УДК: 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

ВИЗНАЧЕННЯ СУЛЬПІРИДА В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ З МУЛЬТИХВИЛЬОВИМ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИМ ДЕТЕКТУВАННЯМ

Баюрка С.В., Карпушина С.А., Мороз В.П.
Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

Вступ. Сульпірид (5-(Аміносульфоніл)-*N*-[(1-етил-2-пірролідиніл)метил]-2-метоксибензамід) відноситься до групи атипічних нейролептиків. Застосовується в фармакотерапії психічних розладів, а також в загальній медичній практиці для лікування соматичних хвороб, що супроводжуються емоційними, психічними та депресивними розладами. Сульпірид характеризується мінімальними побічними ефектами. Гострі та смертельні отруєння сульпіридом відмічено при надходженні масованих доз зазначеного препарата [4]. Токсична концентрація сульпірида у крові зареєстрована на рівні, вищому, ніж 2 мг/л [2]. Концентрації сульпірида в крові, зареєстровані у різних випадках летальних отруєнь, знаходились в межах 3,9 – 97,3 мг/л [1, 2, 4], в сечі – 803 мг/л [2]. Аналіз сучасних джерел літератури показав, що більшість біоаналітичних методик визначення сульпірида стосується методів ВЕРХ-МС та ВЕРХ-МС/МС [2]. Останні пов'язані з використанням високовартісного обладнання і не завжди доступні для лабораторії.

Мета дослідження. Розробка методик визначення сульпірида в сечі та крові методом обернено-фазної високоефективної рідинної хроматографії з мультихвильовим УФ-спектрофотометричним детектуванням (ВЕРХ-УФД) з використанням рідинно-рідинної екстракції на етапі пробопідготовки.

Методи дослідження. Пробопідготовку було оптимізовано на основі попередніх власних досліджень з вивчення ступеню екстракції сульпірида в залежності від pH водної фази та природи органічного розчинника. З модельних проб біологічних рідин, що містили сульпірид, зазначену лікарську речовину екстрагували етилацетатом при pH 10 – 11. Попередньо проводили видалення біогенних домішок додаванням гексана при pH 1 – 2. При дослідженні крові екстракційній очистці передувало осадження форменних елементів за допомогою 10 % розчину кислоти трихлорацетатної. Отримані екстракти очищували методом ТШХ, використовуючи дві рухомі фази послідовно: хлороформ (біогенні домішки мігрували до лінії фініша, сульпірид залишався на лінії старту) та етилацетат – метанол – 25 % розчин амоній гідроксиду (85:10:5) (R_f = 0,54 ± 0,04). Сульпірид елюювали з хроматографічної пластини метанолом. Хроматографування елюатів проводили на мікроколоночному хроматографі з мультихвильовим УФ-спектрофотометричним детектором. Використовували колонку розміром 2 х 75 мм з оберненою фазою C_{18}; елюент А: 0,2 М перхлорат літію – 0,005 М перхлорна кислота, елюент Б: ацетонітрил, режим елюювання – градієнтний (від 5 % Б до 100 % Б за 4 хв, 100 % Б протягом 3 хв); швидкість подачі елюента 100 мкл/хв; температура термостата колонки 40º С. Детектування проводили при 8 довжинах хвиль: 210, 220, 230,

240, 250, 260, 280, 300 нм. Об'єм проби становив 10 мкл. Кількісне визначення проводили при довжині хвилі 290 нм.

Основні результати. Аналіз сульпірида проводили за уніфікованою методикою в хроматографічній системі, що призначена для ВЕРХ-скринінга лікарських речовин і відповідає базі даних «ВЕРХ-УФ» для хроматографа «Міліхром А-02» (БД-2003-500). Час утримування для сульпіриду становив $t_R = 10,09 \pm 0,06$ хв (RSD = 0,26 %, $\varepsilon = 0,64$ %, P = 95 %, $\nu = 2$); спектральні відношення ($R = S_\lambda/S_{210}$) при зазначених вище довжинах хвиль дорівнювали, відповідно, $0,729 \pm 0,009$; $0,393 \pm 0,003$; $0,354 \pm 0,009$; $0,203 \pm 0,004$; $0,047 \pm 0,003$; $0,044 \pm 0,007$; $0,060 \pm 0,004$. LOD = 0,6 мкг/мл при λ=290 нм ($LOD = 3,3S_a/b$). Кількісне визначення проводили за залежністю площі піку від концентрації (мкг/мл). Градуювальний графік описувався рівнянням $y = (7,74 \cdot 10^{-4} \pm 5 \cdot 10^{-6})x$; r = 0,999; LOQ = 1,8 мкг/мл ($LOQ = 10S_a/b$). Лінійність спостерігали в межах концентрацій сульпірида 2,0 – 100 мкг/мл. Правильність та прецизійність розробленої методики складали 98,9 % (RSD = 1,7 %) на низькому концентраційному рівні, 100,3 % (RSD = 1,1 %) на середньому концентраційному рівні, 100,1 % (RSD = 0,3 %) на високому концентраційному рівні. Ефективність розроблених методик ізолювання досліджуваного препарата з сечі становила 65 ± 3 % ($\varepsilon = 5,0$ %, P = 95 %, $\nu = 4$), з крові – 17 ± 2 % ($\varepsilon = 13,0$ %, P = 95 %, $\nu = 4$)

Висновки. Розроблені ефективні методики ізолювання сульпірида з біологічних рідин методом рідинно-рідинної екстракції, які включають екстракційну та ТШХ-очистки. Встановлено параметри утримування і спектральні характеристики сульпірида, поєднання яких дозволяє провести ідентифікацію препарату методом ВЕРХ з мультихвильовим УФД в умовах токсикологічного скринінга. Розроблена методика кількісного визначення характеризується досить низькими значеннями меж виявлення та кількісного визначення, допустимою лінійністю, правильністю та прецизійністю, що робить її придатною для цілей клінічної токсикології та судово-токсикологічних досліджень [3].

Список літератури

1. Baselt, C. R. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man / Randall C. Baselt. – [9-th ed.]. – Seal Beach, California : Biomedical Publications, 2011. – 1900 p.
2. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material: 4-th edition / A. C. Moffat; M.D. Osselton; B. Widdop [et al.]. – London, Chicago: Pharmaceutical Press, 2011. – 2736 p.
3. 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 Office on Drugs and Crime, Vienna). – New York, 2009. – 67 p.
4. The distribution of Doxepine and Sulpiride in human poisoning death / Z. Wei, K. Xiao, M. Wu [et al.] // Rom. J. Leg. Med. – 2012. – V. 20 (1). – P. 57–60.