



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

213 017

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 20 08 80
(21) PV 5710-80

(51) Int. Cl.³

C 07 D 409/04

// G 01 N 21/33

(40) Zveřejněno 31 08 81

(45) Vydáno 01 01 84

(75)

Autor vynálezu SVÁTEK EMIL RNDr. CSc., PRAHA

(54) Způsob stanovení chlorothepinu a derivátů

Vynález se týká způsobu stanovení chlorothepinu a derivátů, tj. neuroleptik dibenzo/b,f/thiepinové řady. Využívá se fluorescenční reakce v ultrafialovém světle, kterou poskytuje vzorek zkoumané látky po reakci se zředěnou kyselinou sírovou při teplotě okolo 100 °C. Způsob je použitelný pro stanovení v substanci, v lékových formách a v biologickém materiálu.

Vynález se týká způsobu stanovení chlorothepinu a derivátů, v substanci, v meziproduktech výroby, v lékových formách a v biologickém materiálu.

Pod označením "chlorothepin a deriváty" se v rámci vynálezu rozumějí psychoterapeutika /neuroleptika/ s dibenzo(b,f) thiepinovým skeletem, zejména 8-chlor-10-(1-methyl-piperazino)-10,11-dihydrodibenzo(b,f) thiepin /chlorothepin/, 2-chlor-10-/4-(2-hydroxyethyl) piperazino/10,11-dihydrodibenzo(b,f) thiepin/dechloroxythepin/, 3-fluor-8-isopropyl-10-/4-(2-hydroxyethyl) piperazino/-10,11-dihydrodibenzo(b,f)-thiepin /isofloxythepin/ a jejich metabolity, zejména S-oxidy.

Jednoduchá, citlivá a specifická metoda stanovení chlorothepinu a derivátů nebyla dosud známa. Přitom je například pro úspěšnou a účelnou terapii uvedenými psychofarmaky velice žádoucí, aby byl znám časový průběh jejich vylučování do krve., aby tak mohlo být stanoveno optimální dávkování. Rovněž je potřebný rychlý a citlivý kvalitativní test pro chlorothepin a deriváty v biologickém materiálu, například při podezření z průmyslové otravy a jiných otrav u lidí přicházejících do styku při výrobě i jinde s těmito biologicky velmi účinnými látkami. Tato potřebná stanovení nemohla být dosud prováděna, neboť nebyla k dispozici vhodná metoda.

Tyto nedostatky v analytice významné skupiny léčiv se podařilo odstranit způsobem stanovení chlorothepinu a derivátů podle vynálezu. Tento způsob vychází ze zjištění, že chlorothepin a deriváty poskytují po zahřátí s kyselinou sírovou, popřípadě i chloristou, při ozáření ultrafialovým světlem intenzivní žlutooranžovou fluorescenci, která je časově stálá a jejíž maximum emise leží při vlnové délce 555 ± 5 nm při maximu excitace u 383 ± 5 nm. Intenzita fluorescence chlorothepinu a derivátů je při stanovení způsobem podle vynálezu závislá na koncentraci kyseliny, na době a na teplotě zahřívání.

Podstata způsobu podle vynálezu spočívá tedy v tom, že se nejprve roztok zkoumané látky v kyselině sírové o hmotnostní koncentraci 60 až 75 %, ve směsi s vodou v objemovém poměru 49:1, zahřívá na teplotu 90 až 110 °C, s výhodou na teplotu vroucí vodní lázně, po dobu 15 až 30 min, načež se ozáření ultrafialovým světlem vyvolá žlutooranžová fluorescence o maximu excitace při 383 ± 5 nm a o maximu emise při 555 ± 5 nm, jejíž intenzita se měří a hodnotí, například srovnáním s kalibrační křivkou.

Jsou-li ve vzorku zkoumané látky přítomné S-oxidy, je vhodné odstranit je před vyvoláním fluorescence redukcí, s výhodou zinkovým prachem.

Je zřejmé, že principu způsobu stanovení podle vynálezu lze využít také pro kvalitativní průkaz /test totožnosti/ chlorothepinu a derivátů. Mez postřehu je v tomto případě u chlorothepinu 50 ng v 1 ml /při excitaci se rtuťovou výbojkou s filtrem o 360 nm/.

