

ВИКОРИСТАННЯ ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ У ДІАГНОСТИЦІ СМЕРТЕЛЬНИХ ОТРУЄНЬ ПІРАЗИДОЛОМ

С.В.Баюрка, С.А.Карпушина, В.С.Бондар

Національний фармацевтичний університет

Ключові слова: поліциклічні антидепресанти; піразидол; ізолювання з біологічного матеріалу; апротонні розчинники; тонкошарова хроматографія; УФ-спектроскопія; екстракційна фотоелектроколориметрія

Встановлено ступінь ізолювання піразидолу з біологічного матеріалу настоюванням з ацетонітрилом (методом С shedзінські I.) та ацетоном (методом Карташова В.А.), що становило, відповідно, $24,58 \pm 2,13\%$ та $13,56 \pm 1,30\%$ піразидолу. Показана можливість використання кольорових експрес-тестів, ТШХ, УФ-спектроскопії для виявлення піразидолу у витяжках з біологічного матеріалу після додаткової очистки отриманих екстрактів від супутніх домішок за допомогою методів екстракції та ТШХ. Додаткове екстракційне очищення проводили діетиловим етером з кислого середовища ($pH 2-3$). При хроматографічному очищенні супутні домішки відокремлювали від досліджуваної речовини з використанням хлороформу як рухомої фази з наступним елююванням піразидолу з хроматографічної пластиинки метанолом. Кількісне визначення препарату в екстрактах проводили екстракційно-фотоелектроколориметричним методом реакцією утворення іонного асоціату 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 2,7%.

Хіміко-токсикологічне дослідження біологічного матеріалу на вміст у ньому токсичних речовин має важливе значення для підтвердження результатів патоморфологічної діагностики отруєнь, картина яких є нехарактерною [3, 13, 18, 20, 21].

Достовірність результатів хіміко-токсикологічного аналізу визначається, насамперед, чутливістю та специфічністю методів визначення отруйних речовин, а також ефективністю методу ізолювання, що використовується для виділення речовини з біологічного об'єкту. Застосування таких доступних та поширеніх у практиці хіміко-токсикологічного аналізу методів як кольорові експрес-тести, тонкошарова хроматографія (ТШХ), УФ-спектроскопія є доцільним у тому випадку, коли метод ізолювання забезпечує виділення достатньої кілько-

сті отруйної речовини з досліджуваного об'єкту [3, 9, 10, 18].

Класичні методи ізолювання лікарських речовин [3, 5], які передбачають використання підкисленої води (методи Васильєвої О.О., Крамаренка В.П.), або підкисленого етанолу (метод Стаса-Отто), є не завжди ефективними [4, 11].

Великий інтерес як екстрагенти "лікарських" отрут з біологічного матеріалу мають апротонні розчинники, які легко проникають крізь гідрофільні та гідрофобні ділянки мембрани клітин біологічного об'єкту і тим самим сприяють більш ефективній екстракції досліджуваних отруйних речовин з внутрішніх органів [4]. Ізолювання "лікарських" отрут такими апротонними розчинниками як ацетонітрил (методом Сhedzінські I. [22]) та ацетон (методом Карташова В.А. [4]) широко впроваджено в практику хіміко-токси-

ологічного аналізу лікарських речовин різних фармакологічних груп.

Останнім часом збільшилась кількість випадків смертельних отруєнь антидепресантами [14, 15, 16, 19].

Піразидол (2,3,3а,4,5,6-гексагідро-8-метил-1Н-піразино-[3,2,1-j,k]-карбазолу гідрохлорид) — чотирициклічний антидепресант, похідне піразинокарбазолу [6, 8]. Препарат поєднує седативний та стимулюючий ефекти і відноситься до антидепресантів збалансованої дії [1, 7, 8]. Особливості фармакологічної дії вказаного антидепресанта обумовлюють його широке застосування у медичній практиці. Піразидол має побічні ефекти [1, 7, 8] і може бути причиною гострих та смертельних отруєнь.

