



УКРАЇНА

(19) UA (11) 6743 (13) C1

(51) G 01 N 30/90

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ ВІЯВЛЕННЯ ПРОТІАДЕНА В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ

1

(21) 93090925

(22) 08.04.93

(46) 29.12.94. Бюл. № 8-1

(56) 1. L.A.Gifford, P.Turner, C.M.Pare. Sensivite method for the routine determination of tricycle antidepressants in plasma using a specific nitrogen detector. - J. Chromatogr., 1975, v. 105, N 1, p.107-118.

2. Clark's Isolation and Identification of drugs in pharmaceuticals, body, fluids and postmortem material Second Edition Senior Consulting Editor A.C.Moffof. London, 1986, p.572.

(71) Київський науково-дослідний Інститут загальної та судової психіатрії МОЗ України

(72) Оськіна Валентина Миколаївна, Голова Ірина Дмитрівна

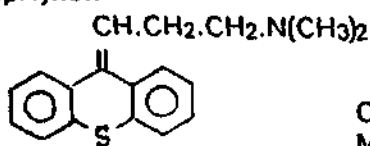
(73) Київський науково-дослідний Інститут загальної та судової психіатрії МОЗ України (UA)

2

(57) Способ определения протиадена в биологических жидкостях, включающий хроматографирование в тонком слое сорбента с использованием подвижной фазы, удаление подвижной фазы, проявление определяемого препарата посредством проявляющего реагента, отличающийся тем, что готовят биологическую пробу с консервантом, экстрагируют протиаден смесью хлороформа с этилацетатом в соотношении 15:5, концентрируют полученный экстракт, после чего проводят хроматографирование в тонком слое силикагеля, причем в качестве подвижной фазы используют смесь ацетон - хлороформ - аммиак в соотношении 24:12:1, затем после удаления подвижной фазы с пластинки осуществляют проявление определяемого препарата хлористым палладием или ацетоновым раствором бромфенолового синего в качестве проявляющих реагентов.

Изобретение относится к аналитической химии и может быть использовано в системе химико-токсикологического анализа биологических проб при количественном определении протиадена методом хроматографии в тонком слое сорбента для лекарственной коррекции во время проведения курса лечения больных.

Протиаден - вещество со структурной формулой


 $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NS} \cdot \text{HCl}$
М.м. 331,9

является психотропным препаратом, который при накоплении в организме обладает токсическим воздействием. Поэтому лечение необходимо проводить под наблюдением и контролем его накопления в организме.

Известен способ определения протиадена с помощью газовой хроматографии, который заключается в выделении n-гексаном исследуемого вещества (протиадена), концентрировании экстракта и хроматографировании с помощью пламенно-ионизационного детектора на фазе ОУ-17 (1).

Однако данный метод требует сложного дорогостоящего оборудования, специальных реактивов импортного производства, а

(19) UA (11) 6743 (13) C1

также специально подготовленных специалистов для обслуживания оборудования.

Наиболее близким по технической сути является способ определения протиадена, описанный Кларком (2), заключающимся в хроматографировании протиадена в тонком слое окиси алюминия, в качестве подвижной фазы используется смесь хлороформ – метанол в соотношении 90:10, удаление подвижной фазы, проявление, при котором в качестве проявляющих реагентов применяются или серная кислота, или реактив Марки или реагент Либермана.

Недостатками этого способа являются: неспецифичность проявляющих реагентов; при применении подвижной фазы хлороформ – метанол в соотношении 90:10 коэкстрактивные вещества мочи мешают определению протиадена в пробе.

Задачей настоящего изобретения является создание такого способа определения протиадена, который за счет подбора совокупности операций, режимов и определенных реагентов позволяет достичь специфичности метода и повысить чувствительность определения.

Поставленная задача решается тем, что в способе определения протиадена в биологических жидкостях, включающим хроматографирование в тонком слое сорбента с использованием подвижной фазы, удаление остатков подвижной фазы, проявление определяемого препарата проявляющим реагентом. Согласно изобретению, готовят биологическую пробу с консервантом, экстрагируют протиаден смесью хлороформа с этилацетатом в соотношении 15:5, концентрируют полученный экстракт, после чего проводят хроматографирование в тонком слое силикагеля, причем в качестве подвижной фазы используют смесь ацетон-хлороформ-аммиак в соотношении 24:12:1, затем после удаления остатков подвижной фазы осуществляют проявление определяемого препарата хлористым палладием или ацетоновым раствором бромфенолового синего в качестве проявляющих реагентов.

Авторами было показано, что совокупность подобранных операций, режимов и соответствующих реагентов, позволили достичь специфичности определения протиадена в биологических жидкостях и повысить чувствительность определения.

Для осуществления данного способа определения протиадена в биологических жидкостях необходимо пробу приготовить с консервантом, в качестве которых используют 5%-ный раствор лимоннокислый натрий или 1–2 капли гепарина. Без добавления

этих веществ в результате анализа отмечено потеря препарата до 30%. Из ряда органических растворителей в качестве экстрагентов выбрана смесь хлороформа с этилацетатом в соотношении 15:5. Этой смесью протиаден извлекается из биологических проб до 95–99%. Для удовлетворительного разделения протиадена и коэкстрактивных веществ подобрана подвижная фаза, состоящая из ацетона, хлороформа и аммиака в соотношении 24:12:1 (по объему). При применении этой системы значение R_f протиадена составляет 0.67 ± 0.05 , коэкстрактивные вещества остаются на старте. В качестве проявляющих реагентов применены 0,02%-ный раствор хлористого палладия или ацетоновый раствор бромфенолового синего с нижним пределом определения 0,5 мкг в анализируемом объеме.

