

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

УДК 615.065:547.728.54.061/062]001.8

ІЗОЛЮВАННЯ АМІТРИПТИЛІНУ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ АМФІФІЛЬНИМИ РОЗЧИННИКАМИ

С.В.Баюрка, С.А.Карпушина, В.С.Бондар

Національний фармацевтичний університет

Встановлено ступінь ізоляції амітритиліну з біологічного матеріалу за допомогою підкисленого ацетонітрилу та нейтрального ацетону, який становив $29,80 \pm 2,52\%$ та $34,50 \pm 2,83\%$ відповідно. Показана можливість використання методу тонкошарової хроматографії, кольорових реакцій, УФ-спектроскопії для виявлення амітритиліну, виділеного з біологічного матеріалу, після попередньої додаткової очистки витяжок від супутніх домішок за допомогою методів екстракції та ТШХ. Кількісний вміст препарату в екстрактах встановлювали екстракційно-фотометричним методом за реакцією утворення іонного асоціату з кислотним азобарвником метиловим оранжевим. Світлопоглинання забарвлених розчинів підлягало закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 5 до 140 мкг амітритиліну в 14 мл кінцевого об'єму. Відносна помилка кількісного визначення не перевищувала 3%. Отримані результати можуть бути використані для судово-токсикологічних досліджень біологічного матеріалу при смертельних отруєннях амітритиліном.

Розробка методів аналізу препаратів антидепресантної дії в біологічних об'єктах є актуальною задачею в галузі хіміко-токсикологічних досліджень. Так, згідно зі статистичними даними [7, 11] приблизно 121 мільйон людей у світі вживає антидепресанти з приводу хронічних та рецидивних розладів психічного стану, які є потенціальною причиною суїциdalnoї поведінки.

Одним з антидепресантів, який неодноразово був причиною смертельних отруєнь [5, 8], є амітритилін. Група трициклічних антидепресантів, до якої відноситься вказаний лікарський препарат, характеризується вузьким терапевтичним індексом та відносно високою токсичністю [4, 10]. Більшість гострих отруєнь амітритиліном закінчується летально [9]. При цьому клінічна картина отруєння даним препаратом нехарактерна, тому важливе значення для діагностики отруєнь амітритиліном мають результати хіміко-токсикологічних досліджень біологічних об'єктів на вміст у них отруйної речовини.

Розроблені для амітритиліну методи аналізу біологічного матеріалу з використанням загально-прийнятих у судово-токсикологічному аналізі методів ізоляції “лікарських” отрут підкисленими водою та етанолом [1, 6] характеризуються невисокою ефективністю. Так, впродовж наших попередніх досліджень було встановлено, що ступінь ізоляції амітритиліну з печінки за вказаними методами не перевищувала 15,84% та 11,46%, відповідно.

Великий інтерес як екстрагенти “лікарських” отрут з біологічного матеріалу мають амфіфільні розчинники, які легко проникають через гідрофільні та гідрофобні ділянки мембрани клітин біологічного об'єкту і тим самим сприяють більш ефективній екстракції досліджуваних отруйних речовин з внутрішніх органів. Ізоляція “лікарських” отрут такими амфіфільними розчинниками як ацетонітрил (за методом І.Сchedzins'kyi [12]) та ацетон (за методом В.А.Карташова [3]) широко впроваджено в практику хіміко-токсикологічного аналізу лікарських речовин різних фармакологічних груп. Щодо амітритиліну, то результати ізоляції з використанням ацетонітрилу [2] потребують систематизації, а дані з ізоляції екстракцією ацетоном у літературі відсутні.

Метою нашої роботи було встановлення роздільної спроможності щодо амітритиліну методів ізоляції ацетонітрилом (за методом І.Сchedzins'kyi) та нейтральним ацетоном (за методом В.А.Карташова).

