

## ДІАГНОСТИКА ГОСТРИХ ОТРУЄНЬ ПІРАЗИДОЛОМ ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ ТОКСИКОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

С.В.Баюрка, С.А.Карпушина

Національний фармацевтичний університет

*Ключові слова:* чотирициклічні антидепресанти; піразидол; біологічні рідини; тонкошарова хроматографія; УФ-спектроскопія; екстракційна фотометрія

*Розроблені ефективні методики рідинно-рідинної екстракції піразидолу з біологічних рідин хлороформом із лужного середовища при рН 10. Ідентифікацію піразидолу в отриманих біологічних екстрактах проводили за допомогою тонкошарової хроматографії з використанням рухомих фаз хлороформ і хлороформ — метанол (90:10) (послідовно) ( $R_f = 0,45 \pm 0,02$ ), а також хлороформ і метанол — амоній гідроксиду 25% розчин (100:1,5) (послідовно) ( $R_f = 0,55 \pm 0,02$ ), УФ-спектроскопії після елювання препарату з фореграм метанолом ( $\lambda_{\max} 228 \pm 2$  та  $276 \pm 2$  нм). Кількісне визначення препарату в екстрактах встановлювали екстракційно-фотометричним методом за реакцією утворення іонного асоціату з кислотним азобарвником метиловим оранжевим. Розроблені методики дозволили виділити з сечі  $67,0 \pm 4,0\%$  піразидолу, з плазми крові —  $31,2 \pm 3,0\%$ , з осаду крові після його відокремлення від плазми — ще додатково  $11,8 \pm 1,2\%$  зазначеного антидепресанту.*

Діагностика гострих отруєнь лікарськими речовинами у багатьох випадках становить значні труднощі у зв'язку з тим, що клінічна картина інтоксикації переважно нехарактерна. Вирішальне значення має комплексна оцінка клінічних проявів та результатів лабораторних досліджень, зокрема, токсикологічних, направлених на екстренне виявлення отруйної речовини у біологічних середовищах та кількісну оцінку її вмісту.

У теперішній час причиною переважної більшості гострих отруєнь є психоактивні речовини, серед яких одне з перших місць посідають антидепресанти [6, 7, 10, 11, 12].

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, 4, 5]. За механізмом фармакологічної дії піразидол належить до другого покоління інгібіторів моноаміноокси-

дази (МАО) — селективних зворотних інгібіторів МАО-А [1, 5].

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 тощо.

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

Запропоновано методику визначення піразидолу в плазмі крові методом високоефективної рідинної хроматографії з флуориметричним детектуванням [8]. Вказана методика характеризується високою чутливістю та специфічністю, але потребує ретельної пробіпідготовки та спеціального дорогого обладнання.

У літературі наведені дані [2] по виділенню піразидолу з крові

та сечі методом рідинно-рідинної екстракції 1,2-дихлоретаном з лужного середовища. Але використання вказаного екстрагенту небажано через його високу токсичність.

Згідно з літературними даними [9], поліциклічні антидепресанти характеризуються високим ступенем зв'язування з білками біологічного об'єкту (до 95%). На наш погляд, підвищити ступінь вилучення піразидолу з крові можна додатковим дослідженням осаду, який утворюється після відокремлення формених елементів крові, що також стало предметом нашого дослідження.

Таким чином, метою наших досліджень було вдосконалення методик виділення піразидолу з крові та сечі за допомогою рідинно-рідинної екстракції. Для виявлення піразидолу в екстрактах з біологічних рідин використовували кольорові реакції, тонкошарову хроматографію (ТШХ), УФ-спектроскопію. Кількісне визначення проводили за допомогою екстракційної фотометрії з кислотним азобарвником — метиловим оранжевим.

## Матеріали та методи

**Методика ізолювання піразидолу з сечі.** До 50 мл сечі людини додавали від 200 до 1000 мкг піразидолу і суміш залишали на 24 год. Після цього до сечі додавали кислоту хлоридну 10% розчин до одержання рН 1-2 і двічі збовтували з 15 мл діетилового ефіру для відокремлення супутніх домішок з біологічної рідини. Шар органічного розчинника відкидали. Потім до підкисленої сечі додавали натрію гідроксид 50% розчин до рН 10 і тричі екстрагували піразидол хлороформом по 15 мл кожен раз. Утворені емульсії руйнували центрифугуванням протягом 15 хв зі швидкістю 3000 об/хв. Центрифугат фільтрували через паперовий фільтр з 1 г безводного натрію сульфату у мірну колбу об'ємом 50 мл і доводили хлороформом до позначки. В ролі розчинів порівняння використовували розчини, одержані у "холостому" досліді.

