

УДК 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

С.В. Баярка, С.А. Карпушина, В.С. Бондар

Національний фармацевтичний університет

## ІЗОЛЮВАННЯ ТРАЗОДОНУ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ЗА ДОПОМОГОЮ ХЛОРОФОРМУ

*Встановлено ефективність відносно антидепресанта тразодону методу ізолювання лікарських речовин елююванням їх хлороформом з біологічної тканини, гомогенізованої розтиранням з натрію сульфатом безводним, який дозволив виділити  $16,5 \pm 2,2\%$  зазначеного антидепресанта.*

**Ключові слова:** гетероциклічні антидепресанти; тразодон; біологічний матеріал; тонкошарова хроматографія; кольорові реакції; УФ-спектроскопія

### ВСТУП

Приблизно 121 мільйон людей у світі вживають антидепресанти з приводу хронічних та рецидивних розладів психічного стану, які є потенційною причиною суїцидальної поведінки [11, 14, 15]. Так, згідно зі статистичними даними [12, 16], антидепресанти, поряд з бензодіазепінами, опіатами та етанолом, є причиною більшості отруєнь, що носять летальний характер.

Останнім часом у фармакотерапії депресій значна увага приділяється антидепресантам, які переважно інгібують зворотній захват серотоніну [8]. До препаратів цієї групи відносять і тразодон, який певною мірою характеризується зазначеним механізмом фармакологічної дії [7].

За хімічною будовою тразодон (2-[3-[4-(3-хлорфеніл)-1-піперазиніл]пропіл]-1,2,4-триазоло[4,3-а]піридин-3 (2Н) -ону гідрохлорид) є похідним триазолопіридину та відноситься до гетероциклічних антидепресантів.

Тразодон неодноразово був причиною смертельних отруєнь [10, 13], летальні дози при цьому становили 2-4 г.

Внаслідок того, що патоморфологічна картина отруєння тразодоном нехарактерна, важливе значення для встановлення причини отруєння мають результати судово-токсикологічного дослідження біологічного матеріалу на вміст у ньому зазначеної токсичної речовини.

Згідно з даними наших попередніх досліджень [1, 2, 3] загальноприйняті у хіміко-токсикологічному аналізі методи ізолювання лікарських речовин за допомогою підкисленої води або підкисленого етанолу [6] характеризуються низькою розрізняючою спроможністю відносно поліциклічних антидепресантів. Невисока ефективність

цих методів, вирогідно, обумовлена високою ліпофільністю антидепресантів, про що свідчать значні величини їх коефіцієнтів розподілу ( $V_d$ ), наприклад, для амітриптиліну — 20 л/кг [6, 17], для флуоксетину — 27 л/кг [13], а для групи антидепресантів — селективних інгібіторів зворотнього захвату серотоніну, до якої відноситься і тразодон, значення  $V_d$  знаходиться у межах 15-20 л/кг [10].

У зв'язку з цим великий інтерес по відношенню до тразодону представляє метод ізолювання лікарських речовин, заснований на елюванні токсичної речовини ліпофільним розчинником хлороформом з наважки біологічного об'єкту, гомогенізованого за допомогою його розтирання з натрію сульфатом безводним. Цей метод впроваджено в практику хіміко-токсикологічного аналізу лікарських речовин різних фармакологічних груп [4, 5].

Таким чином, метою нашої роботи було встановлення ефективності методу ізолювання за допомогою хлороформу відносно тразодону. Виявлення та кількісне визначення тразодону в отриманих екстрактах проводили за допомогою простих, доступних та ефективних для мети судово-токсикологічного аналізу методів: тонкошарової хроматографії (ТШХ), УФ-спектроскопії, кольорових реакцій, екстракційної фотоелектроколориметрії.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

До проб печінки (5 г) людини, яка загинула від травми, додавали водні розчини тразодону, що містили 500 мкг препарату. Об'єкти залишали на добу при кімнатній температурі, а потім виділяли тразодон за наступною методикою.

Наважку печінки переносили в ступку, додавали потрібну кількість натрію сульфату безводного і розтирали до утворення однорідної сипкої

© С.В. Баярка, С.А. Карпушина, В.С. Бондар, 2010

маси. Отриманий об'єкт переносили до скляної колонки діаметром 20 мм, в нижню частину якої заздалегідь перед заповненням вміщували невеликий ватний тампон. Через відкритий кран колонку заповнювали хлороформом за допомогою гумової груші до утворення «дзеркала» над поверхнею об'єкту завтовшки до 2 см. Кран закривали і над колонкою встановлювали ділильну лійку з хлороформом (100 мл). Через колонку пропускали хлороформ із швидкістю 60–80 крапель за хвилину. Елюати збирали у порцелянові чашки і випарювали на водяній бані при температурі не вище, ніж 40 °C до видалення органічного розчинника.

