

Рекомендована д.х.н., професором В.В.Болотовим

УДК 615.065:547.728.54.061/062]001.8

## ІЗОЛЮВАННЯ ПІРАЗИДОЛУ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ АМФІПРОТОННИМИ РОЗЧИННИКАМИ

С.В.Баюрка, С.А.Карпушина, В.І.Степаненко

Національний фармацевтичний університет

Вивчена роздільна здатність відносно піразидолу загальноприйнятих у судово-токсикологічному аналізі методів ізолювання лікарських речовин настоюванням з амфіпротонними розчинниками. Показано, що методом О.О.Васильєвої з біологічного матеріалу можна виділити  $7,14 \pm 0,83\%$ , за Стасом-Отто —  $14,64 \pm 1,24\%$ , за В.П.Крамаренком —  $12,52 \pm 0,97\%$  піразидолу. Виявлення та кількісне визначення піразидолу в екстрактах проводили методами тонкошарової хроматографії, УФ-спектроскопії, екстракційної фотометрії після додаткового очищення витяжок від супутніх домішок за допомогою методів екстракції та ТШХ. Для екстракційно-фотометричного визначення використовували реакцію утворення іонного асоціату піразидолу з кислотним азобарвником метиловим оранжевим. Світлопоглинання забарвлених розчинів підлягало закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 5 до 120 мкг піразидолу в 14 мл кінцевого об'єму. Відносна помилка кількісного визначення не перевищувала 2,8%. Отримані результати можуть бути використані для судово-токсикологічних досліджень біологічного матеріалу при смертельних отруєннях піразидолом.

Піразидол (2,3,3а,4,5,6-гексагідро-8-метил-1Н-піразино-[3,2,1-j,k]-карбазолу гідрохлорид) є представником нового оригінального класу чотирициклічних антидепресивних засобів — похідних піразинокарбазолу [3, 5, 6]. За механізмом фармакологічної дії піразидол належить до другого покоління інгібіторів моноамінооксидази (МАО) — селективних зворотних інгібіторів МАО-А [1, 6].

Піразидол поєднує тимоаналептичний ефект з регулюючим впливом на ЦНС: проявляє активуючу дію у хворих з депресією та седативну — у хворих з ажитованим станом. Особливості фармакологічної дії піразидолу обумовлюють його широке застосування у медичній практиці для лікування депресій різного походження, алкогольної абстиненції, хвороби Альцгеймера та ін.

Останнім часом зареєстровані неодноразові випадки смертельних отруєнь антидепресантами [7, 8, 11], більшість з яких є комбінованими та згадується у зв'язку з прийомом декількох антидепресантів [9], транквілізаторів, нейролептиків та інших психотропних речовин [8, 9].

Таким чином, розробка методів хіміко-токсикологічного аналізу піразидолу в біологічних об'єктах є актуальною задачею.

Запропоновано методику визначення піразидолу в плазмі крові методом високоефективної рідинної хроматографії з флуориметричним детектуванням [10]. Наведені в літературі дані [2] по визначенню піразидолу в біологічному матеріалі з використанням загальноприйнятих амфіпротонних розчинників (підкисленої води та підкисленого етанолу) потребують систематизації, так як зазначені методики дещо модифіковані, що робить проблематичним їх використання у схемі ненаправленого судово-токсикологічного аналізу. Зокрема, як органічний екстрагент піразидолу з водно-спиртових витяжок використовується не хлороформ, а дихлоретан, який до того ж є високотоксичною речовиною.

Таким чином, метою наших досліджень було встановлення роздільної здатності відносно піразидолу загальноприйнятих у судово-токсикологічному аналізі методів ізолювання лікарських сполук з біологічного матеріалу [4]: екстракцією водою, підкисленою кислотою оксалатною (метод О.О.Васильєвої), екстракцією етанолом, підкисленим кислотою оксалатною (метод Стаса-Отто), екстракцією азотовмісних органічних основ водою, підкисленою кислотою сульфатною (метод В.П.Крамаренка). Виявлення та кількісне визначення піразидолу в отриманих екстрактах з біологічного матеріалу проводили за допомогою тонкошарової хроматографії (ТШХ), УФ-спектроскопії, екстракційної фотометрії.