**Методика ізолювання піразидолу з крові.** До 10 мл донорської крові додавали водні розчини препарату, які вміщували від 50 до 200 мкг піразидолу, перемішували і залишали на добу. Через добу до 10 мл модельної суміші піразидолу з кров'ю додавали 10 мл кислоти трихлорацетатної 10% розчин і перемішували. Після цього суміш центрифугували на протязі 15 хв зі швидкістю 3000 об/хв. Центрифугат зливали та екстрагували домішки тричі діетиловим ефіром по 10 мл і фазу органічного розчинника відкидали, а потім після підлужування водної фази до рН 10 натрію гідроксиду 50% розчин тричі екстрагували піразидол хлороформом. Одержані "лужні" хлороформні витяжки фільтрували через фільтр з 1 г безводного натрію сульфату у мірну колбу об'ємом 50 мл і доводили до позначки хлороформом.

Враховуючи те, що піразидол мав порівняно невисокий вихід при його ізолюванні з крові, ми досліджували окремо осад, який залишився після відокремлення надосадової рідини. Осад зі стану для центрифугування зва-

жували і переносили до порцелянової ступки, де його розтирали з потрібною кількістю безводного натрію сульфату до отримання однорідної сипкої маси, яку потім переносили до скляної колонки висотою 25 см та діаметром 1 см. Перед заповненням колонки в неї вміщували невеличкий ватний тампон для запобігання попадання розтертої маси у скляний краник. Легким постукуванням по колонці сипку масу ущільнювали. Над колонкою закріплювали ділильну лійку, що вміщувала 50 мл хлороформу, який пропускали через колонку зі швидкістю 60-80 крапель за хвилину. Отриману хлороформну витяжку випаровували у порцеляновій чашці досуха на водній бані при температурі не вище 40°C. Отриманий екстракт містив значну кількість супутніх домішок з біологічної рідини, які заважали проведенню ідентифікації та кількісного визначення піразидолу в екстрактах. Так, при проведенні кількісного визначення піразидолу у витяжках екстракційно-фотометричним методом утворювались стійкі емульсії, що не давало можливості провести аналіз екстракту. Для видалення співекстрактивних речовин ми проводили екстракційне очищення витяжок. Для цього сухий залишок розчиняли у 20 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної і переносили до ділильної лійки, куди додавали 10 мл діетилового ефіру і суміш збовтували протягом 5 хв, а потім органічну фазу відокремлювали і відкидали. Очистку витяжки діетиловим ефіром проводили ще раз. Після цього кислу витяжку підлужували 10% розчином натрію гідроксиду до рН 10 і три рази екстрагували хлороформом по 10 мл кожного разу. Хлороформні екстракти фільтрували через паперовий фільтр, який вміщував 0,5 г безводного натрію сульфату, об'єднували і переносили до мірної колби об'ємом 50 мл.

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 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 — амоній 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 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 у витяжках використовували екстракційну фотометрію з метиловим оранжевим. Вміст препарату в екстрактах розраховували за допомогою градувального графіка.

Таблиця 1

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

Додано піразидолу до 50 мл сечі, мкг	Виділено піразидолу		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
200	129,2	64,6	$\bar{X} = 67,0$ $S = 3,2$ $S_{\bar{X}} = 1,5$ $\Delta X = 4,0$ $\varepsilon = 6,0$ $\bar{X} \pm \Delta X = 67,0 \pm 4,0$
300	204,6	68,2	
500	313,5	62,7	
700	484,4	69,2	
1000	704,0	70,4	

Таблиця 2

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

Додано піразидолу до 10 мл крові, мкг	Виділено піразидолу		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
100	34,3	34,3	$\bar{X} = 31,2$ $S = 2,4$ $S_{\bar{X}} = 1,1$ $\Delta X = 3,0$ $\varepsilon = 9,7$ $\bar{X} \pm \Delta X = 31,2 \pm 3,0$
150	42,0	28,0	
200	59,6	29,0	
250	78,5	31,4	
300	97,8	32,6	

Градувальний графік будували з використанням стандартного розчину піразидолу у воді, що містив 100 мкг препарату в 1 мл. В ділильні лійки вносили по 5 мл ацетатного буферного розчину з рН 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. 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 кислоти сульфатної 1% розчину в абсолютному етанолі.