Елюати, отримані таким чином, 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 pH 12 (ступінь дворазової екстракції складає 96%). Видалення ж співекстрактивних речовин краще проводити за допомогою діетилового етеру з кислого середовища при pH 2 [9].

З метою очистки 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 підлгоували 20% розчином натрію гідроксиду до pH 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.

Паралельно проводили «холості» досліді для отримання розчинів порівняння.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При ізолюванні тразодону з біологічного матеріалу за допомогою хлороформу 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 0,055–0,075.

Додаткового екстракційного очищення було достатньо для проведення кольорових реакцій

та екстракційно-фотоелектроколориметричного визначення тразодону в екстрактах, які проводили на фоні «холостих» дослідів. Їх оптична густина після додаткового екстракційного очищення не перевищувала 0,027–0,046 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), реактиви 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 зі 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 залишалися на лінії старту (плями співекстрактивних речовин і тразодону проявляли за допомогою реактиву Драгендорфа в модифікації за Мунье). Хроматографічні пластинки з очищеними таким чином пробами тразодону з біологічного матеріалу далі використовували для виявлення препарату за методом ТШХ.

Дослідження проводили з використанням хроматографічних пластинок Merck (Silica gel 60 F254, розмір 10x20 см); 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, а плями тразодону проявляли в УФ-світлі за блакитною

флюоресценцією (чутливість 1,0 мкг препарату в пробі) та за допомогою реактива 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  $R_f$  і становили  $0,58 \pm 0,02$ . Витяжки, отримані з «холостих» дослідів, не давали плям з вказаними значеннями  $R_f$ .

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  $97,8 \pm 1,0$  %. Отриманий елюат випаровували, сухий залишок розчиняли в 4 мл кислоти хлоридної — 0,1 М розчин. 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 довжинах хвиль  $247 \pm 2$ ,  $274 \pm 2$  та  $310 \pm 2$  нм.

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

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

Результати кількісного визначення тразодону, виділеного з печінки за допомогою хлороформу, наведені в таблиці.

Як видно, за допомогою запропонованої методики з печінки можна виділити  $16,5 \pm 2,2$  % зазначеного антидепресанта.

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено ефективність відносно антидепресанта тразодону методу ізолювання лікарських речовин елююванням їх хлороформом з біологічної тканини, гомогенізованої за допомогою розтирання з натрію сульфатом безводним, який дозволив виділити  $16,5 \pm 2,2$  % зазначеного антидепресанта.
2. Показана можливість використання кольорових реакцій, тонкошарової хроматографії, УФ-спектроскопії та екстракційної фотоелектроколориметрії для виявлення та кількісного визначення тразодону, виділеного з біологічного матеріалу зазначеним методом.

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

## ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Баюрка С.В., Карпушина С.А., Бондар В.С. та ін. Діагностика смертельних отруєнь амітриптиліном за результатами судово-токсикологічних досліджень / С.В. Баюрка,

Таблиця

### РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСТРАКЦІЙНО-ФОТОКОЛОРИМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ТРАЗОДОНУ, ВИДІЛЕНОГО З ПЕЧІНКИ ЗА ДОПОМОГОЮ ХЛОРОФОРМУ (СЕРЕДНЄ З П'ЯТИ ВИЗНАЧЕНЬ)

Додано тразодону до 5 г печінки, мкг	Виділено тразодону		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
500	81,0	16,2	$\bar{X} = 16,5$
500	77,5	15,5	$S = 1,8$
500	93,5	18,7	$S_{\bar{X}} = 0,8$
500	90,0	18,0	$\Delta \bar{X} = 2,2 \quad \varepsilon = 13,5$
500	71,5	14,3	$\bar{X} \pm \Delta \bar{X} = 16,5 \pm 2,2$

