

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

УДК 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

ІЗОЛЮВАННЯ ТРАЗОДОНУ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ АЦЕТОНОМ ТА ПІДКИСЛЕНИМ АЦЕТОНІТРИЛОМ

С.В.Баюрка, С.А.Карпушина, В.С.Бондар

Національний фармацевтичний університет

Встановлено ступінь ізолювання тразодону з біологічного матеріалу за допомогою ацетону та підкисленого ацетонітрилу, який становив $45,0 \pm 2,7\%$ та $67,2 \pm 4,0\%$ відповідно. Показана можливість використання методів тонкошарової хроматографії, кольорових реакцій, УФ-спектроскопії для виявлення тразодону, виділеного з біологічного матеріалу, після додаткової очистки витяжок від супутніх домішок за допомогою методів екстракції та ТШХ. Кількісний вміст досліджуваного антидепресанта в екстрактах встановлювали екстракційно-фотоелектроколориметричним методом за реакцією утворення іонного асоціату з кислотним азобарвником метиловим оранжевим. Отримані результати можуть бути використані для судово-токсикологічних досліджень біологічного матеріалу при смертельних отруєннях тразодонем.

Тразодон — 2-[3-[4-(3-хлорфеніл)-1-піперазиніл]пропіл]-1,2,4-триазоло[4,3-а]піридин-3(2H)-ону гідрохлорид, похідне триазолопіридину, відноситься до гетероциклічних антидепресантів. Тразодон застосовується в сучасній медичній практиці для лікування депресій різноманітного походження, що супроводжуються тривогою та напруженням [3, 4].

За літературними даними, тразодон неодноразово був причиною смертельних отруєнь [10, 11], у тому числі комбінованих з алкоголем, героїном, метадоном та іншими психотропними речовинами [6, 7, 8]. Летальні дози тразодону при пероральному вживанні становили 2-4 г, смертельні концентрації препарату в крові — 9-33 мг/л [9].

Внаслідок того, що патоморфологічна картина отруєння тразодонем є нехарактерною, важливе значення мають результати судово-токсикологічних досліджень біологічного матеріалу на вміст у ньому токсичної речовини.

Останнім часом як ефективні екстрагенти лікарських речовин з біологічного матеріалу використовують апротонні розчинники (ацетонітрил, ацетон), які до того ж за даними деяких авторів [2, 12] екстрагують порівняно невелику кількість співекстрактивних речовин з біологічного об'єкту.

У літературі наведені дані з ізолювання тразодону з біологічного матеріалу, підкисленого ацетонітрилом [5], у залежності від кількості внесеного до об'єкту антидепресанта, але встановлена залежність потребує уточнень.

Результати з виділення тразодону з біологічного матеріалу за допомогою ацетону в літературі відсутні.

Метою нашої роботи було встановлення роздільної спроможності відносно тразодону методів ізолювання ацетоном (за методом В.А.Карташова [2]) та підкисленим ацетонітрилом (за методом І.Сшедзінські [12]).

Матеріали та методи

Подрібнену печінку людини, яка загинула від травми, у кількості 5 г (при ізолюванні ацетоном) та 20 г (при ізолюванні підкисленим ацетонітрилом) вміщували у стакан, додавали 2 мл водного розчину тразодону, який містив 500 мкг (при ізолюванні за методом В.А.Карташова) та 2000 мкг (при ізолюванні за методом І.Сшедзінські) препарату. Суміш ретельно перемішували і залишали на 24 год. Паралельно ставили "холості" досліді.

Виділення тразодону з печінки зазначеними розчинниками проводили, як описано нами раніше в роботі [1].

Отримані таким чином екстракти з біологічного матеріалу містили певну кількість супутніх домішок, які видаляли за допомогою додаткової екстракційної очистки.