Оптичну густину отриманих розчинів, забарвлених у червоний колір, вимірювали за допомогою фотоелектроколометра КФК-2 (світлофільтр зелений з  $\lambda_{\text{еф}} = 540 \pm 10$  нм; кювета з товщиною

Таблиця 3

**Результати кількісного визначення піразидолу, виділеного з осаду крові після його відокремлення від плазми, екстракційно-фотометричним методом (середнє з п'яти визначень)**

Додано піразидолу до 10 мл крові, мкг	Виділено піразидолу		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
100	12,4	12,4	$\bar{X} = 11,8$ $S = 1,0$ $S_{\bar{X}} = 0,4$ $\Delta X = 1,2$ $\varepsilon = 10,5$ $\bar{X} \pm \Delta X = 11,8 \pm 1,2$
150	16,6	11,3	
200	21,6	10,8	
250	28,0	11,2	
300	39,6	13,2	

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 піразидолу в 14 мл кінцевого об'єму. Відносна помилка кількісного визначення не перевищувала 2,7%.

**Результати та їх обговорення**

У ході розробки методик виділення піразидолу з сечі та крові було встановлено необхідність попереднього видалення супутніх речовин з біологічних рідин, для чого білкові домішки осаджували додаванням кислоти трихлорацетатної 10% розчину з наступним центрифугуванням (кров) та екстрагували залишки супутніх речовин діетиловим ефіром з кислото середовища (кров, сеча). У разі відсутності етапу очищення при ізолюванні піразидолу з крові та сечі під час екстракції препарату органічними розчинниками з лужного середовища утворювались стійкі емульсії.

Для аналізу піразидолу в хлороформних екстрактах, одержаних з осаду крові, необхідне було також екстракційне очищення, яке проводили, як описано вище. Оптична густина розчинів, одержаних у "холостих" дослідах після екстракційного очищення, знаходилась у межах 0,01-0,02 в області спектра, що відповідало максимуму світлопоглинання забарвлених розчинів іонних асоціатів піразидолу з метиловим оранжевим.

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

Результати кількісних визначень піразидолу, виділеного з сечі, а також з плазми крові та осаду крові після його відокремлення від плазми, наведені у табл. 1-3. Як видно, за допомогою

запропонованої методики рідинно-рідинної екстракції з лужного середовища хлороформом з сечі можна виділити  $67,0 \pm 4,0\%$  піразидолу, з плазми крові —  $31,2 \pm 3,0\%$ , а з осаду крові після його відокремлення від плазми — ще додатково  $11,8 \pm 1,2\%$  зазначеного антидепресанту. Таким чином, аналіз осаду з крові на вміст в

ньому піразидолу підвищує ступінь його ізолювання з зазначеної біологічної рідини.

#### ВИСНОВКИ

1. Розроблені ефективні методики рідинно-рідинної екстракції піразидолу з біологічних рідин хлороформом з лужного середовища, що дозволяють виділити з сечі  $67,0 \pm 4,0\%$ , з плазми крові —

$31,2 \pm 3,0\%$  та з осаду крові після його відокремлення від плазми ще додатково  $11,8 \pm 1,2\%$  зазначеного антидепресанту.

2. Доведена можливість використання ТШХ, УФ-спектроскопії, екстракційної фотометрії для виявлення та визначення піразидолу в одержаних біологічних екстрактах.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Андреева Н.И., Аснина В.В., Либерман С.С. //Хим.-фармац. журн. — 2000. — Т. 34, №9. — С. 12-17.
2. Борисова И.В. Судебно-химическое исследование пиразидола: Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. — Львов, 1989. — 22 с.
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. Лекарственные препараты Украины. 1999-2000: В 3-х т. / Р.В.Богатырева, А.Ф.Возианов, Ю.П.Спиженко и др. — Х.: Прапор; Изд-во УкрФА, 1999. — Т. 2. — С. 315-317.
5. Машковский М.Д. Лекарственные средства: 15-е изд. — М.: ООО "Издательство Новая Волна", 2006. — С. 94-95.
6. Эллисхорн 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.
7. Carson H.J. //J. Leg. Med. — 2007. — Vol. XXX. — P. 1-4.
8. Chiap P., Ceccato A., Gora R. et al. //J. Pharm. and Biomed. Anal. — 2002. — Vol. 27, №3-4. — P. 447-455.
9. Clark's analysis of Drugs and Poisons: 3-rd Ed. — Pharmaceutical Press, 2005 (CD).
10. Isbister G.K., Bowe S.J., Dawson A. et al. //J. Toxicol. Clin. Toxicol. — 2004. — №42. — P. 277-285.
11. Jonsson A., Holmgren P., Ahlner J. //Forens. Sci. Int. — 2004. — Vol. 143. — P. 53-59.
12. Okulicz-Kozaryn K., Borucka A., Koson K. //Alk. i narkomania. — 2006. — Vol. 19, №1. — С. 35-52.

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

Надійшла до редакції 22.09.2009 р.