

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ АНАЛИЗА АНТИДЕПРЕССАНТА
ПИРАЗИДОЛА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ
ХРОМАТОГРАФИИ С МУЛЬТИВОЛНОВЫМ
СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ
ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА**

Орлова Е.В., Карпушина С.А., Баяурка С.В.

*Национальный фармацевтический университет,
кафедра токсикологической химии,
г. Харьков*

Ключевые слова: пиразидол, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Резюме: Разработана методика анализа пиразидола методом обращенно-фазной ВЭЖХ с мультиволновым УФ-детектором. Установлены параметры удерживания и спектральные отношения препарата. Уравнение градуировочной зависимости для количественного определения пиразидола имело вид $y=0,00248x+0,002$. Методика валидирована по таким параметрам, как пределы обнаружения и количественного определения, правильность, точность.

Resume: The method of pyrazidole analysis by reverse phase HPLC with UV multiwave detection has been developed. The retention parameters and spectral ratios of the drug was determined. The calibration curve equation for the quantitative determination of pyrazidole was $y = 0,00248x + 0,002$. The method developed was validated by such parameters as the limits of detection and quantification, accuracy and precision.

Актуальность. Пиразидол (2,3,3а,4,5,6-гексагидро-8-метил-1Н-пиразино-[3,2,1-j,k]-карбазола гидрохлорид) является четырехциклическим антидепрессантом – производным пиразинокарбазола. По механизму фармакологического действия пиразидол принадлежит ко второму поколению ингибиторов МАО – селективным обратимым ингибиторам МАО-А [5]. Пиразидол сочетает тимоаналептический эффект с регулирующим влиянием на ЦНС: проявляет активирующее действие у больных с заторможенностью, и седативное – у больных с ажитированным состоянием. Такие особенности фармакологического действия пиразидола обуславливают его широкое применение в медицинской практике для лечения депрессий различного происхождения, алкогольной абстиненции, болезни Альцгеймера и др. [1, 3, 7].

Согласно результатам современных эпидемиологических исследований [8], антидепрессанты занимают одну из лидирующих позиций среди общего количества летальных отравлений психоактивными и наркотическими веществами, что обусловлено как рекуррентным характером данного заболевания, так и специфическим контингентом лиц, принимающих антидепрессанты. Таким образом, разработка методов химико-токсикологического анализа лекарственных веществ антидепрессивного действия является актуальной задачей.

В литературе представлены данные по анализу пиразидола в плазме крови методом ВЭЖХ с УФ-спектрофотометрическим [10] и флюорометрическим

детектированием [6]. В указанных работах предложены условия разделения энантиомеров пиразидола и его метаболита, методики валидированы для целей биоаналитических исследований. Методы же анализа пиразидола, пригодные для решения проблем судебной токсикологии, в частности, скрининговых исследований, в настоящее время разработаны недостаточно.

Цель: Разработка методики идентификации и количественного определения пиразидола с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с мультиволновым УФ-детектированием для целей химико-токсикологического анализа.

Задачи: 1. Установить параметры удерживания и спектральные отношения пиразидола в условиях, унифицированных для скрининга лекарственных веществ согласно базе данных «ВЭЖХ-УФ» для хроматографа «Милихром А-02» (БД-2003-500) [1]; 2. Установить параметры градуировочного графика для количественного определения пиразидола; 3. Провести валидацию методики по таким параметрам как пределы обнаружения и количественного определения, правильность, точность.

Материалы и методы. Исследования проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром А-02» (ЗАО «Эконова», Новосибирск, Россия). Условия хроматографирования: колонка размером 2x75 мм с обращенной фазой C₁₈ (ProntoSIL-120-5-C18 AQ); элюент А – 0,2 М перхлорат лития-0,005 М перхлорная кислота, элюент Б – ацетонитрил, режим элюирования – градиентный (от 5 % Б до 100 % Б за 40 мин, 100 % Б в течение 3 мин); скорость подачи подвижной фазы 100 мкл/мин; температура термостата колонки 40° С; объем вводимой пробы 10 мкл; детектор мультиволновой УФ-спектрофотометрический. Детектирование проводили при 8 длинах волн: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм. С помощью автосамплера в хроматограф вводили раствор пиразидола в этаноле с концентрацией 100 мкг/мл).