Modifikovaného způsobu stanovení podle vynálezu lze použít pro detekci chlorothepinu a derivátů po jejich chromatografickém oddělení na tenké vrstvě silikagelu tak, že se deska po ukončení vyvíjení a vysušení postříká rozprašovačem s kyselinou sírovou o koncentraci s výhodou 5 a 10 % obj. a ponechá se v sušárně 5 až 15 min při zvýšené teplotě, s výhodou při 100 °C. Chlorothepin a deriváty se pod ultrafialovým světlem o 366 nm projeví intenzivní žlutooranžovou fluorescencí ostře kontrastující na modrém podkladě desky. Tato modifikace je citlivější než fluorimetrické stanovení uvedených látek v roztoku a pouhým okem lze postřehnout již 2 ng chlorothepinu.

Popsaného způsobu detekce lze použít také při kvantitativním denzitometrickém stanovení chlorothepinu a derivátů po jejich rozdělení na tenké vrstvě silikagelu.

S-oxidy chlorothepinu a derivátů fluorescenční reakcí nejeví. Tato nevýhoda se dá snadno odstranit jejich redukcí na původní látky. Jako redukční činidlo se osvědčil zinkový prach, přidáný v množství 25 až 50 mg na 5 ml roztoku vzorku v kyselině sírové před provedením fluorescenční reakce. Před měřením fluorescence je však nutno roztok vyčistit odstředěním.

Pro vyvolání fluorescenční reakce u S-oxidů chlorothepinu a derivátů po rozdělení na tenké vrstvě, se přidá k detekčnímu činidlu, tj. 5 až 10 % kyselině sírové, před postřikem redukční činidlo, s výhodou jodid draselný, v koncentraci 300 mg na 100 ml kyseliny. V dalším se detekce provede stejně jako u chlorothepinu a derivátů.

Provedením fluorescenční reakce bez přidání a s přidáním redukčního činidla je možno snadno vedle sebe stanovit chlorothepin a deriváty a jejich S-oxidy /v roztoku až do poměru asi 10:1/. Jak je známo, jsou S-oxidy hlavními metabolity neuroleptik s dibenzo (b,f) thiepinovým skeletem. S použitím fluorescenční reakce s přidavkem redukčního činidla lze tedy v biologickém materiálu stanovit souhrn všech známých metabolitů zmíněného typu, čímž se zvýší citlivost při analýze biologického materiálu.

Výjimku při fluorescenční reakci využité při způsobu stanovení podle vynálezu tvoří neuroleptikum oxyprothepin, tj. S-methylthio-10-/-4-(3-hydroxypropyl)piperazino/-10,11-dihydrodibenzo (b,f)thiepin, obsahující v poloze S-methylthioskupinu, která fluorescenční reakci ruší. Potenciální metabolity oxyprothepinu, tj. oxyprothepin-S^S, S^S-dioxid a oxyprothepin-5,S^S, S^S-trioxid však fluorescenční reakci poskytují. Stanovení podle vynálezu ruší také přítomnost fenolické skupiny na kterémkoliv z jader dibenzo/b,f/thiepinového skeletu.

Podrobnosti způsobu stanovení chlorothepinu a derivátů podle vynálezu jsou patrné z následujících příkladů provedení, které tento způsob pouze ilustrují, ale nijak neomezuji.

Příklad 1

Prokazování totožnosti chlorothepinu v substanci /v tabletové hmotě/

Suspenze 5 mg vzorku substance chlorothepinu, popřípadě množství tabletové hmoty odpovídající 5 mg chlorothepinu ve 25 ml 0,1 N kyseliny sírové se nechá 10 min a zfiltruje se. 0,1 ml filtrátu se zahřívá ve zkumavce na vroucí vodní lázni se 4,9 ml kyseliny sírové o $\bar{h}^{20} = 1,60$. Přítomnost dibenzo/b,f/thiepinového skeletu chlorothepinu prokazuje intenzivní žlutooranžová fluorescence při ozáření zkumavky ultrafialovým světlem o vlnové délce 366 nm.