За літературними даними, у найбільшій кількості тразодон екстрагується хлороформом з лужного середовища при рН 12 (ступінь дворазової екстракції складає 96%). Видалення ж співекстрактивних речовин краще проводити за допомогою діетилового етеру з кислого середовища при рН 2 [5].

З метою очистки ми переносили отримані хлороформні екстракти до фарфорової чашки, випаровували їх на водяній бані при температурі не вищій, ніж 40°C до видалення органічного розчинника. Потім до сухого залишку у фарфоровій чашці додавали 20 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної, вміст чашки ретельно перемішували, переносили до ділильної лійки і кислий розчин двічі (по 10 мл) збовтували з діетиловим етером, відкидаючи фазу органічного розчинника. Після цього кислий водний залишок підлговували 20% роз-

чином натрію гідроксиду до рН 12 і тричі екстрагували тразодон хлороформом по 10 мл кожного разу. Хлороформні витяжки фільтрували через паперовий фільтр з 0,5 г безводного натрію сульфату у мірну колбу об'ємом 50 мл і доводили до позначки хлороформом.

Результати та їх обговорення

Виявлення та кількісне визначення тразодону в отриманих екстрактах проводили за допомогою кольорових реакцій, тонкошарової хроматографії (ТШХ), УФ-спектроскопії, екстракційної фотоелектроколориметрії з метиловим оранжевим.

При ізолюванні тразодону з біологічного матеріалу нейтральним ацетоном за методом В.А.Карташова та підкисленим ацетонітрилом за методом І.Сшедзінські було встановлено, що отримані біологічні екстракти містили деяку кількість домішок, присутність яких була небажаною для подальшого виявлення та кількісного визначення досліджуваної лікарської сполуки. Так, результати вимірювань показників оптичної густини, отримані екстракційно-фотоелектроколориметричним методом з метиловим оранжевим для екстрактів з "холостих" дослідів за наведеними вище методами ізолювання, становили, відповідно, 0,07-0,11 та 0,035-0,045.

Додаткового екстракційного очищення було достатньо для проведення кольорових реакцій та екстракційно-фотоелектроколориметричного визначення тразодону в екстрактах, яке проводили на фоні "холостих" дослідів. Їх оптична густина після додаткового екстракційного очищення не перевищувала 0,015-0,025 в області спектра, що відповідала максимуму світлопоглинання забарвлених розчинів іонних асоціатів тразодону з метиловим оранжевим.

При виявленні тразодону у витяжках за допомогою кольорових реакцій використовували кислоту нітратну концентровану (спостерігали жовте забарвлення), реактиви Лібермана (фіолетове забарвлення, яке зникає), Манделіна (сіре забарвлення, яке переходить у фіолетове). Паралельно проводили контрольні досліді зі стандартним розчином тразодону в хлороформі (10 мкг/мл) та витяжкою з "холостого" досліді.

Залишкова кількість співекстрактивних речовин з біологічного матеріалу деякою мірою заважала процесу хроматографування (розтягнуті плями тразодону разом з співекстрактивними речовинами навіть після додаткового екстракційного очищення). У зв'язку з цим хроматографічну пластинку з нанесеними екстрактами з біологічного матеріалу двічі розвивали з використанням хлороформу як рухомої фази (фронт розчинника 8 см).

Попередніми дослідіми з витяжками з "холостих" проб біологічного матеріалу, а також зі стандартним розчином тразодону, нанесеними на хроматографічну пластинку, було встановлено, що співекстрактивні речовини при цьому мігрували до фінішу, а плями тразодону залишались на лінії старту (плями співекстрактивних речовин і тразо-

дону проявляли за допомогою реактиву Драгендорфа в модифікації за Муньє). Хроматографічні пластинки з очищеними таким чином пробами тразодону з біологічного матеріалу далі використовували для виявлення препарату методом ТШХ.