Методика построения градуировочного графика для количественного определения пиразидола. Стандартный раствор (СР) препарата готовили растворением 0,01160 г пиразидола гидрохлорида, что в пересчете соответствует 0,01000 г пиразидола-основания, в этаноле в мерной колбе объемом 50 мл (получен СР с концентрацией 200 мкг/мл пиразидола-основания). Для приготовления рабочих стандартных растворов (РСР) в мерные колбы емкостью 10 мл вносили по 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 3,0; 4,0 5,0 и 8,0 мл СР и доводили объемы растворов до метки этанолом (РСР 1–8 с концентрацией 10,0; 15,0; 20,0; 30,0; 60,0; 80,0 ; 100,0 и 160,0 мкг/мл соответственно).

С помощью автосамплера в хроматограф вводили по 10 мкл СР и РСР, хроматографирование осуществляли в условиях, приведенных выше, детектирование проводили при длине волны 230 нм.

При обработке хроматограммы для расчета объема удерживания и спектральных отношений исследуемого препарата использовали программу «МультИХром-СПЕКТР», версия 2.4 (ЗАО «Амперсенд»).

Результаты и их обсуждение. Время и объем удерживания пиразидола составляли, соответственно, $21,87 \pm 0,007$ мин ($n=3$, $RSD=0,14\%$, $\varepsilon=0,34\%$) и 2187 ± 7 мкл ($n=3$, $RSD=0,14\%$, $\varepsilon=0,34\%$). Спектральные отношения (R) являются нормированными параметрами и представляют собой отношение площади пика при определенной длине волны (S_λ) к площади пика при длине волны 210 нм (S_{210}), ($R=S_\lambda/S_{210}$). Полученные значения спектральных отношений для пиразидола приведены в Таблица1.

Таблица 1. Спектральные отношения ($R=S_\lambda/S_{210}$) и их метрологические характеристики ($n=3$, $R=0,95$) для пиразидола при анализе методом ВЭЖХ

λ , нм	220	230	240	250	260	280	300
$R=S_\lambda/S_{210}$	0,283	0,092	0,025	0,016	0,025	0,007	0,0017
RSD, %	0,27	0,45	1,65	1,60	0,87	0,91	1,10
$\Delta\bar{X}$	0,007	0,003	0,001	0,002	0,001	0,001	0,0004
ε , %	0,39	0,97	4,10	2,13	1,95	2,12	2,73

Количественное определение пиразидола проводили при $\lambda=230$ нм, соответствующей области максимального специфического светопоглощения препарата в этаноле (λ_{max} при 231 нм, $E_1^1=1114,0$; 281 нм, $E_1^1=301,6$). Уравнение градуировочной прямой, представляющей зависимость площади хроматографического пика (Y) от концентрации (X), было получено методом линейной регрессии, общий вид которой описывается уравнением вида: $y = bx + a$. После проверки значимости параметра «а» в полученном уравнении был сделан вывод о невозможности перехода к уравнению вида: $y = b'x$ [2]. Полученное уравнение имело вид: $y=0,00248x+0,002$. Пределы линейности методики, пределы обнаружения и количественного определения пиразидола, а также метрологические характеристики градуировочной прямой представлены в Таблица2.

Таблица 2. Некоторые валидационные параметры методики и метрологические характеристики градуировочной прямой для количественного определения пиразидола методом ВЭЖХ

Диапазон линейности, мкг/мл	r	S_o^2	S_a	Δb	Δa	LOD		LOQ	
						мкг/мл	нг в пробе	мкг/мл	нг в пробе
10–200	0,999	$1,6 \cdot 10^{-6}$	$6,4 \cdot 10^{-4}$	10^{-5}	0,001	0,9	9	2,6	26

Значение LOD и LOQ были рассчитаны на основе параметров градуировочной прямой (стандартного отклонения свободного члена (S_a) и ее тангенса наклона (b)) согласно соответствующим уравнениями: $LOD = 3,3S_a / b$ и $LOQ = 10S_a / b$ [4].

Для установления правильности и точности (последнюю характеризовали величиной сходимости, % RSD) разработанной методики были исследованы

модельні розчини з відомим вмістом препарату в областях низьких, середніх і високих концентрацій. Концентрації досліджуваних модельних розчинів, правильність і точність приведені в Таблиця 3.

