

# АНАЛІТИЧНА ДІАГНОСТИКА ОТРУЄНЬ СУЛЬПІРИДОМ

*С.В.Баюрка, С.А.Карпушина*

Національний фармацевтичний університет

*Ключові слова: антидепресанти; сульпірид; біологічний матеріал; тонкошарова хроматографія; УФ-спектроскопія; екстракційна спектрофотометрія*

*Вивчено розрізняльну спроможність відносно сульпіриду загальноприйнятих у судово-токсикологічному аналізі методів ізолювання лікарських речовин методами О.О.Васильєвої, Стаса-Отто, В.П.Крамаренка, які дозволили виділити, відповідно,  $8,6 \pm 1,4\%$ ,  $18,3 \pm 1,8\%$ ,  $4,9 \pm 0,7\%$  досліджуваного антидепресанта. Показана можливість використання методу тонкошарової хроматографії, кольорових реакцій, УФ-спектроскопії для виявлення сульпіриду, виділеного з біологічного матеріалу. Кількісний вміст препарату в екстрактах встановлювали екстракційно-спектрофотометричним методом у видимій області за реакцією утворення іонного асоціату з кислотним азобарвником метиловим оранжевим. Відносна помилка кількісного визначення не перевищувала  $1,9\%$ . Отримані результати можуть бути використані при хіміко-токсикологічних дослідженнях біологічного матеріалу на вміст сульпіриду.*

Аналітична діагностика отруєнь лікарськими речовинами поряд з клінічною та патоморфологічною діагностикою має важливе значення для встановлення причини отруєння, особливо у тих випадках, коли картина інтоксикації є нехарактерною [1, 4, 21]. Так, останнім часом спостерігається тенденція до збільшення отруєнь препаратами психотропної дії [10, 17, 20, 23, 25], більшість з яких є комбінованими та згадується у зв'язку з сумісним прийомом антидепресантів, транквілізаторів, нейролептиків та алкоголю [6, 7, 8, 11, 13, 15, 19]. Це значно ускладнює клінічну та патоморфологічну діагностику зазначених отруєнь. Тому результати токсикологічних досліджень мають вирішальне значення для підтвердження діагнозу отруєння.

Сульпірид (N-[(етил-2-піролідиніл)метил]-2-метокси-5-сульфамойлбензамід) – сучасний психотропний лікарський засіб, який широко застосовується в медичній практиці. Препарат поєднує помірну антипсихотичну та антидепресивну активність, а також проявляє стимулюючі властивості [2, 3]. Сульпірид не-

одноразово був причиною гострих та смертельних отруєнь [8, 21, 22]. Таким чином, розробка методів аналізу сульпіриду в біологічних об'єктах, насамперед з використанням загальних методів ізолювання, які застосовуються при ненаправленому (загальному) дослідженні біологічного матеріалу на лікарські речовини, є актуальною задачею.

Для виявлення сульпіриду в біологічних рідинах запропоновані скринінгові системи з використанням методу тонкошарової хроматографії [8]. Опрацьовані методики аналізу сульпіриду в плазмі та сечі за допомогою газорідинної хроматографії [8], високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [8, 14, 22, 24], сполучення ВЕРХ з тандемною мас-спектроскопією [12], капілярного електрофорезу [16, 18], адсорбційної інверсійної вольтамперометрії [9], флуоресцентної спектроскопії [5]. Дані методів дослідження біологічного матеріалу на сульпірид у літературі відсутні.

Метою нашого дослідження було встановлення розрізняльної спроможності по відношенню до сульпіриду загальних ме-

тодів ізолювання лікарських речовин, які передбачають використання підкисленої води (методи Васильєвої О.О., Крамаренка В.П.) або підкисленого етанолу (метод Стаса-Отто) як екстрагентів [1].

**Виділення сульпіриду з печінки водою, підкисленою кислотою оксалатною або сульфатною, та етанолом, підкисленим кислотою оксалатною.** Подрібнену печінку людини (20 г), яка загинула від травми, вміщували у стакан, додавали 2 мл водного розчину сульпіриду, який містив 2000 мкг препарату. Суміш ретельно перемішували і залишали на 24 год. Паралельно ставили «холості» дослідні з біологічним матеріалом. Ізолювання сульпіриду проводили водою та етанолом, підкисленими кислотою оксалатною, а також водою, підкисленою кислотою сульфатною, згідно з загальноприйнятими методиками [1].

