

# ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ РІДИН У ЛАБОРАТОРНІЙ ДІАГНОСТИЦІ ОТРУЄНЬ ТРАЗОДОНОМ

*С.В.Баюрка, С.А.Карпушина*

Національний фармацевтичний університет

**Ключові слова:** гетероциклічні антидепресанти; тразодон; біологічні рідини; тонкошарова хроматографія; УФ-спектроскопія; екстракційна фотометрія

Розроблені ефективні методики виділення тразодону з сечі та крові методом рідинно-рідинної екстракції хлороформом із лужного середовища при pH 11-12. Супутні ендогенні домішки з біологічних рідин видаляли екстракцією діетиловим етером з кислого середовища при pH 1-2. Для крові попередньо проводили осадження форменних елементів кислотою хлоридною 10% розчином з наступним центрифугуванням. Ідентифікацію тразодону в отриманих біологічних екстрактах проводили за допомогою кольорових реакцій з кислотою нітратною концентрованою, реактивами Манделіна та Лібермана, тонкошарової хроматографії з використанням рухомих фаз: хлороформ і метанол — амонію гідроксид 25% розчин (100:1,5) (послідовно) (проявники: УФ-світло та реактив Драгендорфа у модифікації за Мунье;  $R_f = 0,60 \pm 0,02$ ), УФ-спектроскопії після елюювання препарату з фореграм метанолом ( $\lambda_{max} 247 \pm 2$ ,  $274 \pm 2$  та  $310 \pm 2$  нм). Кількісний вміст препарату в екстрактах встановлювали екстракційно-фотоелектроколориметричним методом за реакцією утворення іонного асоціату з кислотним азобарвником метиловим оранжевим. Розроблені методики дозволили виділити з сечі  $77,9 \pm 4,0\%$ , а з крові —  $34,7 \pm 4,2\%$  тразодону.

З більшення кількості хворих з депресивними порушеннями чинить все більший вплив на соціально-психологічні та економічні аспекти життя і здоров'я суспільства. За літературними даними [2], депресивні стани спостерігаються у 20-40% хворих у загальній медичній практиці. Основним методом лікування депресій у теперішній час є фармакотерапія [2, 3]. Затяжний перебіг та хроніфікація цієї хвороби, а також високий суїциdalний ризик обумовили те, що отруєння антидепресантами посідають одне з перших місць серед загальної кількості отруєнь лікарськими засобами [6, 8, 10, 13]. Найбільш небезпечним є передозування трициклічними та гетероциклічними антидепресантами [6, 15]. При цьому клінічна картина зазначених отруєнь супроводжу-

ється аритмією, судомами, гіпотензією та гіпертермією і є нехарактерною [3, 5, 6, 15]. Тому важливе значення в лабораторній експрес-діагностиці отруєнь антидепресантами мають результати хіміко-токсикологічного дослідження біологічних рідин на вміст у них токсичної речовини.

Тразодон — 2-[3-[4-(3-хлорфеніл)-1-піперазиніл]пропіл]-1,2,4-триазоло[4,3-*a*]піridин-3(2H)-ону гідрохлорид, біциклічний антидепресант, який знайшов широке застосування в сучасній терапії депресій [3]. Тразодон неодноразово був причиною гострих та смертельних отруєнь [11, 12, 14]. При цьому летальні дози тразодону знаходились у межах 2-4 г регос, смертельні концентрації препарату в крові — 9-33 мг/л.

Запропоновані методики визначення тразодону у лікарських

формах та сечі методом міцелярної рідинної хроматографії з флюориметричним детектуванням [7], у плазмі крові — з використанням високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) після твердофазної екстракції з сироватки у комбінації з мас-спектрометрією (МС) з електророзпилювальною іонізацією [16]. Розроблена методика аналізу антидепресантів, у тому числі тразодону, в плазмі крові методом on-line: твердофазна екстракція — рідинна хроматографія — тандемна мас-спектрометрія (ТФЕ - РХ — МС / МС) [9]. Наведені методики характеризуються високою чутливістю та селективністю, але потребують реельної пробопідготовки та спеціального коштовного обладнання і здебільшого недоступні.

Метою наших досліджень було розроблення методики виділення тразодону з крові та сечі за допомогою рідинно-рідинної екстракції з подальшим виявленням та кількісним визначенням анти-

депресанта в отриманих екстрактах з використанням простих та доступних методів хіміко-токсикологічного аналізу: хімічного, тонкошарової хроматографії (ТШХ), УФ-спектроскопії, екстракційної фотоелектроколориметрії [1,4].

### **Матеріали та методи**

**Методика ізолявання тразодону з сечі.** До 50 мл сечі людини додавали від 200 до 1000 мкг тразодону і суміш залишали на 24 год. Паралельно ставили "холості" досліди. Після цього до проб сечі додавали кислоту хлоридну 10% розчин до одержання pH 1-2 і суміші двічі збовтували з 15 мл діетилового ефіру для відокремлення супутніх домішок з біологічної рідини. Шар органічного розчинника відкидали. Потім до підкисленої сечі додавали натрію гідроксиду 20% розчин до pH 11-12 і тричі екстрагували тразодон хлороформом по 15 мл кожного разу. Емульсії, якщо вони утворювались, руйнували центрифугуванням протягом 15 хв зі швидкістю 3000 об./хв. Центрифугат фільтрували через паперовий фільтр з 0,5 г безводного натрію сульфату у мірну колбу об'ємом 50 мл і доводили до позначки хлороформом.