Příklad 2

Stanovení chlorothepinu v tabletách o obsahu 5 mg

Do 100 ml odměrky se převede navážka rozetřené hmoty odpovídající dvěma tabletám, odměrka se doplní 0,1 N kyselinou sírovou po rysku, suspenze se míchá 15 min a poté se filtruje. 10,0 ml filtrátu se doplní na 100 ml 0,1 N kyselinou sírovou. 0,5 ml tohoto roztoku se doplní na 25 ml kyselinou sírovou o $\bar{h}^{20} = 1,60$ a 5 ml této směsi se zahřívá ve zkumavce na vroucí vodní lázni po dobu 30 min. Po ochlazení na teplotu místnosti se v 1 cm květě registruje fluorescenční křivka na spektrofluorimetru v rozmezí excitace od 300 do 400 nm při vlnové délce emise 555 nm /citlivost 100, šíře obou štěrbin 20 nm/. Obsah chlorothepinu ve vzorku se hodnotí metodou základní linie na základě fluorescence standardního roztoku, který se připraví do-

plnění směsí 0,5 ml 0,1 N kyseliny sírové s 5 μ g chlorothepinu na 25 ml kyselinou sírovou o $n^{20}_D = 1,60$ a zahříváním 5 ml této směsi 30 min na vroucí lázni vodní. Obsah chlorothepinu x se vypočítá ze vzorce :

$$x = \frac{I_{vz} \cdot P \cdot 10}{I_{st} \cdot N}, \quad \text{/mg chlorothepinu v 1 tabletě/}$$

kde I_{vz} a I_{st} jsou naměřené intenzity fluorescence vzorku a standardu, P je průměrná hmotnost jedné tablety v mg a N je navážka tabletové hmoty v mg. Chyba metody je = 3 % výsledku.

Příklad 3

Stanovení souhrnu chlorothepinu a jeho metabolitů s dibenzo(b,f) thiepinovým skeletem v krvi nebo séru

K 1 ml krve /séru/ v třepací baňce se přidají 4 ml vody, 0,1 ml konc.čpavkové vody a 10 ml heptanu a směs se třepe 5 min. Po vyčištění se 7,5 ml oddělené heptanové vrstvy třepe 5 min se 3,75 ml směsí 0,5 ml vody doplněné na 25 ml kyselinou sírovou o $n^{20}_D = 1,60$ a po vyčištění se oddělená fáze kyseliny sírové zahřívá ve zkumavce 30 min na vroucí vodní lázni s přidávkou 25 až 50 mg zinkového prachu. Obsah zkumavky se občas promíchá. Po skončení reakce se zkumavka ochladí na teplotu místnosti, roztok se vyčistí odstředěním (5 min při 10⁴g/ a na spektrofotometru se registruje excitační fluorescenční křivka od 300 do 450 nm při konstantní vlnové délce emise u 555 nm, při maximální citlivosti přístroje a při rychlostech registrace 20 mm/min na zapisovači a 240 nm/min na monochromátoru. Výsledek se hodnotí metodou základní linie podle kalibrační křivky sestavené s roztoky obsahujícími 50, 100, 250 a 500 ng chlorothepinu v 0,1 ml 0,1 N kyseliny sírové s přidávkou po 1,9 ml kyseliny sírové o $n^{20}_D = 1,60$ a 25 až 50 mg zinkového prachu a po 30 min zahřívání na vroucí vodní lázni.

Souhrn obsahu chlorothepinu a jeho metabolitů s dibenzo(b,f) thiepinovým skeletem se vyjádří v hodnotě koncentrace chlorothepinu v 1 ml krve /séru/.

Vynechá-li se v tomto postupu redukce zinkovým prachem, stanoví se pouze obsah chlorothepinu včetně jeho metabolitů neobsahujících S-oxidovou skupinu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob stanovení chlorothepinu a derivátů v substanci v meziproduktech výroby, v lékových formách a biologickém materiálu, vyznačující se tím, že se nejprve roztok vzorku zkoumané látky v kyselině sírové o hmotnostní koncentraci 60 až 75 %, ve směsi s vodou v objemovém poměru 19:1, zahřívá na teplotu 90 až 110 °C, s výhodou na teplotu vroucí vodní lázně, po dobu 15 až 30 min, načež se ozářením ultrafialovým světlem vyvolá žlutooranžová fluorescence o maximu excitace při 383 - 5 nm a o maximu emise při 555-5 nm, jejíž intenzita se měří a hodnotí, například srovnáním s kalibrační křivkou.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se ve vzorku zkoumané látky přítomné S-oxidy před vyvoláním fluorescence redukují, s výhodou zinkovým prachem.