Дослідження проводили з використанням хроматографічних пластинок Merck (Silica gel 60 F254, розмір 10×20 см), для чого 5-10 мл хлороформної витяжки випаровували до мінімального об'єму (0,05 мл) і наносили в одну точку на лінію старту хроматографічної пластинки. Нанесений об'єм відповідав від 2 до 4 г досліджуваного біологічного об'єкта. На відстані 2 см від вказаної точки наносили розчин "свідка" тразодону (10 мкг у пробі). У третю точку наносили 5 мл випареної витяжки, одержаної у "холостому" досліді. Хроматограми розвивали послідовно у двох рухомих фазах: хлороформ (як вказано вище) та метанол-амонію гідроксид 25% розчин (100:1,5). Після цього пластинки висушували на повітрі і плями тразодону проявляли в УФ-світлі за блакитною флюоресценцією (чутливість — 1,0 мкг препарату в пробі) та за допомогою реактива Драгендорфа у модифікації за Муньє (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 0,58±0,02. Витяжки, отримані з "холостих" дослідів, не давали плям з вказаними значеннями Rf.

Додаткової екстракційної очистки було також недостатньо для УФ-спектроскопічного дослідження тразодону. У зв'язку з цим УФ-спектри тразодону знімали після ТШХ-очистки. Для цього з не проявленої 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 становив 97,8±1,0%. Отриманий елюат випаровували, сухий залишок розчиняли в 4 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної. Як розчин порівняння використовували 0,1 М розчин кислоти хлоридної. УФ-спектр елюату був аналогічним спектру стандартного розчину тразодону в кислоті хлоридній 0,1 М розчині та мав три смуги поглинання при довжинах хвиль 247±2, 274±2 та 310±2 нм.

Кількісний вміст тразодону у витяжках встановлювали екстракційно-фотоелектроколориметричним методом за реакцією утворення іонних асоціатів препарату з метиловим оранжевим за допомогою градуювального графіка.

Градуювальний графік будували з використанням стандартного розчину тразодону у воді, що містив 100 мкг препарату в 1 мл. Кількісне визначення проводили згідно з методикою, яка наведена нами раніше [1].

Світлопоглинання забарвлених розчинів підлягало закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 10 до 150 мкг тразодону в 14 мл

Таблиця

Результати екстракційно-фотометричного визначення тразодону, виділеного з печінки ацетоном (за методом В.А.Карташова) та підкисленим ацетонітрилом (за методом І.Сшедзінські)

Метод ізолювання	Додано тразодону, мкг (до m г печінки)	Виділено тразодону		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
Ацетоном (метод В.А.Карташова)	500 ($m = 5$)	236,0	47,2	$\bar{X} = 45,0$ $S = 2,2$ $S_{\bar{X}} = 1,0$ $\Delta X = 2,7$ $\varepsilon = 5,9$ $\bar{X} \pm \Delta X = 45,0 \pm 2,7$
		237,5	47,5	
		220,5	44,1	
		218,0	43,6	
		213,5	42,7	
Підкисленим ацетонітрилом (метод І.Сшедзінські)	2000 ($m = 20$)	1324,0	66,2	$\bar{X} = 67,2$ $S = 3,3$ $S_{\bar{X}} = 1,5$ $\Delta X = 4,0$ $\varepsilon = 6,1$ $\bar{X} \pm \Delta X = 67,2 \pm 4,0$
		1394,0	69,7	
		1312,0	65,6	
		1264,0	63,2	
		1428,0	71,4	

кінцевого об'єму. Відносна помилка кількісного визначення не перевищувала 1,05%.

Результати кількісного визначення тразодону, виділеного з печінки за методами В.А.Карташова та І.Сшедзінські, наведені в таблиці.

Як видно, за допомогою запропонованих методик з печінки можна виділити $45,0 \pm 2,7\%$ та $67,2 \pm 4,0\%$ тразодону відповідно.