Отримані хлороформні екстракти з біологічного матеріалу містили значну кількість супутніх домішок, які у подальшому 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 кількості екстрагувалась діетиловим етером (ступінь одноразової екстракції складав близько 8-10%). З лужного середовища сульпіриду 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. Фази органічного розчинника відкидали і у подальшому не досліджували. Після цього кислий водний залишок підлюговували 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 методом ТШХ про-

дили з використанням скляних хроматографічних пластинок для високоєфективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) виробництва Естонії (сорбент КСКГ, 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 метанолу – амонію гідроксиду 25% розчин (100:1,5), а також хлороформу і бензену – метанолу – діетиламіну (90:10:10). Після цього пластинки висушували на повітрі і проявляли за допомогою реактиву Драгендорфа у модифікації 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  $R_f$  співпадали та складала у системі рухомих розчинників метанол – амонію гідроксиду 25% розчин (100:1,5)  $0,53 \pm 0,02$  (для пластинок ВЕТШХ),  $0,55 \pm 0,02$  (для пластинок Sorbfil); у системі рухомих розчинників бензен – метанол – діетиламін (90:10:10) –  $0,60 \pm 0,02$  (для пластинок ВЕТШХ),  $0,52 \pm 0,02$  (для пластинок Sorbfil). Витяжки з «холостих» дослідів не давали плям з вказаними значеннями  $R_f$ .

Підтвердження присутності сульпіриду в екстрактах проводили також УФ-спектроскопічним методом. Для цього елюювали сульпірид з не проявле-

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

Кількісний вміст сульпіриду в очищених методом ТШХ витяжках визначали УФ-спектроскопічним 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 розробці методів аналізу сульпіриду в біологічному ма-

Таблиця

**Результати екстракційно-спектрофотометричного визначення сульпіриду, виділеного з печінки методами Васильєвої О.О., Стаса-Отто та Крамаренка В.П. (середнє з п'яти визначень)**

Метод ізолювання	Додано сульпіриду до 20 г печінки, мкг	Виділено сульпіриду		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
Настоювання з водою, підкисленою кислотою оксалатною (метод Васильєвої О.О.)	2000	150,0	7,5	$\bar{X} = 8,6$ $S = 1,1$ $S_{\bar{X}} = 0,5$ $\Delta\bar{X} = 1,4$ $\epsilon = 16,2$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 8,6 \pm 1,4$
		184,0	9,2	
		162,0	8,1	
		156,0	7,8	
		204,0	10,2	
Настоювання з етанолом, підкисленим кислотою оксалатною (метод Стаса-Отто)	2000	366,0	18,3	$\bar{X} = 18,3$ $S = 1,4$ $S_{\bar{X}} = 0,7$ $\Delta\bar{X} = 1,8$ $\epsilon = 9,8$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 18,3 \pm 1,8$
		334,0	16,7	
		400,0	20,0	
		340,0	17,0	
		388,0	19,4	
Настоювання з водою, підкисленою кислотою сульфатною (метод Крамаренка В.П.)	2000	94,0	4,7	$\bar{X} = 4,9$ $S = 0,6$ $S_{\bar{X}} = 0,3$ $\Delta\bar{X} = 0,7$ $\epsilon = 14,7$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 4,9 \pm 0,7$
		84,0	4,2	
		106,0	5,3	
		90,0	4,5	
		112,0	5,6	

теріалі було встановлено, що після ізолювання зазначеного препарату методами Васильєвої О.О., Стаса-Отто, Крамаренка В.П. отримані біологічні екстракти містили значну кількість домішок, які заважали подальшому виявленню та кількісному визначенню досліджуваної лікарської речовини. Так, результати вимірювань показників оптичної густини, отримані екстракційно-спектрофотометричним методом з метиловим оранжевим для екстрактів з «холостих» дослідів за наведеними вище методами ізолювання, становили, відповідно, 0,068-0,13; 0,095-0,18; 0,098-0,144.

Для видалення супутніх домішок проводили додаткове екстракційне очищення витяжок за методикою, наведеною вище. Отримані таким чином очи-

щені екстракти використовували для виявлення в них сульпіриду методом ТШХ та кольоровими реакціями. Ідентифікацію препарату за УФ-спектрами проводили тільки після додаткового очищення екстрактів методом ТШХ, аналізуючи елюати з хроматограм.

Екстракційно-спектрофотометричне визначення сульпіриду в одержаних після екстракційного очищення екстрактах проводили на фоні «холостих» дослідів, оптична густина яких після додаткового екстракційного очищення не перевищувала 0,055-0,075 в області спектра, що відповідала максимуму світлопоглинання забарвлених розчинів іонних асоціатів сульпіриду з метиловим оранжевим.

