

УДК 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

С.В. БАЮРКА<sup>1</sup>, С.А. КАРПУШИНА<sup>2</sup>,кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры токсикологической химии<sup>1</sup>,кандидат химических наук, доцент кафедры токсикологической химии<sup>2</sup>,

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина

# РАЗРАБОТКА МЕТОДА ИЗОЛИРОВАНИЯ СУЛЬПИРИДА

## ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Сульпирид (N-[(этил-2-пирролидинил)метил]-2-метокси-5 сульфамойл-бензамид) – современный психотропный препарат комбинированного действия, сочетающий в себе анксиолитическую и антипсихотическую активность. Широко применяется в современной медицинской практике при лечении невротических состояний, острых и хронических психозов и шизофрении [1,2].



### АННОТАЦИЯ

Разработан эффективный метод выделения сульпирида из биологического материала элюированием препарата хлороформом из гомогенизированной ткани путем растирания ее с безводным натрием сульфатом с последующей экстракционной очисткой элюатов с помощью системы растворителей гексан – ацетонитрил. Разрешающая способность метода составила  $33,1 \pm 4,8\%$ . Анализ сульпирида в элюатах проводили с помощью ТСХ, УФ-спектроскопии, ВЭЖХ с мультиволновым УФ-детектором.

**Ключевые слова:** Сульпирид, психотропный препарат комбинированного действия, ВЭЖХ с мультиволновым УФ-детектором, побочные действия сульпирида.

### ВВЕДЕНИЕ

Сульпирид имеет побочные эффекты, а при передозировке оказывает токсическое действие. По данным литературы [3,4], препарат неоднократно становился причиной острых и смертельных отравлений. Смер-

тельные концентрации, зарегистрированные при этом, составляли: 38–38,7 мг/л (кровь [3], сыворотка крови [4]), 803,27 мг/л (моча) [3], 155,67 мг/л (содержимое желудка) [3].

Предложены методики анализа сульпирида в плазме крови и моче с помощью газожидкостной хроматографии [3], высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [4,5,6], капиллярного зонного электрофореза [7]. Ранее нами была установлена разрешающая способность относительно сульпирида классических общих методов изолирования лекарственных веществ из биологического материала (методы Васильевой А.А., Стаса-Отто, Крамаренко В.Ф.), степень изолирования сульпирида составила  $8,6 \pm 1,4\%$ ,  $18,3 \pm 1,8\%$ ,  $4,9 \pm 0,7\%$  соответственно [8]. Невысокая эффективность вышеперечисленных методов, вероятно, связана с липофильностью указанного препарата, о чем свидетельствуют достаточно высокие значения объема распределения сульпирида ( $V_d = 2\text{--}3$  л/кг) [3].

Использование липофильного растворителя – хлороформа – для элюирования сульпирида из гомогенизированной ткани печени путем растирания ее с безводным натрия сульфатом позволило несколько повысить эффективность методики по сравнению с изолированием подкисленной водой (методы Васильевой А.А. и Крамаренко В.Ф.), разрешающая способность метода составила  $14,1 \pm 1,9\%$  [9].

## ЦЕЛЬ

Оптимизация вышеуказанной методики выделения сульпирида хлороформом с учетом липофильности препарата на стадии экстракционной очистки элюатов, для чего нами была предложена система двух несмешивающихся растворителей (липофильного и амфифильного): гексана и ацетонитрила.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Методика изолирования сульпирида из ткани печени.** К модельным пробам печени (5 г) добавляли водные растворы сульпирида, содержащие 500 мкг препарата, и оставляли на сутки. Полученные объекты гомогенизировали растиранием с тройным количеством натрия сульфата безводного. Из полученной массы сульпирид элюировали 100 мл хлороформа, используя для этого стеклянную бюретку. Элюаты упаривали на водяной бане при температуре не выше  $40^{\circ}\text{C}$ . Сухой остаток растворяли в 10 мл гексана и проводили четырехкратную экстракцию сульпирида ацетонитрилом по 10 мл каждый раз. Четырехкратная экстракция сульпирида из гексана ацетонитрилом в модельных опытах показала, что препарат полностью экстрагируется ацетонитрилом. Такая операция позволяет очистить сульпирид от жиров и липидов. Далее ацетонитрил упаривали, сухой остаток растворяли в хлороформе и количественно переносили в мерную колбу на 25 мл.

