

Рекомендована д.х.н., професором В.В.Болотовим

УДК 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

## ІЗОЛЮВАННЯ СУЛЬПІРИДУ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ АЦЕТОНІТРИЛОМ ТА АЦЕТОНОМ

С.В.Баюрка

Національний фармацевтичний університет

**Встановлено ступінь ізолювання сульпіриду з біологічного матеріалу за допомогою підкисленого ацетонітрилу та нейтрального ацетону, який становив  $27,6 \pm 2,8\%$  та  $7,6 \pm 1,1\%$  відповідно. Показана можливість використання методу тонкошарової хроматографії, кольорових реакцій, УФ-спектроскопії для виявлення сульпіриду, виділеного з біологічного матеріалу, після додаткової очистки витяжок від супутніх домішок за допомогою методів екстракції та ТШХ. Кількісний вміст досліджуваного антидепресанта в екстрактах встановлювали УФ-спектрофотометричним методом. Отримані результати можуть бути використані при хіміко-токсикологічних дослідженнях біологічного матеріалу на сульпірид.**

У світі зберігається тенденція до збільшення отруєнь препаратами психотропної дії [7, 13, 15]. Більшість з них є комбінованими та згадуються у зв'язку з сумісним прийомом декількох антидепресантів, транквілізаторів, нейролептиків та алкоголю [5, 6, 8, 10, 12], що значно ускладнює клінічну та патоморфологічну діагностику зазначених отруєнь. У цих випадках результати токсикологічних досліджень мають бути використані для підтвердження діагнозу отруєння [6].

Сульпірид (N-[(етил-2-піролідиніл)метил]-2-метокси-5-сульфамойлбензамід) – сучасний психотропний лікарський засіб, який поєднує помірну антипсихотичну та антидепресивну активність [3]. Сульпірид неодноразово був причиною гострих та смертельних отруєнь [6]. Таким чином, розробка методів аналізу сульпіриду в біологічних об'єктах є актуальною задачею.

Для виявлення сульпіриду в біологічних рідинах запропоновані скринінгові системи з використанням методу тонкошарової хроматографії [6]. Опрацьовані методики аналізу сульпіриду в плазмі та сечі за допомогою газорідинної хроматографії [6], високо-ефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [6, 14], сполучення ВЕРХ з тандемною мас-спектроскопією [9], капілярного електрофорезу [11], флюоресцентної спектроскопії [4]. Дані щодо методів дослідження біологічного матеріалу на сульпірид у літературі відсутні.

Останнім часом як ефективні екстрагенти лікарських речовин з біологічного матеріалу набули амфільні розчинники (ацетонітрил, ацетон), які до то-

го ж, за даними деяких авторів [2, 16], екстрагують порівняно невелику кількість співекстрактивних речовин з біологічного об'єкту.

Метою нашої роботи було встановлення розрізняльної спроможності щодо сульпіриду методів ізолювання підкисленим ацетонітрилом (за методом І.Сшедзінські [16]) та нейтральним ацетоном (методом В.А.Карташова [2]).

### Матеріали та методи

20 г (при ізолюванні ацетонітрилом) та 5 г (при ізолюванні ацетоном) подрібненої печінки людини, яка загинула від травми, вміщували у стакан, додавали 2 мл водного розчину сульпіриду, який містив 2000 мкг (при ізолюванні методом І.Сшедзінські) та 500 мкг (при ізолюванні методом В.А.Карташова) препарату. Суміш ретельно перемішували і залишали на 24 год. Паралельно ставили «холості» досліді.