Способ определения протиадена пригоден для различных биологических жидкостей, наиболее информативными объектами являются кровь и моча.

Исследуемые биологические пробы (кровь, моча) отбирают в подготовленную посуду с консервантом для крови или мочи. Пробы экстрагируют смесью хлороформа и этилацетата, полученный экстракт упаривают до объема 0,5 мл. Сконцентрированную пробу наносят на закрепленный слой сорбента и хроматографирование проводят с помощью подвижной фазы смесью ацетона-хлороформа-аммиака (24:12:1). После хроматографирования пластинку высушивают на воздухе до полного удаления остатков органических растворителей. Протиаден проявляют 0,02%-ным раствором хлористого палладия или 0,02 N соляной кислоты или 0,05%-ным ацетоновым раствором бромфенолового синего.

Осуществление способа подтверждается примерами конкретного выполнения.

Пример 1. Для определения протиадена в крови готовят пробу с консервантом. В пробирку, содержащую 0,5 мл 5%-ного раствора лимоннокислого натрия или 1–2 кап ли гепарина и 1–2 капли 10%-ного раствора фтористого натрия, вносят 5 мл цельной крови. Приготовленную пробу крови количественно переносят в делительную воронку и дважды экстрагируют в течение 10 минут смесью хлороформа и этилацетата (15:5). Экстракты объединяют и сушат над безводным сернокислым натрием. Объединенный экстракт сливают в круглодонную колбу и при помощи ротационного испарителя при температуре 55–60°C проводят концентрирование экстракта до объема 0,5 мл. Сконцентрированную пробу количест-

венно наносят на хроматографическую пластинку ВЭТСХ. Параллельно на пластинку наносят стандартные растворы, содержащие протиаден в количестве 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 и 25,0 мкг. Пластинку помещают в хроматографическую камеру с подвижной фазой – хлороформ-ацетон-аммиак (12:24:1). После того, как растворитель поднялся на 10 см, пластинку вынимают и оставляют на воздухе до полного удаления следов растворителя. Для проявления протиадена пластинку обрабатывают 0,02 %-ным раствором хлористого палладия на 0,02 N соляной кислоте. При наличии в пробе протиадена и стандартные растворы на пластинке проявляются пятна окрашенные ярко желтого цвета на белом фоне. Значение R_f протиадена составляет $0,67 \pm 0,05$.

Пример 2. Для определения протиадена в моче в качестве консерванта используют 0,1 N раствор соляной кислоты, добавляя по 15 мл этого консерванта в 50 мл исследуемой пробы мочи. Отобранную пробу с консервантом количественно переносят в делительную воронку и дважды экстрагируют в течение 10 минут смесью хлороформа и этилацетата (15:5). Экстракты сушат над безводным сернокислым натрием и сливают в круглодонную колбу, в которой с помощью ротационного испарителя объединенный экстракт упаривают при температуре 55–60°C до объема 0,5 мл. Сконцентрированную пробу наносят на хроматографическую пластинку ВЭТСХ. Параллельно на пластинку наносят стандартные растворы протиадена, содержащие протиаден в количестве 0,5;

1,0; 5,0; 10,0 и 25,0 мкг. Пластинку помещают в хроматографическую камеру с подвижной фазой ацетон-хлороформ-аммиак (24:12:1). После того, как растворитель поднялся на 10 см, пластинку вынимают и оставляют на воздухе до полного удаления запаха растворителя. Для проявления протиадена пластинку обрабатывают 0,02 %-ным раствором хлористого палладия на 0,02 N соляной кислоте. Стандартные растворы и при наличии протиадена в пробе на пластинке проявляются пятна окрашенные ярко желтого цвета на белом фоне. Значение R_f протиадена составляет $0,67 \pm 0,05$.

Пример 3, 4. Аналогично примеру 1,2 производят все операции: подготовка проб к анализу, концентрирование, хроматографирование в тонком слое силикагеля, высушивание. Проявление осуществляют ацетоновым раствором бромфенолового синего. Стандартные растворы и при наличии протиадена в пробе на пластинке проявляются окрашенные пятна оранжевого цвета. Значение R_f протиадена составляет $0,67 \pm 0,05$. Относительная ошибка определения протиадена в биологических пробах (кровь, моча) составляет 2,33 %. Способ определения протиадена в крови и моче позволяет определить на уровне 0,5 мкг исследуемого соединения в пробе, коэкстрактивные вещества не мешают определению протиадена в биологических пробах. Осуществление способа определения протиадена в биологических пробах не требует сложной аппаратуры, и дорогостоящих импортных реактивов.

Упорядник И. Ленных

Техред М.Моргентал

Коректор М. Куль

Замовлення 642

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Виробничо-видавничий комбінат "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101