- С.А. Карпушина, В.С. Бондар та ін. // Клінічна фармація. — 2009. — Т. 13, №2. — С. 30-33.
2. Баюрка С.В., Карпушина С.А., Бондар В.С. Ізолювання флуоксетину з біологічного матеріалу підкисленою водою та підкисленим етанолом / С.В. Баюрка, С.А. Карпушина, В.С. Бондар // Вісник фармації. — 2009. — №3 (59). — С. 23-26.
3. Баюрка С.В., Карпушина С.А., Степаненко В.І. Ізолювання піразидолу з біологічного матеріалу амфіпротонними розчинниками / С.В.Баюрка, С.А. Карпушина, В.І. Степаненко // Вісник фармації. — 2010. — №1 (61). — С. 32-35.
4. Болотов В.В., Клименко Л.Ю. Вивчення методів ізолювання зопіклону з об'єктів біологічного походження / В.В. Болотов, Л.Ю. Клименко // Вісник фармації. — 2006. — № 3 (47). — С. 26-30.
5. Болотов В.В., Мороз В.П., Зареченський М.А. Порівняльна оцінка методів виділення метоклопраміду з біологічного матеріалу / В.В. Болотов, В.П. Мороз, М.А. Зареченський // Вісник фармації. — 1999. — № 1 (19). — С. 45-48.
6. Вергейчик Т.Х. Токсикологическая химия. — М.: МЕДпресс-информ, 2009. — 400 с.
7. Крылов В.И. Антидепрессанты в общей медицинской практике. Эффективность и безопасность терапии / В.И. Крылов // ФАРМиндекс-Практик. — 2003. — Вып. 5 — С. 22-32.
8. Машковский М.Д. Лекарственные средства: 15-е изд. — М.: ООО «Изд-во Новая Волна», 2006. — С. 90-109.
9. Миронова Т.В. Определение тразодона в трупном материале / Т.В. Миронова // СМЭ. — 1989. — Т. 32, №2. — С. 34-35.
10. 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.
11. Buckley N.A. Fatal toxicity of serotonergic and other antidepressant drugs: analysis of United Kingdom mortality data / N.A. Buckley // BMJ. — 2002. — P.1332-1333.
12. Carson H.J. Classes of drugs and their prevalence in multiple drug intoxication in suicides and accidents / H.J. Carson // J. Leg. Med. — 2007. — Vol. XXX. — P. 1-4.
13. 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.
14. Global Burden of Disease: A comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020 / C.J.L. Murray, A.D. Lopez. — Harvard: Harvard University Press, 1996. — P. 5.
15. Isbister G.K., Bowe S.J., Dawson A. et. al. Relative toxicity of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in overdose // J. Toxicol. Clin. Toxicol. — 2004. — №42. — P. 277-285.
16. Jonsson A., Holmgren P., Ahlner J. Fatal intoxications in a Swedish forensic autopsy material during 1992-2002 // Forens. Sci. Int. — 2004. — Vol. 143. — P. 53-59.
17. Poisoning & Drug Overdose. 4-th ed. / Ed. K.R. Olson. — Zange Medical Books, Mc Graw-Hill, 2004. — P. 88-93.

УДК 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

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

**ИЗОЛИРОВАНИЕ ТРАЗОДОНА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА С ПОМОЩЬЮ ХЛОРОФОРМА**

Установлена эффективность по отношению к антидепрессанту trazodone метода изолирования лекарственных веществ элюированием их хлороформом из биологической ткани, гомогенизированной растиранием с натрия сульфатом безводным, который позволил выделить  $16,5 \pm 2,2$  % указанного антидепрессанта.

**Ключевые слова:** гетероциклические антидепрессанты; trazodone; биологический материал; тонкослойная хроматография; цветные реакции; УФ-спектроскопия

UDC 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

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

**ISOLATION OF TRAZODONE FROM BIOLOGICAL MATERIAL BY MEANS OF THE CHLOROFORM**

Efficiency of the isolation method of medicinal substances in relation to trazodone, the antidepressant, by its elution with chloroform from the biological tissue, homogenized by means of grinding with sodium sulphate waterless has been determined. The method allowed to separate  $16,5 \pm 2,2$  % of the noted antidepressant.

**Key words:** heterocyclic antidepressants; trazodone; biological material; Thin Layer Chromatography; colour reactions; UV-spectroscopy

Адреса для листування:

61168, м. Харків,

вул. Блюхера, 4.

НФаУ, кафедра токсикологічної хімії.

тел. (0572) 67-91-92;

e-mail toxchem@ukrfa.kharkov.ua

Надійшла до редакції:

01.03.10