Запропоновано методику визначення піразидолу в плазмі крові методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з флуориметричним детектуванням [17]. Наведені в літературі результати [2] визначення пірази-

С.В.Баюрка — канд. фармац. наук, доцент кафедри токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

долу в біологічному матеріалі з використанням підкисленої води та підкисленого етанолу свідчать про невисоку ефективність зазначених методів 6% (методом Васильєвої О.О.), 8,5% (методом Крамаренка В.П.), 11,5% (методом Стаса-Отто). Дані з ізоляції піразидолу за допомогою ацетонітрилу та ацетону в літературі відсутні.

Таким чином, метою нашої роботи було встановлення ефективності щодо піразидолу методів ізоляції ацетонітиром (за С shedзінські I.) та ацетоном (за Карташовим В.А.).

Методика ізоляції піразидолу з печінки ацетонітиром. До 20 г подрібненої печінки людини, яка загинула від травми, додавали 2000 мкг піразидолу. Суміш ретельно переміщували і залишали на 24 години. Паралельно ставили "холості" досліди.

Виділення піразидолу з печінки підкисленим ацетонітиром проводили за методом Сhedзінські I., як описано в роботі [22].

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 визначення 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 переміщували, переносили до ділильної лійки, і кислий розчин тричі збовтували з діетиловим етером по 10 мл кожного разу. Фазу органічного розчинника відкидали, а кислий водний залишок підлигувували амонію гідроксидом 25% розчином до pH 10-11 і тричі екстрагували піразидол хлороформом (по 10 мл). Екстракти пропускали через паперовий фільтр з 0,5 г безводного натрію сульфату та збиралі у

мірну колбу об'ємом 50 мл, доводячи до позначки хлороформом.

Ізоляція піразидолу з печінки ацетоном. До 5 г подрібненої печінки людини, яка загинула від травми, додавали 500 мкг піразидолу. Суміш ретельно переміщували і залишали на 24 години. Паралельно ставили "холості" досліди.

Виділення піразидолу з печінки ацетоном проводили за методом Карташова В.А., як наведено в роботі [12].

Отримані екстракти з біологічного матеріалу додатково очищували від домішок екстракційним методом, як описано вище.

Виявлення та кількісне визначення піразидолу в отриманих екстрактах з біологічного матеріалу проводили за допомогою кольорових експрес-тестів, ТШХ, УФ-спектроскопії, екстракційної фотоелектроколориметрії.

Для кольорових експрес-тестів на піразидол використовували кислоти концентровані: сульфатну (лимонно-жовте забарвлення), нітратну (цегляно-червоне забарвлення), хлоридну (цегляно-червоне забарвлення), реактиви Маркі (жовте забарвлення), Фреде (синє забарвлення), Манделіна (жовте забарвлення), Лібермана (коричневе забарвлення), Ердмана (коричневе забарвлення). Паралельно проводили контрольні досліди зі стандартним розчином піразидолу в хлороформі (20 мкг/мл) та витяжкою з "холостого" досліду.

Для хроматографічного виявлення піразидолу використовували хроматографічні пластинки Merck (Silica gel 60 F254, розмір 10x20 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)

(послідовно) або хлороформ і метанол — амонію гідроксид 25% розчин (100:1,5) (послідовно). Плями піразидолу на хроматографічних пластинах 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 Rf і становили у рухомих фазах: хлороформ — метанол (90:10) $0,45 \pm 0,02$ та метанол — амоній гідроксиду 25% розчин (100:1,5) $0,55 \pm 0,02$. Витяжки, отримані з "холостих" дослідів, не давали плям з вказаними значеннями Rf.

УФ-спектроскопічне виявлення піразидолу проводили в елюатах з хроматограм. З непроявленої 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 кислоти хлоридної 0,1 М розчині. Як розчин порівняння використовували кислоту хлоридну 0,1 М розчин. УФ-спектр елюату був аналогічним спектру стандартного розчину піразидолу в кислоті хлоридній 0,1 М розчині та мав дві смуги поглинання при довжині хвиль 228 ± 2 нм та 276 ± 2 нм.

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

Градуювальний 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 pH 4,6, по 5 мл метилового оранжевого 0,05% розчину 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.