Анализ сульпирида в экстрактах проводили с помощью ранее разработанных нами методов ТСХ и УФ-спектроскопии [10], а также ВЭЖХ с мультиволновым УФ-детектором.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ТСХ обнаружение сульпирида проводили в хроматографических системах, рекомендованных ТИАФТ для общего ТСХ скрининга психотропных веществ [11]. Для исследования использовали хроматографические пластинки «Сорбфил» (силикагель ПТСХ-П-А, фракция 5-17 мкм, размер  $10 \times 10$  см) и Merck (Silica gel 60 F254, размер  $10 \times 20$  см), подвижные фазы метанол – аммония гидроксид, 25-процентный раствор (100:1,5) и этилацетат – метанол – аммония гидроксид, 25-процентный раствор (85:10:5). Проявляли сульпирид с помощью реактива Драгендорфа в модификации по Мунье (чувствительность – 1,0-2,0 мкг препарата в пробе). Значения  $R_f$  препарата в указанных выше подвижных фазах состави-

ли соответственно  $0,54 \pm 0,02$  (для пластинок «Сорбфил») и  $0,31 \pm 0,02$  (для пластинок Merck),  $0,81 \pm 0,02$  (для пластинок «Сорбфил») и  $0,63 \pm 0,02$  (для пластинок Merck).

Сульпирид элюировали с непроявленной полосы хроматограммы метанолом, элюат упаривали, остаток растворяли в 4 мл 0,1 М раствора соляной кислоты и снимали УФ-спектр полученного раствора на спектрофотометре СФ-46 (кювета с толщиной слоя жидкости 10 мм). Полученный УФ-спектр был аналогичным спектру раствора сульпирида-стандарта в 0,1 М растворе соляной кислоты ( $3 \cdot 10^{-4}$  моль/л) и имел  $\lambda_{\text{max}} = 293 \pm 2$  нм.

Анализ сульпирида методом ВЭЖХ проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром А-02» (ЗАО «Эконова», Новосибирск, Россия).

Условия хроматографирования:

- колонка размером  $2 \times 75$  мм с обращенной фазой C18 (ProntoSIL-120-5-C18 AQ);
- элюент А – 0,2 М перхлорат лития-0,005 М перхлорная кислота, элюент Б – ацетонитрил;
- режим элюирования – градиентный (от 5% Б до 100% Б за 40 мин, 100% Б – в течение 3 мин);
- скорость подачи подвижной фазы – 100 мкл/мин;
- температура термостата колонки –  $40^{\circ}\text{C}$ ;
- объем вводимой пробы – 10 мкл;
- детектор мультиволновой УФ-спектрофотометрический.

Детектирование проводили при 8 длинах волн: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм.

Сульпирид идентифицировали в метанольных элюатах с хроматограмм по времени удерживания и спектральным характеристикам R, которые рассчитывали как отношение площади пика при определенной длине волны  $\lambda$  к площади пика, при длине волны 210 нм ( $R = S_{\lambda}/S_{210}$ ).

Время удерживания сульпирида в элюатах составляло  $9,75 \pm 0,08$  мин ( $n=3$ ,  $RSD=0,33\%$ ,  $\varepsilon=0,83\%$ ). Полученные значения спектральных отношений приведены в таблице 1.