Тразодон, виділений з сечі та крові, виявляли за допомогою кольорових реакцій, ТШХ та УФ-спектроскопії.

Для тразодону характерні кольорові реакції з кислотою нітратною концентрованою (жовте забарвлення; чутливість — 2,0 мкг препарату в пробі), реактивами Манделіна (жовте забарвлення, яке переходить у фіолетове; чутливість — 5,0 мкг препарату в пробі) та Лібермана (фіолетове забарвлення, що зникає; чутливість — 3,0 мкг препарату в пробі). Паралельно проводили контрольні досліди зі стандартним розчином тразодону в хлороформі (10 мкг/мл) та витяжкою з "холостого" досліду.

Для хроматографічного виявлення тразодону використовували хроматографічні пластинки Merck (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, розмір 10x20 см). Відбирали 5-15 мл хлороформної витяжки, органічний розчинник випаровували до мінімального об'єму (0,05 мл) і наносили в одну точку на лінію старту хроматографічної пластинки. На відстані 2 см від вказаної точки наносили розчин "свідка" тразодону (5 мкг у пробі). У третю точку наносили 5 мл випареної витяжки, одержаної у "холостому" досліді. Хроматограми розвивали послідовно з використанням двох рухомих фаз: хлороформ і метанол — амонію гідроксид 25% розчин (100:1,5) (послідовно). Плями тразодону на хроматографічних пластинках детектували за блакитною флюоресценцією в УФ-світлі (чутливість — 1,0 мкг препарату в пробі) та за допомогою реактиву Драгендорфа у модифікації за Мунье (оранжевий колір плям препарату на жовтому фоні; чутливість — 1,0 мкг

тразодону в пробі). Плями тразодону, виділеного з печінки, та тразодону-“свідка” співпадали за величинами Rf і становили 0,60±0,02. Витяжки, отримані з "холостих" дослідів, не давали плям із вказаними значеннями Rf.

УФ-спектроскопічне виявлення тразодону проводили в елюатах з хроматограм. Для цього з непроявленої смуги хроматограми на рівні, що відповідав місцю знаходження плями "свідка" тразодону, знімали шар сорбенту, який двічі збовтували з метанолом та фільтрували. Ступінь елюювання тразодону при цьому становила 97,8±1,0%. Отриманий елюат випаровували, сухий залишок розчиняли в 4 мл кислоти хлоридної 0,1 М розчині. Як розчин порівняння використовували кислоту хлоридну 0,1 М розчин. УФ-спектр елюату був аналогічним спектру стандартного розчину тразодону в кислоті хлоридній 0,1 М розчині та мав три смуги поглинання при довжині хвиль 247±2, 274±2 та 310±2 нм.

Для кількісного визначення тразодону у витяжках використовували екстракційну фотоелектроколориметрію з метиловим оранжевим. Вміст препарату в екстрактах розраховували за допомогою градуювального графіка.

Градуювальний графік будували з використанням стандартного розчину тразодону у воді, який містив 100 мкг препарату в 1 мл. У ділильні лійки вносили по 5 мл ацетатного буферного розчину з pH 4,6, по 5 мл метилового оранжевого 0,05% розчину і додавали по 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,2 та 1,5 мл стандартного розчину тразодону та додавали по 15 мл хлороформу. Суміш у ділильних лійках збовтували протягом 5 хв за допомогою апарату для струшування рідин і залишали на 10 хв для розділення фаз. Збиравали по 14 мл хлороформних витяжок, відкидаючи їх перші порції (блізько 1 мл), до яких додавали по 2 мл кислоти сульфатної 1% розчину в абсолютному етанолі.

Оптичну густину отриманих розчинів, забарвлених у червоний

Таблиця 1

**Результати кількісного визначення тразодону, виділеного з сечі, екстракційно-фотометричним методом (середнє з п'яти визначень)**

Додано тразодону до 50 мл сечі, мкг	Виділено тразодону		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
200	163,0	81,5	
300	228,6	76,2	
500	390,5	78,1	
700	513,8	73,4	
1000	804,0	80,4	$\bar{X} = 77,9$ $S = 3,3$ $S_{\bar{X}} = 1,5$ $\Delta X = 4,0$ $\varepsilon = 5,2$ $\bar{X} \pm \Delta X = 77,9 \pm 4,0$

Таблиця 2

**Результати кількісного визначення тразодону, виділеного з крові, екстракційно-фотометричним методом (середнє з п'яти визначень)**

Додано тразодону до 10 мл крові, мкг	Виділено тразодону		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
100	34,0	34,0	
200	80,2	40,1	
300	105,6	35,2	
400	124,8	31,2	
500	165,0	33,0	$\bar{X} = 34,7$ $S = 3,4$ $S_{\bar{X}} = 1,5$ $\Delta X = 4,2$ $\varepsilon = 12,0$ $\bar{X} \pm \Delta X = 34,7 \pm 4,2$

колір, вимірювали за допомогою фотоелектроколориметра КФК-2 (світлофільтр зелений з  $\lambda_{\text{ef}}=540 \pm 10$  нм; кювета з товщиною шару рідини 10 мм). Як розчини порівняння використовували "холості" досліди (метиловий оранжевий не екстрагується хлороформом у інтервалі pH від 3 до 7).