Методика ізоляції амітритиліну з печінки ацетонітрилом (за методом І.Сchedzins'kyi). 20 г по-дрібненої печінки людини, яка загинула від травми, заливали 100 мл ацетонітрилу, підкисленого 1 М розчином кислоти хлоридної до pH 2 (за універсальним індикатором) і настоювали протягом 30 хв при перемішуванні. Настоювання з підкисленим ацетонітрилом проводили двічі. Витяжки процідживали через марлю, об'єднували і поділяли на дві рівні частини. До половини витяжки додавали 0,5 М розчин натрію сульфату (1:2) і проводили однократну екстракцію діетиловим ефіром (50 мл). Ефірну витяжку не досліджували, а

ацетонітрильну витяжку доводили насиченим розчином натрію гідроксиду до РН 9-10 (за універсальним індикатором) і проводили екстракцію діетиловим ефіром двічі (100 та 50 мл). Ефірну витяжку частково випаровували при кімнатній температурі, переносили до мірної колби та доводили до позначки зазначенним органічним розчинником.

Отримані таким чином екстракти з біологічного матеріалу містили значну кількість супутніх домішок, які потім видаляли за допомогою додаткового екстракційного очищення. Для цього хлороформні екстракти переносили 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 ефіром, відкидаючи фазу органічного розчинника. Після цього кислий водний залишок підлуговували 20% розчином натрію гідроксиду до pH 11-12 і тричі екстрагували амітроптилін хлороформом по 10 мл кожного разу. Хлороформні витяжки фільтрували через фільтр з 0,5 г безводного натрію сульфату у мірну колбу об'ємом 50 мл і доводили до позначки хлороформом.

Ізоляція амітроптиліну з печінки ацетоном (метод В.А.Карташова). 5 г гомогенізованої тканини внутрішніх органів (печінки людини, яка загинула від травми) переносили до пеніцилінового флакону об'ємом 20 мл, додавали 5 мл ацетону; суміш перемішували, закривали поліетиленовою пробкою та струшували на апараті для струшування рідин протягом 10 хв. Потім вміст флакону центрифугували протягом 5 хв при швидкості 2500 об/хв і надосадову рідину зливали через невеличкий ватний тампон у флакон об'ємом 50 мл. Операцію настоювання повторювали ще тричі. До об'єднаних ацетонових витяжок додавали 20 мл 0,5 М розчину кислоти хлоридної та екстрагували н-гексаном двічі по 10 мл кожного разу. Органічну фазу відокремлювали та відкидали. З водної фази проводили екстракцію діетиловим ефіром двічі по 10 мл кожного разу. Шар органічного розчинника відокремлювали, відкидали і у подальшому не досліджували. Кислу водну витяжку, що залишилась, підлуговували 10% розчином натрію гідроксиду до pH 11, додавали 5 г натрію хлориду і екстрагували амітроптилін хлороформом двічі по 10 мл кожного разу. Хлороформні витяжки об'єднували, фільтрували через паперовий фільтр, який вміщував 0,5 г безводного натрію сульфату, переносили в мірну колбу на 50 мл та доводили зазначенним розчинником до позначки. Отримані екстракти з біологічного матеріалу додатково очищували від домішок екстракційним методом, як описано вище.

Після цього проводили ідентифікацію та кількісне визначення амітроптиліну в отриманих екстрактах.

