

Рекомендована д.ф.н., професором П.О.Безуглим

УДК 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

РОЗРОБКА МЕТОДІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СУЛЬПІРИДУ, ПРИДАТНИХ ДЛЯ ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНОГО АНАЛІЗУ

С.В.Баюрка, В.В.Болотов, С.А.Карпушина

Національний фармацевтичний університет

Вивчені умови ідентифікації сульпіриду за допомогою тонкошарової хроматографії, кольорових реакцій, УФ-спектроскопії. Розроблені методики УФ-спектрофотометричного та екстракційно-спектрофотометричного визначення сульпіриду реакцією з метиловим оранжевим.

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, також проявляє стимулюючі властивості [5, 7]. Сульпірид неодноразово був причиною гострих та смертельних отруєнь [12, 15]. Таким чином, розробка методів аналізу сульпіриду, придатних для використання при хіміко-токсикологічних дослідженнях, є актуальною задачею.

Запропоновано скринінгові системи для виявлення сульпіриду за допомогою методу тонкошарової хроматографії (ТШХ) [12], але перелік наведених рухомих фаз обмежений. На наш погляд, доцільно провести хроматографічне дослідження сульпіриду з використанням рухомих фаз, рекомендованих Міжнародним комітетом з систематичного токсикологічного аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів [1].

Опрацьовано методики аналізу сульпіриду в плазмі та сечі за допомогою газорідинної хроматографії [12], вискоєфективної рідинної хроматографії з УФ-спектрофотометричним детектуванням (ВЕРХ) [10, 11, 13, 15], ВЕРХ з детектором поглинання в УФ-діапазоні з діодною матрицею, флюоресцентним детектором [12], РХ-МС з ультразвуковою іонізацією [16], капілярного електрофорезу з електрогенерованим хемілюмінесцентним детектуванням [14]. Вищеперелічені методики характеризуються високою чутливістю та специфічністю, але потребують ретельної пробопідготовки (твердофазної екстракції [16], рідиннофазної мікроекстракції [14]) та спеціального коштовного обладнання, що робить їх малодоступними.

Метою нашого дослідження було встановлення умов виявлення, ідентифікації та кількісного визначення сульпіриду за допомогою простих, доступних та широко впроваджених у практику хіміко-токсикологічного аналізу методів [3, 12]: ТШХ, хімічних ре-

акцій, УФ-спектрофотометрії та екстракційної спектрофотометрії у видимій області.

Матеріали та методи

Хроматографічне дослідження проводили з використанням пластинок для вискоєфективної 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), Merck виробництва Німеччини (силікагель GF₂₅₄, розмір пластинок – 10×20 см), Silufol UV-254 (силікагель, підложка – фольга, зв'язуюча речовина – крохмаль, розмір пластинок – 10×10 см) та рухомих фаз, які наведені в табл. 1. Як проявник сульпіриду на хроматографічних пластинках використовували реактив Драгендорфа у модифікації за Муньє.

Кольорові реакції проводили у порцелянових чашках з хлороформними розчинами сульпіриду (вміст речовини складав від 0,5 до 20 мкг у пробі). Як реагенти використовували кольорові реактиви [3, 12], зокрема концентровані кислоти: сульфатну, нітратну, хлоридну, фосфатну, ацетатну та реактиви Маркі, Манделіна, Фреде, Лібермана, Ердмана.

УФ-спектри абсорбції сульпіриду в 0,1 М розчині кислоти хлоридної знімали на спектрофотометрії СФ-46 у діапазоні довжин хвиль 200-350 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм; як розчин порівняння використовували 0,1 М розчин кислоти хлоридної.

Для УФ-спектрофотометричного визначення сульпіриду використовували абсорбцію при довжині хвилі 293 нм.

Методика побудови градувального графіка для УФ-спектрофотометричного визначення сульпіриду.

Розчини сульпіриду 1-10 готували наступним чином: 0,0100 г досліджуваної речовини вносили в мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняли у 0,1 М розчині кислоти хлоридної та доводили об'єм розчину до мітки вказаним розчином кислоти (стандартний розчин з концентрацією 200 мкг / мл). У мірні колби місткістю 10 мл вносили 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 та 10 мл стандартного розчину і доводили об'єми розчинів до мітки 0,1 М розчином кислоти хлоридної (розчини 1-10, відповідно, концентрації – 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180 та 200 мкг/мл). Вимірювали оптичну густину і будова-