### Матеріали та методи

Подрібнену печінку людини (20 г), яка загинула від травми, вмішували у склянку, додавали 2 мл водного розчину піразидолу, який містив 2000 мкг

препарату. Суміш ретельно перемішували і залишали на 24 год. Паралельно ставили “холості” досліди з біологічним матеріалом. Ізолювання піразидолу проводили водою та етанолом, підкислених кислотою оксалатною, а також водою, підкисленою кислотою сульфатною, згідно з загальноприйнятими методиками [4].

Отримані хлороформні витяжки переносили до мірної колби на 50 мл та доводили об'єм екстракту до позначки хлороформом.

Витяжки, отримані з біологічного матеріалу, містили супутні домішки, які заважали подальшому виявленню та кількісному визначенню піразидолу. Співекстрактивні речовини видаляли за допомогою методу екстракції. Для цього витяжки переносили до фарфорової чашки, органічний розчинник випаровували на водяній бані (температура не вище 40°C). Потім до сухого залишку додавали 20 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної, вміст чашки ретельно перемішували, переносили до ділильної лійки і кислий розчин тричі збовтували з діетиловим ефіром по 10 мл кожного разу. Фазу органічного розчинника відкидали, а кислий водний залишок підлугували амонію гідроксиду 25% розчином до рН 10-11 і тричі екстрагували піразидол хлороформом (по 10 мл). Екстракти пропускали через паперовий фільтр з 0,5 г безводного натрію сульфату та збирали у мірну колбу об'ємом 50 мл, доводячи до позначки хлороформом.

Після додаткового екстракційного очищення оптична густина розчинів, отриманих для “холостих” дослідів, при проведенні кількісного визначення піразидолу екстракційно-фотометричним методом з метиловим оранжевим, знаходилась у межах 0,025-0,04.

Для хроматографічного виявлення піразидолу використовували хроматографічні пластинки Merck (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, розмір 10×20 см). Відбирали 10-20 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” піразидолу (10 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 хлороформ — метанол (90:10) або хлороформ і метанол — амонію гідроксид 25% розчин (100:1,5). Плями піразидолу на хроматографічних пластинках детектували за допомогою реактиву Драгендорфа у модифікації за Мунье (оранжевий колір плям препарату на жовтому фоні; чутливість виявлення піразидолу складала 8,0 мкг препарату у пробі). Плями піразидолу, виділеного з печінки, та піразидолу-“свідка” співпадали за величинами R<sub>f</sub> та становили у рухомій фазі хлороформ — метанол (90:10) 0,45±0,02 та метанол — амонію

гідроксиду 25% розчин (100:1,5) 0,55±0,02. Витяжки, отримані з “холостих” дослідів, не давали плям з вказаними значеннями R<sub>f</sub>.

УФ-спектроскопічне виявлення піразидолу проводили в елюатах з хроматограм. З не проявленої смуги хроматограми на рівні, що відповідав місцю знаходження плями “свідка” піразидолу, знімали шар сорбенту, який двічі збовтували з метанолом та фільтрували. Отриманий елюат випаровували, сухий залишок розчиняли в 4 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної. Як розчин порівняння використовували кислоту хлоридну 0,1 М розчин. УФ-спектр елюату був аналогічним спектру стандартного розчину піразидолу в 0,1 М кислоті хлоридній та мав дві смуги поглинання при довжині хвиль 228±2 нм та 276±2 нм. Для кількісного визначення піразидолу у витяжках використовували екстракційну фотометрію з метиловим оранжевим. Вміст препарату в екстрактах розраховували за допомогою градуувального графіка.

Градуувальний графік будували з використанням стандартного розчину піразидолу у воді, що містив 100 мкг препарату в 1 мл. У ділильні лійки вносили по 5 мл ацетатного буферного розчину з рН 4,6, по 5 мл 0,05% розчину метилового оранжевого і додавали по 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 та 1,2 мл стандартного розчину піразидолу 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. Збирали по 14 мл хлороформних витяжок, відкидаючи їх перші порції (близько 1 мл), до яких додавали по 2 мл 1% розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі.

Оптичну гуστину отриманих розчинів, забарвлених у червоний 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 в інтервалі рН від 3 до 7).

Світлопоглинання забарвлених розчинів підлягало закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 5 до 120 мкг флуоксетину в 14 мл кінцевого об'єму. Відносна помилка кількісного визначення не перевищувала 2,8%.