Таблиця

**Результати екстракційно-фотометричного визначення
піразидолу, виділеного з печінки підкисленим
ацетонітрилом (метод С shedзінські I.) та нейтральним
ацетоном (метод Карташова В.А.)**

Метод ізоляції	Додано піразидолу, мкг (до 1 г печінки)	Виділено піразидолу		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
Підкисленим ацетонітрилом (метод С shedzінські I.)	2000 (m=20)	528,0	26,4	$\bar{X} = 24,58$ $S = 1,72$ $S_{\bar{X}} = 0,77$ $\Delta X = 2,13$ $\varepsilon = 8,66$ $\bar{X} \pm \Delta X = 24,58 \pm 2,13$
		450,0	22,5	
		498,0	24,9	
		462,0	23,1	
		520,0	26,0	
Нейтральним ацетоном (метод Карташова В.А.)	500 (m=5)	66,0	13,2	$\bar{X} = 13,56$ $S = 1,06$ $S_{\bar{X}} = 0,47$ $\Delta X = 1,30$ $\varepsilon = 9,58$ $\bar{X} \pm \Delta X = 13,56 \pm 1,30$
		62,5	12,5	
		76,0	15,2	
		70,0	14,0	
		64,5	12,9	

Суміш у ділильних лійках збовтували протягом 5 хв за допомогою апарату для струшування рідин і залишали на 10 хв для розділення фаз. Збиралі по 14 мл хлороформних витяжок, відкидаючи їх перші порції (близько 1 мл), до яких додавали по 2 мл кислоти сульфатної 1% розчину в абсолютному етанолі.

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

Світлопоглинання забарвлених розчинів підлягало закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрації від 5 до 120 мкг піразидолу в 14 мл кінцевого об'єму. Відносна помилка кількісного визначення не перевищувала 2,7%.

Результати та їх обговорення

При ізоляції піразидолу з біологічного матеріалу підкисленим ацетонітрилом за методом Сhedzінські I. та нейтральним ацетоном за методом Карташова В.А. було встановлено, що отримані

біологічні екстракти містили деяку кількість домішок, присутність яких була небажаною для подальшого виявлення та кількісного визначення досліджуваної лікарської речовини. Так, результати вимірювань показників оптичної густини, отримані екстракційно-фотоелектроколориметричним методом з метиловим оранжевим, для екстрактів з "холостих" дослідів за наведеними вище методами ізоляції становили, відповідно, 0,07-0,11 та 0,08-0,14.

Для видалення супутніх домішок проводили додаткове екстракційне очищення витяжок за методикою, наведеною вище. Після цього відповідні значення оптичної густини розчинів знаходились у межах 0,025-0,03 та 0,015-0,025.

Додаткового екстракційного очищення було достатньо для проведення кольорових експрес-тестів та екстракційно-фотоелектроколориметричного визначення піразидолу в екстрактах, яке проводили на фоні "холостих" дослідів.

Але залишкова кількість співекстрактивних речовин після додаткового екстракційного очищення заважала процесу хроматографування (розтягнуті плями піразидолу разом з співекстрактивними речовинами) та УФ-спектроскопічному дослідження (розчин сухого залишку з органічного екс-

тракту у кислоті хлоридній 0,1 М містив завислі частинки). У зв'язку з цим ми проводили додаткове хроматографічне очищення отриманих витяжок. Для цього хроматографічну пластинку з нанесеними екстрактами з біологічного матеріалу двічі вміщували в хроматографічну камеру з хлорофором (фронт розчинника — 8 см).

Попередніми дослідами з використанням витяжок з "холостих" проб біологічного матеріалу, а також зі стандартним розчином піразидолу, нанесеними на хроматографічну пластинку, було встановлено, що співекстрактивні речовини при цьому мігрували до фінішу, а плями піразидолу залишались на лінії старту (плями співекстрактивних речовин і піразидолу проявляли за допомогою реактиву Драгендорфа в модифікації за Мунье). Хроматографічні пластинки з очищеними таким чином пробами піразидолу з біологічного матеріалу далі використовували для виявлення препарату за методом ТШХ та після елюювання піразидолу з хроматографічної пластинки — за УФ-спектрами.

Результати кількісного визначення піразидолу, виділеного з печінки за методами Сhedzінські I. та Карташова В.А., наведені в таблиці.