Таблиця 1

Значення Rf сульпіриду у різних рухомих фазах та тонких шарах

№ п/п	Рухомі фази	Значення Rf сульпіриду			
		ВЕТШХ	Сорбфіл	Merk	Силуфол
1	Метанол-25% розчин амонію гідроксиду (100:1,5)	0,53	0,55	0,32	0,25
2	Хлороформ-метанол (90:10)	0,01	0,03	0,02	0,02
3	Етилацетат-метанол-25% розчин амонію гідроксиду (85:10:5)	0,77	0,81	0,63	0,76
4	Хлороформ- <i>n</i> -бутанол-25% розчин амонію гідроксиду (70:40:5)	0,68	0,94	0,96	0,97
5	Метанол- <i>n</i> -бутанол (60:40)	0,06	0,07	0,07	0,03
6	Метанол	0,15	0,18	0,13	0,11
7	Ацетон	0,01	0,02	0,02	0,01
8	Етилацетат	0	0	0	0
9	Циклогексан-толуен-діетиламін (75:15:10)	0	0	0	0
10	Гексан- <i>i</i> -пропанол-25% розчин амонію гідроксиду (24:6:0,3)	0,02	0,02	0,03	0,01
11	Толуен-ацетон-етанол-25% розчин амонію гідроксиду (45:45:7,5:2,5)	0,15	0,28	0,18	0,25
12	Хлороформ-діоксан-ацетон-25% розчин амонію гідроксиду (47,5:45:5:2,5)	0,37	0,40	0,36	0,30
13	Хлороформ-ацетон-25% розчин амонію гідроксиду (12:24:1)	0,60	0,68	0,55	0,65
14	Хлороформ-ацетон-25% розчин амонію гідроксиду (25:5:0,3)	0,08	0,08	0,07	0,05
15	<i>n</i> -Бутанол-кислота ацетатна-вода (4:0,5:1)	0	0	0	0
16	Етилацетат-ацетон-25% розчин амонію гідроксиду (50:45:5)	0,73	0,81	0,60	0,75
17	Етилацетат-метанол-25% розчин амонію гідроксиду (85:10:2,5)	0,47	0,56	0,45	0,30
18	Бензен-метанол-діетиламін (90:10:10)	0,60	0,52	0,56	0,55
19	Гексан-етилацетат-етанол-25% розчин амонію гідроксиду (30:10:5:1)	0,07	0,08	0,06	0,05
20	Етанол-ацетон-вода (1:1:2)	0,11	0,12	0,11	0,07
21	Гексан-толуен-діетиламін (75:15:10)	0	0	0	0
22	Хлороформ-гексан-етанол (1:1:1)	0,02	0,08	0,02	0,03
23	Хлороформ-ацетон (80:20)	0	0	0	0
24	Хлороформ	0	0	0	0

ли графік залежності оптичної густини від концентрації.

Методика побудови градуального графіка для екстракційно-спектрофотометричного визначення сульпіриду.

Сульпірид (0,0500 г) вносили в мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняли у хлороформі та доводили об'єм розчину до мітки вказаним розчинником (стандартний розчин з концентрацією 1000 мкг / мл).

У ділильну лійку вносили 5,0 мл ацетатного буферного розчину з рН 4,6, 5,0 мл 0,05 % розчину метилового оранжевого та по 0,05; 0,1; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,4; 0,45; 0,5 та 0,55 мл стандартного розчину сульпіриду, відповідно. В усіх випадках об'єм хлороформу доводили до 1 мл. До отриманої суміші додавали 15 мл хлороформу. Суміш у ділильній лійці струшували протягом 10 хв за допомогою ме-

ханічного струшувача і залишали на 10 хв для розділення шарів. Збирали 14 мл хлороформного шару, відкидаючи першу порцію (близько 1 мл), і додавали до нього 2 мл 1% розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі. Одержану суміш ретельно перемішували та визначали оптичну густину на спектрофотометрі СФ-46 при $\lambda_{\max} = 540$ нм, використовуючи кювету з товщиною шару рідини 10 мм. Як розчин порівняння застосовували хлороформ. Величину рН буферного розчину контролювали потенціометрично. Вимірювали оптичну густину і будували графік залежності оптичної густини від концентрації сульпіриду.

Результати та їх обговорення

Результати хроматографічного дослідження сульпіриду наведені в табл. 1. Рухомі фази №1-9 рекомендовані Міжнародним комітетом з систематично-