Як видно, правильність розробленої методики в області низьких концентрацій складала 101,4 % (RSD=1,8 %), в області середніх концентрацій – 100,6 % (RSD=0,8 %), в області високих концентрацій – 100,1 % (RSD=0,7 %), що задовольняє вимогам UNODC, пред'являемим к методикам, використовуваним в області судової токсикології [9].

Висновки: 1. Сочетание параметров удерживания и спектральных характеристик пиразидола позволяет провести идентификацию указанного антидепрессанта методом ВЭЖХ с мультиволновым УФ-детектированием в условиях токсикологического скрининга.

2. Розроблена методика кількісного визначення піразидола методом ВЭЖХ характеризується достаточною чутливістю, діапазоном лінійності, правильністю і прецизійністю для цілей судово-токсикологічних досліджень.

Таблиця 3. Правильність і точність методики кількісного визначення піразидола методом ВЭЖХ

Взято, мкг/мл	Обнаружено, %	Метрологічні характеристики, (n=5, P=0,95)
10,0	102,6; 103,9; 100,1; 99,8; 100,6	$\bar{X} = 101,4$; $S = 1,8$; RSD=1,8%; $S_{\bar{X}} = 0,8$; $\Delta\bar{X} = 2,2$; $\varepsilon = 2,2\%$
100,0	100,6; 101,8; 100,6; 99,7; 100,3	$\bar{X} = 100,6$; $S = 0,8$; RSD=0,8%; $S_{\bar{X}} = 0,3$; $\Delta\bar{X} = 0,8$; $\varepsilon = 0,8\%$
200,0	99,9; 100,1; 101,4; 99,6; 99,7	$\bar{X} = 100,1$; $S = 0,7$; RSD=0,7%; $S_{\bar{X}} = 0,3$; $\Delta\bar{X} = 0,8$; $\varepsilon = 0,8\%$

Література

1. Азарова, И. Н. Расширение возможностей высокоэффективной жидкостной хроматографии при работе с базами данных "ВЭЖХ-УФ" / И. Н. Азарова, С. С. Барсегян, Г. И. Барам // Аналитика Сибири и Дальнего Востока: матер. VIII научн. конф., г. Томск, 13–18 окт. 2008 г. – Томск, 2008. – С. 160–161.

2. Аналітична хімія: навч. посіб. для фармац. вузів та ф-тів III–IV рівня акредитації / В. В. Болотов, О. М. Свечнікова, С. В. Колісник [та ін.]. – Х.: Вид-во НФаУ, Оригінал, 2004. – 480 с.

3. Венгер, О. П. Дослідження препарату "Нормазидол" у пацієнтів із тривожно-фобічними і тривожно-депресивними розладами / О. П. Венгер, О. В. Гуковський // Вісник наукових досліджень. – 2008. – № 1. – С. 7–19.

4. Державна Фармакопея України / [1-е вид., доп. 2.]. – Харків : Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.

5. Машковский М. Д. Лекарственные средства: 15-е изд. / М. Д. Машковский – М.: ООО «Издательство Новая Волна», 2006. – С. 94–95.

6. Automated determination of pirlindole enantiomers in plasma by on-line coupling of a pre-column packed with restricted access material to a chiral liquid chromatographic column / P.

Chiap, A. Ceccato, R. Gora [et al.] // *J. Pharm. and Biomed. Anal.* – 2002. – V. 27 (3–4). – P. 447–455.

7. Bun'kova, K. M. Efficacy and tolerability of clomipramine, pirlindole and escitalopram in the treatment of neurotic level depression / K. M. Bun'kova. – *Zh. Nevrol. Psikhiatr. Im. S. S. Korsakova.* – 2008. – V. 108 (3). – P. 29–32.

8. Carson, H. J. Classes of drugs and their prevalence in multiple drug intoxication in suicides and accidents / H. J. Carson. // *Leg. Med (Tokyo).* – 2008. – 10 (2). – P. 92–95.

9. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens (United Nations Office on Drugs and Crime, Vienna). – New York, 2009. – 67 p.

10. Simultaneous determination of pirlindole enantiomers and dehydropirlindole by chiral liquid chromatography / A. [Ceccato](#), P. [Hubert](#), P. [de Tullio](#) [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1998. – V. 17 (6–7). – P. 1071–1079.