Результати екстракційно-спектрофотометричного визна-

чення сульпіриду, виділеного з печінки за вищезазначеними методами, наведені в таблиці.

Як видно, за допомогою методів Васильєвої О.О., Стаса-Отто та Крамаренка В.П. з печінки можна виділити  $8,6 \pm 1,4\%$ ,  $18,3 \pm 1,8\%$ ,  $4,9 \pm 0,7\%$  сульпіриду відповідно.

#### ВИСНОВКИ

Вивчено розрізняльну спроможність відносно сульпіриду загальноприйнятих у судово-токсикологічному аналізі методів ізолювання за Васильєвою О.О., Стасом-Отто, Крамаренком В.П., які дозволили виділити, відповідно,  $8,6 \pm 1,4\%$ ,  $18,3 \pm 1,8\%$ ,  $4,9 \pm 0,7\%$  сульпіриду.

Одержані результати можуть бути використані для хіміко-токсикологічного дослідження біологічного матеріалу на вміст сульпіриду.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Вергейчик Т.Х. Токсикологическая химия. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 400 с.
2. Машковский М.Д. Лекарственные средства: 15-е изд. – М.: ООО «Изд-во Новая Волна», 2006. – С. 69.
3. Порошина Е. Г. // ФАРМиндекс-Практик. – 2004. – Вып. 6. – С. 12-23.
4. Эллехорн М.Дж. Медицинская токсикология: Диагностика и лечение отравлений у человека. В 2-х т. / Пер. с англ. – М.: Медицина, 2003. – Т. 1. – 1048 с.; Т. 2. – 1044 с.

5. Abdelal A., El-Enany N., Belal F. // *Talanta*. – 2009. – Vol. 80. – P. 880-888.
6. Carson H.J. // *J. Leg. Med.* – 2007. – Vol. XXX. – P. 1-4.
7. Cheeta S., Schifano F., Oyefeso A. et al. // *Brit. J. Psychiatry*. – 2004. – №184. – P. 41-47.
8. *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.*
9. El-Moaty Farghaly O.A. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2000. – Vol. 23. – P. 783-791.
10. Gibbons R.D., Hur K., Bhaumik D.K. et al. // *Am. J. Psychiatry*. – 2006. – Vol. 163 (11). – P. 1898-1904.
11. Graham K., Massak A. // *CMAJ*. – 2007. – Vol. 176 (5). – P. 633-637.
12. Gschwend M.H., Arnold P., Ring J. et al. // *J. Chromatogr. B*. – 2006. – Vol. 831. – P. 132-139.
13. Holt M. // *Soc. Sci. Med.* – 2007. – Vol. 64 (9). – P. 1937-1947.
14. Huang M.C., Ho H.O., Yeh G.C. et al. // *J. Chromatogr. B*. – 2001. – Vol. 763. – P. 157-163.
15. Isbister G. K., Bowe S. J., Dawson A. et al. // *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* – 2004. – Vol. 42. – P. 277-285.
16. Jianguo L., Fengjuan Z., Huangxian J. // *J. Chromatogr. B*. – 2006. – Vol. 835. – P. 84-89.
17. Jönsson A., Holmgren P., Ahlner J. // *Forens. Sci. Int.* – 2004. – Vol. 143. – P. 53-59.
18. Liu J., Cao W., Qiu H. et al. // *Clin. Chem.* – 2002. – Vol. 48 (7). – P. 1049-1058.
19. Okulicz-Kozaryn K., Borucka A., Koson K. // *Alk. i narkomania*. – 2006. – Vol. 19 (1). – S. 35-52.
20. Rahme E., Dasgupta K., Turecki G. et al. // *J. Clin. Psychiatry*. – 2008. – Vol. 69 (3). – P. 349-357.
21. *Randall C. Baselt. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. – California, Foster City: Chemical Toxicology Institute, 2000. – P. 476-478.*
22. Rop P.P., Sournac M.H., Elie I. et al. // *J. Anal. Tox.* – 1999. – Vol. 23. – P. 294-296.
23. Sankaranarayanan J., Puumala S.E. // *Curr. Med. Res. Opin.* – 2007. – Vol. 23 (6). – P. 1375-1385.
24. Shinozuka T., Terada M., Tanaka E. // *Forens. Sci. Int.* – 2006. – Vol. 162. – P. 108-112.
25. Simon G.E., Savarino J., Operskalski B. et al. // *Am. J. Psychiatry*. – 2006. – Vol. 163 (1). – P. 41-47.

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

Надійшла до редакції 01.10.2012 р.