Виділення сульпіриду з печінки зазначеними розчинниками проводили, як описано нами раніше в роботі [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 мірі екстрагувалась діетиловим етером (ступінь одноразової екстракції складав 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 вод-

Результати УФ-спектрофотометричного визначення сульпіриду, виділеного з печінки підкисленим ацетонітрилом (метод І.Сшедзінські) та нейтральним ацетоном (метод В.А.Карташова)

Метод ізолювання	Додано сульпіриду, мкг (до <i>m</i> г печінки)	Виділено сульпіриду		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
Підкисленим ацетонітрилом (метод І.Сшедзінські)	2000 ( <i>m</i> =20)	526,0	26,3	$\bar{X} = 27,6$ $S = 2,3$ $S_{\bar{X}} = 1,0$ $\Delta\bar{X} = 2,8$ $\varepsilon = 10,2$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 27,6 \pm 2,8$
		584,0	29,2	
		494,0	24,7	
		608,0	30,4	
		552,0	27,6	
Нейтральним ацетоном (метод В.А.Карташова)	500 ( <i>m</i> =5)	41,5	8,3	$\bar{X} = 7,6$ $S = 0,9$ $S_{\bar{X}} = 0,4$ $\Delta\bar{X} = 1,1$ $\varepsilon = 14,1$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 7,6 \pm 1,1$
		34,0	6,8	
		38,5	7,7	
		42,5	8,5	
		33,0	6,6	

ний залишок підлюговували 20% розчином натрію гідроксиду до рН 10-11 і тричі екстрагували сульпірид 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» досліди з біологічним матеріалом для отримання розчинів порівняння.

#### Результати та їх обговорення

Виявлення та кількісне визначення сульпіриду в отриманих екстрактах проводили за допомогою кольорових реакцій, тонкошарової хроматографії (ТШХ), УФ-спектроскопії, УФ-спектрофотометрії.

При ізолюванні сульпіриду з біологічного матеріалу підкисленим ацетонітрилом методом І.Сшедзінські та нейтральним ацетоном методом В.А.Карташова було встановлено, що отримані біологічні екстракти містили деяку кількість домішок, присутність яких була небажаною для подальшого виявлення та кількісного визначення досліджуваної лікарської сполуки. Так, результати вимірювань показників оптичної густини, отримані УФ-спектрофотометричним методом для екстрактів з «холостих» дослідів за наведеними вище методами ізолювання, становили, відповідно, 0,12-0,14 та 0,12-0,18.

Додаткового екстракційного очищення було достатньо для проведення кольорових реакцій та УФ-спектрофотометричного визначення сульпіриду в екстрактах, яке проводили на фоні «холостих» дослідів. Їх оптична густина після додаткового екстракційного очищення не перевищувала 0,055-0,09.

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

Виявлення сульпіриду в екстрактах методом ТШХ проводили з використанням скляних хроматографічних пластинок для високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) виробництва Естонії (сорбент КСКГ, фракція – 5÷20 мкм, товщина шару – 130±25 мкм, розмір пластинок 20×20 см), Sorbfil (силікагель СТХ-1 ВЕ, тип підложки – ПЕТФ, зв'язуюча

речовина – силіказоль, фракція – 8÷12 мкм, товщина шару – 100 мкм, розмір пластинок – 10×10 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 бензен-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  $R_f$  співпадали та склали 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-діетиламіну (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 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 склав 99,2%. Отриманий залишок розчиняли в 4 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної. Оптичну густина визначали на спектрофотометрі СФ-46 при  $\lambda_{\max} = 293$  нм, використовуючи кювету з товщиною шару рідини 10 мм. УФ-спектр одержаного розчину був аналогіч-

ним 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 досліди зі стандартним розчином сульпіриду в хлороформі (30 мкг/мл) та витяжкою з «холостого» досліджуваного.

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 кількісного визначення сульпіриду, виділеного з печінки методами І.Сшедзінські та В.А.Карташова, наведені в таблиці.

Як видно, за допомогою запропонованих методик з печінки можна виділити  $27,6 \pm 2,8\%$  та  $7,6 \pm 1,1\%$  сульпіриду відповідно.

#### ВИСНОВКИ

1. Вивчено розрізняльну спроможність відносно сульпіриду методів ізолювання лікарських речовин підкисленим ацетонітрилом (методом І.Сшедзінські) та нейтральним ацетоном (методом В.А.Карташова), які дозволили виділити, відповідно,  $27,6 \pm 2,8\%$  та  $7,6 \pm 1,1\%$  досліджуваного антидепресанта.

2. Показана можливість використання методу ТШХ, кольорових реакцій, УФ-спектроскопії для виявлення сульпіриду, виділеного з біологічного матеріалу, після попередньої додаткової очистки витяжок від супутніх домішок за допомогою сполучення методів екстракції та ТШХ.