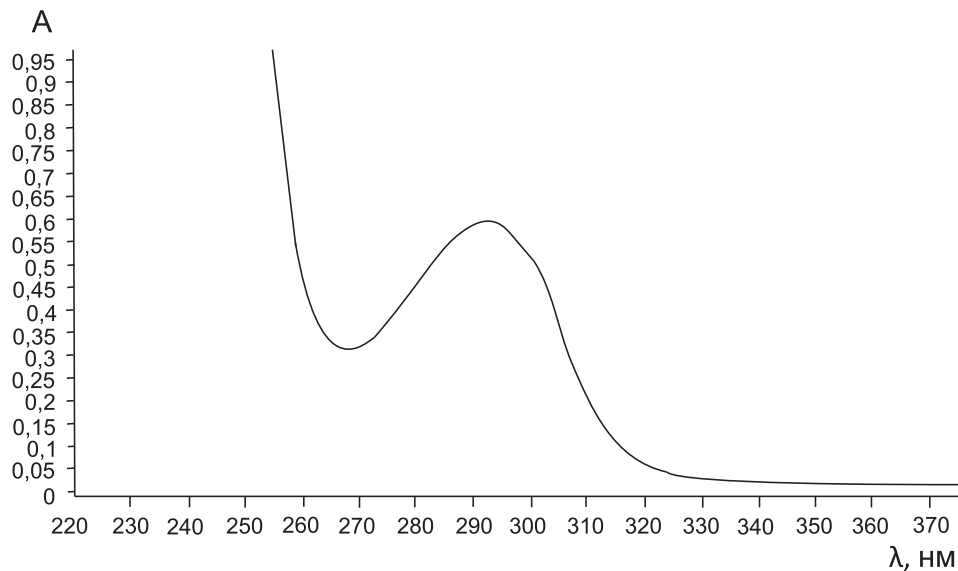


Рис. УФ-спектр світлопоглинання сульпіриду в 0,1 М розчині кислоти хлоридної (концентрація $3 \cdot 10^{-4}$ моль/л).

го токсикологічного аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів. Рухомі фази №10-24 використовуються у хіміко-токсикологічному аналізі для виявлення лікарських речовин основного характеру методом ТШХ [6, 9].

При використанні реактиву Драгендорфа у модифікації Мунье як проявника сульпіриду на хроматографічних пластинках спостерігали оранжевий колір плям препарату на жовтому фоні. Чутливість виявлення сульпіриду при цьому знаходилась у межах 1,0-3,0 мкг препарату в пробі. Чутливість зазначеного проявника при виявленні сульпіриду була найвищою при використанні хроматографічних пластинок Sorbfil (1,0-2,0 мкг у пробі).

Встановлено, що з вказаних вище кольорових реактивів сульпірид утворював забарвлення лише з реактивами Маркі (зеленувато-блакитне, що переходило у зелене) та Фреде (зеленувате); чутливість вказаних реакцій становила 20,0 та 15,0 мкг препарату в пробі відповідно.

УФ-спектр абсорбції сульпіриду в 0,1 М розчині кислоти хлоридної мав максимум світлопоглинання при довжині хвилі 293 ± 2 нм (рис.). Нами було визначено питомий та молярний коефіцієнти світлопоглинання: $A^1_{1\%} = 60$; $\epsilon = 1993$.

Для розробки методики екстракційно-спектрофотометричного визначення сульпіриду попередньо нами було встановлено, що кислотний азобарвник метиловий оранжевий (0,05% водний розчин) утворює з сульпіридом у середовищі ацетатного буферного розчину з рН 4,6 іонний асоціат, який екстра-

гується хлороформом. Забарвлення розчинів іонних асоціатів виявилось малоінтенсивним, тому для підсилення чутливості методу утворені іонні асоціати руйнували додаванням до їх хлороформних розчинів 1% розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі. При цьому одержували розчини, що мали значно вищу оптичну густину.

Було визначено також оптимальні умови проведення екстракційно-спектрофотометричного визначення [2]: об'єми розчину метилового оранжевого, ацетатного буферного розчину та хлороформу, кількість екстракцій іонного асоціату відповідним органічним розчинником, а також оптимальне значення рН буферного розчину, для чого нами було виготовлено ряд ацетатних буферних розчинів з рН від 3,0 до 6,0 [4].

Для кількісного визначення сульпіриду в модельних розчинах УФ-спектрофотометричним та екстракційно-спектрофотометричним методами попередньо встановлювали градувальну залежність оптичної густини від концентрації, загальний вигляд якої описується рівнянням лінійної регресії виду: $y = bx + a$. Значення параметрів a та b розраховували за методом найменших квадратів [9]. Після перевірки значущості параметра a в отриманих рівняннях [9] було зроблено висновок про можливість переходу до рівняння виду $y = b \cdot x$ для градувальної залежності екстракційно-спектрофотометричного визначення. Метрологічні характеристики отриманих градувальних залежностей наведені в табл. 2.

Таким чином, рівняння градувальних залежностей для УФ-спектрофотометричного (1) та екс-

Таблиця 2

Метрологічні характеристики градувальної залежності оптичної густини від вмісту сульпіриду ($y = bx + a$), отриманої УФ-спектрофотометричним та екстракційно-спектрофотометричним методами

Метод	r	b	a	S ²	Δb	Δa
УФ-спектрофотометричний	0,9998	0,00629	- 0,027	$7 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-3}$
Екстракційно-спектрофотометричний	0,9995	0,00200	-	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-5}$	-

тракційно-спектрофотометричного методів (2) мали такий вигляд:

$$A = 0,00629C - 0,027, \quad (1)$$

$$A = 0,002C, \quad (2)$$

де: A – оптична густина; C – концентрація розчину сульпіриду, відповідно, мкг/мл або мкг у пробі.