ВИСНОВКИ

1. Вивчено роздільну спроможність відносно тразодону методів ізолювання лікарських речовин ацетоном (за методом В.А.Карташова) та підкисленим ацетонітрилом (за методом І.Сшедзінські), які дозволили виділити, відповідно, $45,0 \pm 2,7\%$ та $67,2 \pm 4,0\%$ досліджуваного антидепресанта.

2. Показана можливість використання методів тонкошарової хроматографії, кольорових реакцій, УФ-спектроскопії для виявлення тразодону, виділеного з біологічного матеріалу, після попередньої додаткової очистки витяжок від супутніх домішок за допомогою сполучення методів екстракції та ТШХ.

3. Отримані результати можуть бути використані для судово-токсикологічних досліджень біологічного матеріалу при смертельних отруєннях тразодоном.

ЛІТЕРАТУРА

1. Баюрка С.В., Карпушина С.А., Бондар В.С. // Вісник фармації. — 2009. — №1 (57). — С. 19-22.
2. Карташов В.А., Кнауф В.А., Чернова Л.В. // СМЭ. — 1988. — №1. — С. 33-35.
3. Крылов В.И. // ФАРМиндекс-Практик. — 2003. — Вып. 5. — С. 22-32.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства: 15-е изд. — М.: ООО "Изд-во Новая Волна", 2006. — С. 106-107.
5. Миронова Т.В. // СМЭ. — 1989. — Т. 32, №2. — С. 34-35.
6. Эллихорн 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. Cheeta S., Schifano F., Oyefeso A. et al. // Brit. J. Psychiatry. — 2004. — №184. — P. 41-47.
9. 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.
10. Goeringer K.E. // J. Forens. Sci. — 2000. — Vol. 45. — P. 850-856.
11. Martin A., Pounder D.J. // Forens. Sci. Int. — 1992. — Vol. 56. — P. 201-207.
12. Szredzinski I. // Arch. Med. Sad. Krymin. — 1978. — Vol. 28. — P. 199.

УДК 615.065:54.061/062:547.712.22:001.8

ИЗОЛИРОВАНИЕ ТРАЗОДОНА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА АЦЕТОНОМ И ПОДКИСЛЕННЫМ АЦЕТОНИТРИЛОМ

С.В.Баюрка, С.А.Карпушина, В.С.Бондарь

Установлена степень изолирования тразодона из биологического материала с помощью ацетона и подкисленного ацетонитрила, которая составила $45,0 \pm 2,7\%$ и $67,2 \pm 4,0\%$ соответственно. Показана возможность использования методов тонкошаровой хроматографии, цветных реакций, УФ-спектроскопии для обнаружения тразодона, выделенного из биологического материала, после дополнительной очистки вытяжек от сопутствующих примесей с помощью методов экстракции и ТСХ. Количественное содержание исследуемого антидепрессанта в экстрактах устанавливали экстракционно-фотоэлектроколориметрическим методом по реакции образования ионного ассоциата с кислотным азокрасителем метиловым оранжевым. Полученные результаты могут быть использованы для судебно-токсикологических исследований биологического материала при смертельных отравлениях тразодоном.

UDC 615.065:54.061/062:547.712.22:001.8

ISOLATION OF TRAZODONE FROM THE BIOLOGICAL MATERIAL BY ACETONE AND ACIDIFIED ACETONITRILE

S.V.Bayurka, S.A.Karpushina, V.S.Bondar

The degree of trazodone isolation from the biological material by acetone and acidified acetonitrile has been determined, and it is $45.0 \pm 2.7\%$ and $67.2 \pm 4.0\%$, respectively. The possibility of application of the Thin Layer Chromatography method, colour reactions, UV-spectroscopy for detection of trazodone isolated from the biological material after the additional purification of the extracts from concomitant admixtures by means of the back extraction and TLC has been shown. The quantitative content of the medicine in the extracts was determined by the extraction photoelectrocolorimetric method using the reaction of ionic associate formation with methyl orange, the acidic azodye. The results obtained can be used for forensic and toxicological investigations of the biological material in lethal trazodone poisonings.