**Таблица 1** – Спектральные отношения ( $R = S_{\lambda}/S_{210}$ ) и их метрологические характеристики ( $n=3$ ) для сульпирида при анализе методом ВЭЖХ

| $\lambda$ , нм            | 220   | 230   | 240   | 250   | 260   | 280   | 300   |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $R = S_{\lambda}/S_{210}$ | 0,751 | 0,394 | 0,354 | 0,201 | 0,045 | 0,047 | 0,061 |
| RSD, %                    | 0,54  | 0,26  | 0,85  | 1,49  | 2,13  | 7,14  | 4,92  |
| $\Delta X$                | 0,009 | 0,003 | 0,009 | 0,009 | 0,003 | 0,007 | 0,008 |
| $\varepsilon$ , %         | 1,30  | 0,66  | 2,43  | 4,48  | 6,38  | 17,14 | 13,11 |

Время удерживания, а также спектральные отношения для сульпирида в элюате и стандартном метанольном растворе препарата (концентрация 5 мкг/мл) совпадали. Был оценен предел обнаружения сульпирида в стандартных растворах, который составил  $LOD=2$  мкг/мл (соответствует 0,02 мкг в пробе). Критерием оценки LOD стала величина соотношения «сигнал/шум»:  $S_s/S_n=3:1$  (для  $\lambda=290$  нм), согласно рекомендациям UNODC по анализу

контролируемых лекарственных препаратов в биологических объектах хроматографическими методами [12].

Количественное содержание сульпирида в элюатах устанавливали ВЭЖХ методом при  $\lambda=290$  нм, что соответствует области максимального светопоглощения сульпирида в метаноле (степень элюирования сульпирида из слоя сорбента метанолом составила 99,3%). Предварительно, с использованием серии стандартных растворов сульпирида в метаноле, была установлена градуировочная зависимость площади хроматографического пика (Y) от концентрации (X), которая описывалась уравнением:  $Y=7,74 \cdot 10^{-4} X$  ( $r=0,999$ ;  $S^2=1,49 \cdot 10^{-7}$ ; пределы линейности – от 5 до 100 мкг/мл). Предел количественного определения сульпирида в стандартных растворах был оценен по критерию  $10\sigma$  [12] и составил  $LOQ=5,0$  мкг/мл. Правильность и точность методики количественного определения в области низких концентраций (5 мкг/мл) составили: 98,9%;  $RSD=1,7\%$ ;  $\varepsilon=2,8\%$  ( $n=5$ ).

Результаты количественного определения сульпирида, выделенного из ткани печени, приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты ВЭЖХ определения сульпирида, выделенного из ткани печени, с помощью хлороформа по способу, предложенному для липофильных веществ

| Добавлено сульпирида к 5 г печени, мкг | Выделено сульпирида, X, % | Метрологические характеристики |     |                                 |                   |
|----------------------------------------|---------------------------|--------------------------------|-----|---------------------------------|-------------------|
|                                        |                           | S                              | SX  | $\Delta X$ ( $P=95\%$ , $v=4$ ) | $\varepsilon$ , % |
| 500                                    | 33,1                      | 3,9                            | 1,7 | 4,8                             | 14,6              |

Степень изолирования указанного лекарственного вещества с помощью разработанной методики, учитывающей липофильность исследуемого соединения, составила  $33,1 \pm 4,8\%$ , что существенно превышает разрешающую способность общих методов с использованием подкисленной воды или подкисленного этанола.

### ВЫВОДЫ

Разработан эффективный метод выделения сульпирида из биологического материала, учитывающий липофильность исследуемого препарата. Метод основан на элюировании сульпирида из гомогенизированной ткани путем растирания ее с безводным натрием сульфатом с последующей экстракционной очисткой элюатов с помощью системы растворителей гексан – ацетонитрил. Разрешающая способность метода составила  $33,1 \pm 4,8\%$ .

### Литература:

- 1 Машковский М.Д. Лекарственные средства: 15-е изд. – М.: ООО «Издательство Новая Волна», 2006. – С. 69.
- 2 Порошина Е.Г. Психофармакотерапия в клинике внутренних болезней // ФАРМиндекс-Практик. – 2004. – Вып. 6. – С. 12-23.

