біологічного матеріалу, а також зі стандартним розчином сульпіриду, нанесеними на хроматографічну пластинку, було встановлено, що співекстрактивні речовини при цьому мігрували до фінішу, а плями сульпіриду залишалися на лінії старту. Хроматограми з очищеними таким чином пробами сульпіриду з біологічного матеріалу далі розвивали у рухомих фазах, що наведено вище. Після елюювання сульпіриду з хроматографічних пластинок препарат ідентифікували за УФ-спектрами.

Результати кількісного визначення сульпіриду УФ-спектрофотометричним методом, виділеного з печінки за допомогою хлороформу, наведені в таблиці. Як видно, за допомогою запропонованої методики з печінки можна виділити $14,1 \pm 1,9\%$ препарату.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено розрізняльну спроможність відносно сульпіриду методу ізолювання з біологічного матеріалу хлороформом, яка становила $14,1 \pm 1,9\%$ препарату.

2. Показана можливість використання методу тонкошарової хроматографії, кольорових реакцій, УФ-спектроскопії для виявлення сульпіриду, виділеного з біологічного матеріалу, після попередньої додаткової очистки витяжок від супутніх домішок за допомогою методів екстракції та ТШХ. Отримані результати можуть бути використані для судово-токсикологічних досліджень біологічного матеріалу при смертельних отруєннях сульпіридом.

ЛІТЕРАТУРА

1. Баюрка С.В. // Вісник фармації. – 2011. – №4 (68). – С. 53-56.
2. Баюрка С.В., Карпушина С.А., Бондар В.С. // УБФЖ. – 2010. – №2 (7). – С. 66-70.
3. Вергейчик Т.Х. Токсикологическая химия. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 400 с.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства: 15-е изд. – М.: ООО «Изд-во Новая Волна», 2006. – С. 69.
5. Порошина Е.Г. // ФАРМиндекс-Практик. – 2004. – Вып. 6. – С. 12-23.

6. Элленхорн М.Дж. *Медицинская токсикология: Диагностика и лечение отравлений у человека: В 2-х т. / Пер. с англ.* – М.: Медицина, 2003. – Т. 1. – С. 647-697.
7. Bressolle F., Brès J. // *J. Chromatogr.* – 1985. – Vol. 341 (2). – P. 391-399.
8. Bressolle F., Fauré-Jeantis A. // *J. Pharm. Sci.* – 1992. – Vol. 81 (1). – P. 26-32.
9. Carson H.J. // *J. Leg. Med.* – 2007. – Vol. XXX. – P. 1-4.
10. Cheeta S., Schifano F., Oyefeso A. et al. // *Brit. J. Psychiatry.* – 2004. – №184. – P. 41-47.
11. *Clark's analysis of Drugs and Poisons: 3-rd ed. [Електронний ресурс] / Laurent Y. Galichet.* – 80 Min / 700 MB. – Pharmaceutical Press, 2005. – 1 електрон. опт. диск (CD-ROM); 12 см. – Систем. вимоги: Pentium; 128 Mb RAM; CD-ROM Windows XP / Vista. – Назва з титул. екрану.
12. *Global Burden of Disease: A comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020 / C.J.L.Murray, A.D.Lopez.* – Harvard: Harvard University Press, 1996. – P. 5.
13. Huang M.C., Ho H.O., Yeh G.C. et al. // *J. Chromatogr. B.* – 2001. – Vol. 763. – P. 157-163.
14. Isbister G.K., Bowe S.J., Dawson A. et al. // *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* – 2004. – №42. – P. 277-285.
15. Jönsson A., Holmgren P., Ahlner J. // *Forens. Sci. Int.* – 2004. – Vol. 143. – P. 53-59.
16. Liu J., Cao W., Qiu H. et al. // *Clin. Chem.* – 2002. – Vol. 48 (7). – P. 1049-1058.
17. Okulicz-Kozaryn K., Borucka A., Koson K. // *Alk. i narkomania.* – 2006. – Vol. 19, №1. – С. 35-52.
18. *Poisoning & Drug Overdose. 4-th ed. / Ed. K.R.Olson.* – Zange Medical Books, Mc Graw-Hill, 2004. – P. 1053-1054.
19. *Randall C.B. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man.* – California, Foster City: Chemical Toxicological Institute, 2000. – 718 p.
20. Rop P.P., Sournac M.H., Elie I. et al. // *J. Anal. Toxicol.* – 1999. – Vol. 23. – P. 294-296.
21. Sampson S.M. // *Mayo Clin. Proc.* – 2001. – №76. – P. 739.
22. Shinozuka T., Terada M., Tanaka E. // *Forens. Sci. Int.* – 2006. – Vol. 162. – P. 108-112.

Адреса для листування: 61168, м. Харків,
вул. Блюхера, 4. Тел. (572) 67-91-92.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 14.12.2011 р.