Світлопоглинання забарвлених розчинів підлягало закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 10 до 150 мкг тра-

зодону в 14 мл кінцевого об'єму. Відносна помилка кількісного визначення не перевищувала 1,05%.

### Результати та їх обговорення

У ході розробки методик виділення тразодону з сечі та крові було встановлено необхідність переднього видалення супутніх речовин з біологічних рідин, для чого білкові домішки осаджували додаванням кислоти хлоридної 10%

розчину з наступним центрифугуванням (кров) та екстрагували залишки супутніх речовин діетиловим ефіром з кислого середовища (кров, сеча). У разі відсутності етапу очищення при ізолюванні тразодону з крові та сечі під час екстракції препарату органічними розчинниками з лужного середовища утворювались стійкі емульсії.

Застосовані нами кольорові реакції, методи ТШХ та УФ-спектроскопії (останній після додаткового хроматографічного очищення) виявилися досить чутливими для виявлення досліджених нами меж концентрацій тразодону в біологічних рідинах.

Результати кількісних визначень тразодону, виділеного з сечі та крові, наведені у табл. 1, 2. Як видно, за допомогою запропонованої методики рідинно-рідинної екстракції з лужного середовища хлороформом з сечі можна виділити  $77,9 \pm 4,0\%$  тразодону, з крові —  $34,7 \pm 4,2\%$  зазначеного антидепресанта.

### ВИСНОВКИ

1. Розроблені ефективні методики рідинно-рідинної екстракції тразодону з біологічних рідин хлороформом з лужного середовища, що дозволяє виділити з сечі  $77,9 \pm 4,0\%$ , а з крові —  $34,7 \pm 4,2\%$  зазначеного антидепресанта.

2. Доведена можливість використання кольорових реакцій, ТШХ, УФ-спектроскопії, екстракційної фотометрії для виявлення та кількісного визначення тразодону в екстрактах з біологічних рідин.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Вергейчик Т.Х. Токсикологическая химия. — М.: МЕДпресс-информ, 2009. — 400 с.
2. Крылов В.И. //ФАРМіндекс-Практик. — 2003. — Вып. 5 — С. 22-32.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства: 15-е изд. — М.: ООО "Изд-во Новая Волна", 2006. — С. 90-109.
4. Плетенева Т.В., Саломатин Е.М., Сыроежкин А.В. и др. Токсикологическая химия: Учеб. для вузов. — М.: ТЭОТАР-Медиа, 2005. — 512 с.
5. Элленхорн М.Дж. Медицинская токсикология: Диагностика и лечение отравлений у человека. В 2-х т. / Пер. с англ. — М.: Медицина, 2003. — Т. 1. — С. 647-697.
6. Bateman N.D. Antidepressants: Poisonous substances. — Amsterdam: Elsevier, 2007. — P. 587-589.
7. Carda-Broch S., Gil-Augusti M.T., Monferrer-Pons Ll. et al. //J. Chrom. A. — 2007. — №1156. — P. 254-258.
8. Carson H.J. //J. Leg. Med. — 2007. — Vol. XXX. — P. 1-4.

9. Castro A., Fernandez M.d.M.R., Laloup M. et al. //J. Chromatogr. A. — 2007. — Vol. 1160, №1. — P. 3-12.
10. Cheeta S., Schifano F., Oyefeso A. et al. //Brit. J. Psychiatry. — 2004. — №184. — P. 41-47.
11. Clark's analysis of Drugs and Poisons: 3-rd 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.
12. Goeringer K.E. //J. Forens. Sci. — 2000. — Vol. 45. — P. 850-856.
13. Isbister G.K., Bowe S.J., Dawson A. et al. //J. Toxicol. Clin. Toxicol. — 2004. — №42. — P. 277-285.
14. Martin A., Pounder D.J. //Forens. Sci. Int. — 1992. — Vol. 56. — P. 201-207.
15. Poisoning & Drug Overdose. Fourth Edition / Edited by Kent R.Olson. — Zange Medical Books, Mc Graw-Hill, 2004. — P. 88-93.
16. Shinozuka T., Terada M., Tanaka E. //Forens. Sci. Int. — 2006. — №162. — P. 108-112.

Адреса для листування: 61168, м. Харків,  
бул. Блюхера, 4. Тел. (572) 67-91-92.  
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 29.12.2009 р.