### ТҮЙІН

С.В. БАЮРКА<sup>1</sup>, С.А. КАРПУШИНА<sup>2</sup>,

фармацевтика ғылымдарының кандидаты,  
токсикологиялық химия кафедрасының доценті<sup>1</sup>, химия  
ғылымдарының кандидаты, токсикологиялық химия  
кафедрасының доценті<sup>2</sup>, Ұлттық фармацевтикалық  
университет, Харьков қаласы, Украина

## БИОЛОГИЯЛЫҚ МАТЕРИАЛДАН СУЛЬПИРИДТІ ОҚШАУЛАУДЫҢ ӘДІСТЕРІН ЖЕТІЛДІРУ

Гексан – аценитрил еріткіш жүйесінің көмегімен кейіннен элюаттарды экстракциялық тазалау арқылы оны сусыз натрий сульфатпен ұнтақтау арқылы тінді гомогениздеу жолымен препаратты хлороформ арқылы шығара отырып, биологиялық материалдан сульпиридті оқшаулаудың тиімді әдісі жетілдірілді. Әдістің рұқсат етілген мүмкіндігі  $33,1 \pm 4,8\%$  құрады. Элюаттардағы сульпиридтердің талдауы ЖҚХ, УФ-спектрография және ТЖСХ мультитолқындық УФ-детекторы арқылы жүргізілді.

**Кілт сөздер:** сульпирид, құрама әсері бар психотроптық препарат, ТЖСХ мультитолқындық УФ-детекторы, сульпиридтің жағымсыз әсері.

### SUMMARY

S.V. BAYURKA<sup>1</sup>, S.A. KARPUSHINA<sup>2</sup>,

candidate of pharmaceutical, associate professor of  
chemistry, toxicology<sup>1</sup>, candidate of chemical sciences,  
associate professor of chemistry, toxicology<sup>2</sup>, National  
Pharmaceutical University, Kharkov, Ukraine

## DEVELOPMENT OF SULPIRIDE ISOLATION METHOD FROM THE BIOLOGICAL MATERIAL

The effective methods of sulpiride isolation from the biological material by drug's elution with chloroform from the tissue homogenized by its grinding with anhydrous sodium sulphate followed by the extraction purification of the eluates with the solvent system hexane – acetone-nitrile has been developed. Resolution of the method was  $33,1 \pm 4,8\%$ . The analysis of sulpiride in the eluates was carried out with the help of TLC, UV-spectroscopy, HPLC with multi-wavelength UV detector.

**Keywords:** Sulpiride, the combined effect of psychotropic drug, HPLC with UV detector multivoltinovy, side effects of sulpiride.

- 3 Clark's analysis of Drugs and Poisons: Third edition [Электронный ресурс]. – Электрон. текстовые, граф. дан. – London: Pharmaceutical Press, 2005. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – Загл. с экрана.
- 4 P.P. Rop, M.H. Sournac, I. Elie. Toxicological analysis of sulpiride in a lethal poisoning case // J. Anal. Tox. – 1999. – 23. – P. 294-296.
- 5 F. Bressolle, A. Fauré-Jeantis. Absolute bioavailability, rate of absorption, and dose proportionality of sulpiride in humans // J. Pharm. Sci. – 1992. – 81 (1). – P. 26-32.
- 6 M.C. Huang, H.O. Ho, G.C. Yeh et al. Development of high-performance liquid chromatographic method for bioanalytical applications with sulpiride // J. Chrom. B. – 2001. – 763. – P. 157-163.
- 7 J. Liu, W. Cao, H. Qiu et al. Determination of sulpiride by capillary electrophoresis with end-column electrogenerated chemiluminescence detection // Clin. Chem. – 2002. – 48 (7). – P. 1049-1058.
- 8 Баярка С.В., Карпушина С.А. Аналітична діагностика отруєнь сульпіридом // Клінічна фармація. – 2012. – Т. 16, №4. – С. 39-42.
- 9 Баярка С.В., Болотов В.В., Карпушина С.А. та ін. Діагностика смертельних отруєнь сульпіридом за результатами токсикологічних досліджень // Клінічна фармація. – 2012. – Т. 16, № 2. – С. 27-30.
- 10 Баярка С.В., Болотов В.В., Карпушина С.А. Розробка методів ідентифікації та кількісного визначення сульпіриду, придатних для хіміко-токсикологічного аналізу // Вісник фармації. – 2012. – №3 (71). – С. 36-39.
- 11 S. Jickells, A. Negrusz. Clarke's Analytical Forensic Toxicology – London: Pharmaceutical Press, 2008. – P. 648.
- 12 Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens. – United Nations, New York, 2009. – P. 67.