#### Результати та їх обговорення

При використанні загальноприйнятих у судово-токсикологічному аналізі методів ізолювання лікарських речовин з біологічного матеріалу відносно піразидолу показано, що отримані біологічні екстракти потребують додаткового очищення від співекстрактивних речовин, присутність яких заважала подальшому виявленню та кількісному визначенню досліджуваного препарату. Так, результати вимірювань показників оптичної

Таблиця

Результати екстракційно-фотометричного визначення піразидолу, виділеного з печінки за методами О.О.Васильєвої, Стаса-Отто, В.П.Крамаренка (середнє з п'яти визначень)

Метод ізолювання	Додано піразидолу до 20 г печінки, мкг	Виділено піразидолу		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
Настоювання з водою, підкисленою кислотою оксалатною (метод О.О.Васильєвої)	2000	132,0	6,6	$\bar{X}=7,14$ $S=0,68$ $S_{\bar{X}}=0,30$ $\Delta X=0,83$ $\varepsilon=11,62$ $\bar{X}\pm\Delta X=7,14\pm 0,83$
		148,0	7,4	
		164,0	8,2	
		130,0	6,5	
		140,0	7,0	
Настоювання з етанолом, підкисленим кислотою оксалатною (метод Стаса-Отто)	2000	266,0	13,3	$\bar{X}=14,64$ $S=1,01$ $S_{\bar{X}}=0,45$ $\Delta X=1,24$ $\varepsilon=8,53$ $\bar{X}\pm\Delta X=14,64\pm 1,24$
		282,0	14,1	
		306,0	15,3	
		292,0	14,6	
		318,0	15,9	
Настоювання з водою, підкисленою кислотою сульфатною (метод В.П.Крамаренка)	2000	230,0	11,5	$\bar{X}=12,52$ $S=0,79$ $S_{\bar{X}}=0,35$ $\Delta X=0,97$ $\varepsilon=7,74$ $\bar{X}\pm\Delta X=12,52\pm 0,97$
		264,0	13,2	
		266,0	13,3	
		254,0	12,7	
		238,0	11,9	

густини отриманих розчинів екстракційно-фотометричним методом з метиловим оранжевим для екстрактів з "холостих" дослідів без очищення становили 0,11-0,14 (за методом О.О.Васильєвої); 0,22-0,35 (за методом Стаса-Отто); 0,045-0,16 (за методом В.П.Крамаренка).

Додаткове очищення витяжок проводили методом екстракції, як описано вище. Отримані таким чином очищені екстракти використовували для подальшого їх аналізу на вміст піразидолу методами ТШХ та екстракційної фотометрії. УФ-спектроскопічне дослідження потребувало більш ретельного видалення домішок, яке проводили сполученням екстракційного методу з ТШХ-очищенням.

Результати вимірювань показників оптичної густини екстракційно-фотометричним методом у розчинах, отриманих для "холостих" дослідів, після очищення становили 0,01-0,02 (за методом О.О.Васильєвої), 0,025-0,04 (за методом Стаса-

Отто), 0,025-0,035 (за методом В.П.Крамаренка) в області спектра, що відповідала максимуму світлопоглинання забарвлених розчинів іонних асоціатів піразидолу з метиловим оранжевим.

Як видно, за допомогою загальних методів ізолювання О.О.Васильєвої, Стаса-Отто, В.П.Крамаренка з печінки можна виділити, відповідно,  $7,14\pm 0,83\%$ ,  $14,64\pm 1,24\%$ ,  $12,52\pm 0,97\%$  піразидолу.

#### ВИСНОВКИ

Вивчено роздільну здатність відносно піразидолу загальноприйнятих в судово-токсикологічному аналізі методів ізолювання амфіпротонними розчинниками за О.О.Васильєвою, Стасом-Отто, В.П.Крамаренком, які дозволили виділити, відповідно,  $7,14\pm 0,83\%$ ,  $14,64\pm 1,24\%$ ,  $12,52\pm 0,97\%$  піразидолу.