Світлопоглинання розчинів підлягало закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 20 до 200 мкг / мл (УФ-спектрофотометричний метод) та від 50 до 550 мкг сульпіриду в 15 мл кінцевого об'єму (екстракційно-спектрофотометричний метод), відносна невизначеність середнього результату становила $\pm 1,9\%$ та $\pm 3,4\%$ відповідно.

ВИСНОВКИ

1. Вивчено хроматографічну поведінку сульпіриду у загальних та деяких часткових рухомих фазах, за-

гальноприйнятих у токсикологічному скринінгу речовин основного характеру з використанням чотирьох типів тонких шарів.

2. Вивчено кольорові реакції виявлення сульпіриду.

3. Досліджено УФ-спектр поглинання сульпіриду в 0,1 М розчині кислоти хлоридної та визначено коефіцієнти світлопоглинання.

4. Розроблено методики УФ-спектрофотометричного та екстракційно-спектрофотометричного (за реакцією з метиловим оранжевим) визначення сульпіриду. Світлопоглинання розчинів підлягало закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 20 до 200 мкг / мл (УФ-спектрофотометричний метод) та від 50 до 550 мкг сульпіриду у пробі в 15 мл кінцевого об'єму (екстракційно-спектрофотометричний метод). Відносна невизначеність середнього результату складала для запропонованих методів $\pm 1,9\%$ та $\pm 3,4\%$ відповідно.

ЛІТЕРАТУРА

1. Еремін С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В. Анализ наркотических средств. – М.: Мысль, 1993. – 272 с.
2. Коренман И.М. Фотометрический анализ: Методы определения органических соединений: Изд. 2-е; перераб. и доп. – М.: Химия, 1975. – 359 с.
3. Крамаренко В.П. Токсикологічна хімія. – К.: Вища шк., 1995. – 423 с.
4. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. – М.: Химия, 1989. – 448 с.
5. Машковский М.Д. Лекарственные средства: 15-е изд. – М.: ООО «Изд-во Новая Волна», 2006. – С. 106.
6. Николаева Э.Г. // СМЭ. – 1990. – Т. 33, №1. – С. 39-40.
7. Порошина Е.Г. // ФАРМиндекс-Практик. – 2004. – Вып. 6. – С. 12-23.
8. Физико-химические методы анализа. Практическое руководство: Учеб. пособие для вузов / В.Б.Алесковский, В.В.Браун, М.И.Булатов и др.; Под ред. В.Б.Алесковского. – Л.: Химия, 1988. – 376 с.
9. Чернова Л.В., Карташов В.А., Коныгина Е.Ю. // СМЭ. – 1991. – Т. 34, №1. – С. 34-36.
10. Bressolle F., Brès J. // J. Chromatogr. – 1985. – Vol. 341 (2). – P. 391-399.
11. Bressolle F., Fauré-Jeantis A. // J. Pharm. Sci. – 1992. – Vol. 81 (1). – P. 26-32.
12. 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.
13. Huang M.C., Ho H.O., Yeh G.C. et al. // J. Chromatogr. B. – 2001. – Vol. 763. – P. 157-163.
14. Liu J., Cao W., Qiu H. et al. // Clin. Chem. – 2002. – Vol. 48 (7). – P. 1049-1058.
15. Rop P.P., Sournac M.H., Elie I. et al. // J. Anal. Toxicol. – 1999. – Vol. 23. – P. 294-296.
16. Shinozuka T., Terada M., Tanaka E. // Forens. Sci. Int. – 2006. – Vol. 162. – P. 108-112.

УДК 615.065:54.061/062:547.712.22:001.8

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУЛЬПИРИДА, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

С.В.Баюрка, В.В.Болотов, С.А.Карпушина

Изучены условия идентификации сульпирида с помощью тонкослойной хроматографии, цветных реакций, УФ-спектроскопии. Разработаны методики УФ-спектрофотометрического и экстракционно-спектрофотометрического определения сульпирида по реакции с метиловым оранжевым.

UDC 615.065:54.061/062:547.712.22:001.8

DEVELOPMENT OF IDENTIFICATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION METHODS OF SUIPIRIDE SUITABLE FOR THE CHEMICAL TOXICOLOGICAL ANALYSIS

S.V.Bayurka, V.V.Bolotov, S.A.Karpushina

The conditions of sulpiride identification by means of the Thin Layer Chromatography, colour reactions, UV-spectroscopy have been studied. The methods of sulpiride quantitative determination with the help of UV spectrophotometry and extraction spectrophotometry by the reaction with methyl orange have been developed.