Як видно, за допомогою запропонованих методик з печінки можна виділити $24,58 \pm 2,13\%$ та $13,56 \pm 1,30\%$ піразидолу, відповідно.

ВИСНОВКИ

1. Вивчено ефективність відносно піразидолу методів ізоляції лікарських речовин підкисленим ацетонітрилом (метод Сhedzінські I.) та нейтральним ацетоном (метод Карташова В.А.), які дозволили виділити відповідно $24,58 \pm 2,13\%$ та $13,56 \pm 1,30\%$ піразидолу.

2. Показано, що дані хіміко-токсикологічних досліджень, отримані з використанням вищезазначених методів ізоляції, а також кольорових реакцій, ТШХ та УФ-спектроскопії, можуть бути використані для підтвердження результатів патоморфологічної діагностики смертельних отруєнь піразидолом.

ЛІТЕРАТУРА

1. Андреева Н.И., Аснина В.В., Либерман С.С. //Хим.-фармац. журн. — 2000. — Т. 34, №9. — С. 12-17.
2. Борисова I.B., Попова В.I. //Фармац. журн. — 1990. — №1. — С. 59-60.
3. Вергейчик Т.Х. Токсикологическая химия. — М.: МЕДпресс-информ, 2009. — 400 с.
4. Карташов В.А., Кнауб В.А., Чернова Л.В. //СМЭ. — 1988. — №1. — С. 33-35.
5. Компендиум 2008 — лекарственные препараты. В 2-х т. / Под ред. В.Н.Коваленко, А.П.Викторова. — К.: МОРИОН, 2008. — Т. 2. — С. 196-197.
6. Крамаренко В.П. Токсикологічна хімія. — К.: Вища школа, 1995. — 423 с.
7. Крылов В.И. //ФАРМіндекс-Практик. — 2003. — Вып. 5. — С. 22-32.
8. Машковский М.Д. Лекарственные средства. 15-е изд. — М.: ООО “Изд-во Новая Волна”, 2006. — С. 94-95.
9. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов: учебное пособие / Под ред. проф. Н.И.Калетиной. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — 1016 с.
10. Токсикологическая химия: Учеб. для вузов / Т.В.Плетенева, Е.М.Саломатин, А.В.Сыроежкин и др. — М.: ТЭОТАР-Медиа, 2005. — 512 с.
11. Удалов А.В. //Лабор. журн. — 2003. — №1 (3). — С. 54-58.
12. Чернова Л.В., Карташов В.А. //СМЭ. — 1989. — №2. — С. 56-57.
13. Элленхорн М.Дж. Медицинская токсикология: Диагностика и лечение отравлений у человека. В 2-х т. / Пер. с англ. — М.: Медицина, 2003. — Т. 1. — 1048 с.; Т. 2. — 1044 с.
14. Bateman N.D. Antidepressants: Poisonous substances. — Amsterdam: Elsevier, 2007. — Р. 587-589.
15. Carson H.J. //J. Leg. Med. — 2007. — Vol. XXX. — P. 1-4.
16. Cheeta S., Schifano F., Oyefeso A. et. al. //Brit. J. Psychiatry. — 2004. — №184. — Р. 41-47.
17. Chiap P., Ceccato A., Gora R. et al. //J. Pharm. and Biomed. Anal. — 2002. — Vol. 27, №3-4. — Р. 447-455.
18. Clark's analysis of Drugs and Poisons. 3-rd Ed. — Pharmaceutical Press, 2005 (CD).
19. Isbister G.K., Bowe S.J., Dawson A. et. al. //J. Toxicol. Clin. Toxicol. — 2004. — №42. — Р. 277-285.
20. Poisoning & Drug Overdose. 4-th Ed. / Ed. K.R.Olson. — Zange Medical Books, Mc Graw-Hill, 2004. — Р. 88-93.
21. Randall C. Baselt. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. — California, Foster City: Chemical Toxicology Institute, 2000. — Р. 476-478.
22. Szrzedzinski I. //Arch. Med. Sad. Krymin. — 1978. — Vol. 28. — Р. 199.

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

Надійшла до редакції 26.11.2009 р.