Одержані результати можуть бути використані для судово-токсикологічних досліджень біологічного матеріалу при смертельних отруєннях піразидолом.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Андреева Н.И., Асина В.В., Либерман С.С. // Хим.-фарм. журн. — 2000. — Т. 34, №9. — С. 12-17.
2. Борисова І.В., Попова В.І. // Фарм. журн. — 1990. — №1. — С. 59-60.
3. Компендиум 2008 — лекарственные препараты: В 2-х т. / Под ред. В.Н.Коваленко, А.П.Викторова. — К.: МОРИОН, 2008. — Т. 2. — С. 196-197.
4. Крамаренко В.П. Токсикологічна хімія. — К.: Вища шк., 1995. — 423 с.
5. Лекарственные препараты Украины. 1999-2000: В 3-х т. / Р.В.Богатырева, А.Ф.Возианов, Ю.П.Сниженко и др. — Х.: Прапор; Изд-во УкрФА, 1999. — Т. 2. — С. 315-317.
6. Машковский М.Д. Лекарственные средства: 15-е изд. — М.: ООО "Изд-во Новая Волна", 2006. — С. 94-95.

7. Bateman N.D. *Antidepressants: Poisonous substances*. — Amsterdam: Elsevier, 2007. — P. 587-589.
8. Carson H.J. // *J. Leg. Med.* — 2007. — Vol. XXX. — P. 1-4.
9. Cheeta S., Schifano F., Oyefeso A. et al. // *Brit. J. Psychiatry*. — 2004. — №184. — P. 41-47.
10. Chiap P., Ceccato A., Gora R. et al. // *J. Pharm. and Biomed. Anal.* — 2002. — Vol. 27, №3-4. — P. 447-455.
11. Isbister G.K., Bowe S.J., Dawson A. et al. // *J. Clin. Toxicol.* — 2004. — №42. — P. 277-285.

---

УДК 615.065:547.728.54.061/062]001.8

ИЗОЛИРОВАНИЕ ПИРАЗИДОЛА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА АМФИПРОТОННЫМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ

С.В.Баюрка, С.А.Карпушина, В.И.Степаненко

Изучена разрешающая способность относительно пиразидола общепринятых в судебно-токсикологическом анализе методов изолирования лекарственных веществ настаиванием с амфипротонными растворителями. Показано, что по методу А.А.Васильевой из биологического материала можно выделить  $7,14 \pm 0,83\%$ , по Стасу-Отто —  $14,64 \pm 1,24\%$ , по В.Ф.Крамаренко —  $12,52 \pm 0,97\%$  пиразидола. Обнаружение и количественное определение пиразидола в экстрактах проводили методами тонкослойной хроматографии, УФ-спектроскопии, экстракционной фотометрии после дополнительной очистки вытяжек от сопутствующих примесей с помощью методов экстракции и ТСХ. Для экстракционно-фотометрического определения использовали реакцию образования ионного ассоциата пиразидола с кислотным азокрасителем метиловым оранжевым. Светопоглощение окрашенных растворов подчинялось закону Бугера-Ламберта-Бера в пределах концентраций от 5 до 120 мкг пиразидола в 14 мл конечного объема. Относительная ошибка количественного определения не превышала 2,8%. Полученные результаты могут быть использованы для судебно-токсикологических исследований биологического материала при смертельных отравлениях пиразидолом.

---

UDC 615.065:547.728.54.061/062]001.8

ISOLATION OF PYRAZIDOL FROM THE BIOLOGICAL MATERIAL BY AMPHIPROTONIC SOLVENTS

S.V.Bayurka, S.A.Karpushina, V.I.Stepanenko

The resolution of the isolation methods of medicinal substances generally accepted in forensic-toxicological analysis by infusion with amphiprotonic solvents has been studied with regard to pyrazidol. It has been shown that methods by O.O.Vasilyeva allowed to separate  $7.14 \pm 0.83\%$ , by Stas-Otto —  $14.64 \pm 1.24\%$ , by V.F.Kramarenko —  $12.52 \pm 0.97\%$  of pyrazidol. Detection and the quantitative determination of pyrazidol in the extracts was carried out by the methods of Thin Layer Chromatography, UV-spectroscopy, extraction photometry after the additional purification of the extracts from concomitant admixtures by means of back extraction and TLC. The reaction of ionic associate formation of pyrazidol with methyl orange, the acidic azodye, was used for the extraction photometry determination. Absorbance of the coloured solutions was subjected to the law of Bouguer-Lambert-Beer within the concentration range of 5-120  $\mu\text{g}$  of pyrazidol in 14 ml of the final volume. The relative error of the quantitative determination did not exceed 2.8%. The results obtained may be used for forensic-toxicological examinations of the biological material in mortal pyrazidol poisonings.