3. Отримані результати можуть бути використані при хіміко-токсикологічних дослідженнях біологічного матеріалу на сульпірид.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Баюрка С.В., Карпушина С.А., Бондар В.С. // *Вісник фармації*. – 2009. – №1 (57). – С. 19-22.
2. Карташов В.А., Кнауб В.А., Чернова Л.В. // *СМЭ*. – 1988. – №1. – С. 33-35.
3. Машковский М.Д. *Лекарственные средства: 15-е изд.* – М.: ООО «Изд-во Новая Волна», 2006. – С. 69.
4. Abdelal A., El-Enany N., Belal F. // *Talanta*. – 2009. – Vol. 80. – P. 880-888.
5. Carson H.J. // *J. Leg. Med.* – 2007. – Vol. XXX. – P. 1-4.
6. *Clark's analysis of Drugs and Poisons: 3rd 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.
7. Gibbons R.D., Hur K., Bhaumik D.K. et al. // *Am. J. Psychiatry*. – 2006. – Vol. 163 (11). – P. 1898-1904.
8. Graham K., Massak A. // *CMAJ*. – 2007. – Vol. 176 (5). – P. 633-637.
9. Gschwend M.H., Arnold P., Ring J. et al. // *J. Chromatogr. B*. – 2006. – Vol. 831. – P. 132-139.
10. Holt M. // *Soc. Sci. Med.* – 2007. – Vol. 64 (9). – P. 1937-1947.
11. Jianguo L., Fengjuan Z., Huangxian J. // *J. Chromatogr. B*. – 2006. – Vol. 835. – P. 84-89.
12. Okulicz-Kozaryn K., Borucka A., Koson K. // *Alk. i narkomania*. – 2006. – Vol. 19 (1). – С. 35-52.
13. Rahme E., Dasgupta K., Turecki G. et al. // *J. Clin. Psychiatry*. – 2008. – Vol. 69 (3). – P. 349-357.
14. Shinozuka T., Terada M., Tanaka E. // *Forens. Sci. Int.* – 2006. – Vol. 162. – P. 108-112.
15. Simon G.E., Savarino J., Operskalski B. et al. // *Am. J. Psychiatry*. – 2006. – Vol. 163 (1). – P. 41-47.
16. Szedzinski I. // *Arch. Med. Sad. Krymin.* – 1978. – Vol. 28. – P. 199.

УДК 615.065:54.061/062:547.712.22:001.8

ИЗОЛИРОВАНИЕ СУЛЬПИРИДА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА АПРОТОННЫМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ

С.В.Баюрка

Установлена степень изолирования сульпирида из биологического материала с помощью подкисленного ацетонитрила и нейтрального ацетона, которая составила  $67,2 \pm 4,0\%$  и  $45,0 \pm 2,7\%$  соответственно. Показана возможность использования метода тонкослойной хроматографии, цветных реакций, УФ-спектроскопии для обнаружения сульпирида, выделенного из биологического материала, после дополнительной очистки вытяжек от сопутствующих примесей с помощью методов экстракции и ТСХ. Количественное содержание сульпирида в экстрактах устанавливали УФ-спектрофотометрическим методом. Полученные результаты могут быть использованы при химико-токсикологических исследованиях биологического материала на сульпирид.

UDC 615.065:54.061/062:547.712.22:001.8

ISOLATION OF SULPIRIDE FROM THE BIOLOGICAL MATERIAL BY ACETONITRILE AND ACETONE

S.V.Bayurka

The degree of sulphiride isolation from the biological material by acidified acetonitrile and neutral acetone has been determined, it is  $27.6 \pm 2.8\%$  and  $7.6 \pm 1.1\%$ , respectively. The possibility of application of the Thin Layer Chromatography method, colour reactions, UV-spectroscopy for detection of sulphiride isolated from the biological material after the additional purification of the extracts from concomitant admixtures by means of the back extraction and TLC has been shown. The quantitative content of the medicine in the extracts was determined by the UV-spectrophotometric method. The results obtained can be used for chemical and toxicological examination of the biological material for sulphiride.