## БЕЗОПАСНОСТЬ ЛЕКАРСТВ

### О безопасном применении эноксапарина

FDA рекомендует, чтобы медицинские работники тщательно рассматривали вопрос о времени установления спинального катетера и его удаления у пациентов, принимающих антикоагулянты (такие как «Эноксапарин»), и отменяли прием препарата на некоторое время после удаления катетера в целях уменьшения риска кровотечения и последующего развития паралича после эпидуральной анестезии и люмбарной пункции. Эти новые рекомендации будут добавлены в инструкцию антикоагулянтов, известных как гепарины низкомолекулярной массы, включая «Ловенокс», дженерик «Эноксапарин» и подобные продукты.

**Описание.** Эпидуральные и спинальные гематомы – известный риск «Эноксапарина» в условиях спинальных процедур – описаны в инструкции в разделе «Особые указания», подразделе «Предупреждения и меры предосторожности». Однако эти серьезные неблагоприятные явления имеют место быть. Чтобы решить эту проблему, FDA тесно работал с производителем (Sanofi-Aventis) для дальнейшей оценки этого риска и обновления в инструкции раздела «Предупреждения». Инструкции для дженерика «Эноксапарин» также будут исправлены соответственно. Важно отметить, что антикоагулянты несут риск развития спинальной гематомы во время эпидуральной или спинальной анестезии. FDA продолжает оценивать безопасность других антикоагулянтов, чтобы определить необходимость дополнительных изменений в инструкции.

**Рекомендации.** В рамках предпроцедурного списка мероприятий медицинские работники и учреждения, участвующие в выполнении спинальной и эпидуральной анестезии или спинальной биопсии, должны определить, получает ли пациент антикоагулянты, определить дозу «Эноксапарина» и соответствующие сроки. Для уменьшения потенциального риска кровотечения необходимо учитывать дозу и период полувыведения антикоагулянтов.

После проведения процедуры пациент должен сообщить медицинскому работнику о таких симптомах, как онемение, покалывание, слабость, паралич ног или потеря контроля над своим мочевым пузырем или кишечником. Для «Эноксапарина» введение или удаление спинного катетера должно быть отложено, по крайней мере, на 12 часов после введения профилактических доз, которые используются для профилактики тромбоза глубоких вен. Более длительные задержки (24 часа) являются подходящими для пациентов, получающих более высокие терапевтические дозы «Эноксапарина» (1 мг/кг дважды в день или 1,5 мг/кг один раз в день). После процедуры следующая доза «Эноксапарина» должна быть введена не раньше, чем через 4 часа после удаления катетера. Во всех случаях должна учитываться как оценка пользы и риска, так и риск возникновения тромбозов и кровотечения в ходе проведения процедур. Необходимо обращать внимание на состояние пациента.

**Заключение.** FDA информирует о внесении обновлений в инструкцию разделов «Предупреждения» и «Меры предосторожности» «Эноксапарина»:

- Определить, получает ли пациент антикоагулянты, определить дозу, соответствующие сроки.
- Между инъекциями профилактических доз «Эноксапарина» и спинальной анестезией должно пройти не менее 12 часов, для терапевтических доз – не менее 24 часов.
- Следующая доза «Эноксапарина» должна быть сделана не раньше, чем через 4 часа после удаления катетера.



fda.gov