Виявлення амітроптиліну в екстрактах за методом ТШХ проводили з використанням скляних хроматографічних пластиинок для ВЕТШХ (силікагель КСКГ, фракція 5-20 мкм, товщина шару 130 ± 25 мкм, розмір 20×20 см, виробництво Естонії), Сорбфіл (силікагель ПТСХ-П-А, фракція 5-17 мкм, розмір 10×10 см), Merck (Silica gel 60 F254, розмір 10×20 см). 25-35 мл хлороформної витяжки випаровували до мінімального об'єму (0,05 мл) і наносили в одну точку на лінію старту хроматографічної пластиинки. На відстані 2 см від вказаної точки наносили розчин "свідка" амітроптиліну (10 мкг у пробі). У третю точку наносили 5 мл випареної витяжки, одержаної у "холостому" досліді. Хроматограми розвивали послідовно з використанням двох систем рухомих розчинників: хлороформ і метанол — амонію гідроксид 25% розчин (100:1,5). Після цього пластиинки висушували на повітрі і проявляли за допомогою реактиву Драгендорфа у модифікації за Мунье (жовтогарячий колір плям амітроптиліну на жовтому фоні; чутливість виявлення амітроптиліну складала 0,5 мкг препарату у пробі). Плями амітроптиліну, виділеного з печінки, та амітроптиліну-стандарту за величинами Rf співпадали та складали у системі рухомих розчинників метанол — амонію гідроксид 25% розчин (100:1,5) $0,57\pm0,02$ (для пластиинок ВЕТШХ), $0,61\pm0,02$ (для пластиинок Сорбфіл), $0,35\pm0,02$ (для пластиинок Merck). Витяжки з "холостих" дослідів не давали плям з вказаними значеннями Rf.

Підтвердження присутності амітроптиліну в екстрактах проводили також УФ-спектроскопічним методом. Для цього елюювали амітроптилін з непроявленої смуги хроматограми на рівні, що відповідав місцю знаходження плями "свідка" амітроптиліну, етанолом. УФ-спектр одержаного розчину був аналогічним спектру розчину стандарту амітроптиліну в етанолі та мав смугу поглинання при $\lambda_{max} = 238\pm2$ нм.

При виявленні амітроптиліну у витяжках за допомогою кольорових реакцій використовували кислоту сульфатну концентровану (спостерігали жовтогаряче забарвлення), реактиви Маркі (коричневе забарвлення, яке переходить у жовтогаряче), Фреде (цегляно-червоне забарвлення, яке переходить у зелене), Манделіна (коричневе забарвлення, яке переходить у зелене). Паралельно проводили контрольні досліди зі стандартним розчином амітроптиліну в хлороформі (20 мкг/мл) та витяжкою з "холостого" досліду.

Кількісне визначення амітроптиліну у витяжках проводили екстракційно-фотометричним методом за реакцією утворення іонних асоціатів препарату з метиловим оранжевим та розрахуву-

Таблиця

Результати екстракційно-фотометричного визначення амітриптиліну, виділеного з печінки підкисленим ацетонітрилом (метод І.Шедзінської) та нейтральним ацетоном (метод В.А.Карташова)

Метод ізолювання	Додано амітриптиліну, мкг (до m г печінки)	Виділено амітриптиліну		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
Підкисленим ацетонітрилом (метод І.Шедзінської)	100 ($m = 20$)	28,4	28,4	$\bar{X} = 29,80$ $S = 2,03$ $S_{\bar{X}} = 0,91$ $\Delta X = 2,52$ $\varepsilon = 8,47$ $\bar{X} \pm \Delta X = 29,80 \pm 2,52$
		32,6	32,6	
		31,0	31,0	
		27,5	27,5	
		29,5	29,5	
Нейтральним ацетоном (метод В.А.Карташова)	100 ($m = 5$)	37,5	37,5	$\bar{X} = 34,50$ $S = 2,28$ $S_{\bar{X}} = 1,02$ $\Delta X = 2,83$ $\varepsilon = 8,20$ $\bar{X} \pm \Delta X = 34,50 \pm 2,83$
		33,2	33,2	
		35,7	35,7	
		32,0	32,0	
		36,1	36,1	

вали вміст амітриптиліну в екстрактах за допомогою градуувального графіка. Для побудови градуувального графіка використовували стандартний розчин амітриптиліну в хлороформі, що містив 100 мкг препарату в 1 мл. У дільниці лійки вносили по 5 мл ацетатного буферного розчину з pH 4,6, по 5 мл 0,05% розчину метилового оранжевого 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; 1,2; 1,4 мл стандартного розчину амітриптиліну. Додавали хлороформ до загального об'єму органічного розчинника 15 мл. Суміш у дільницях лійках збовтували протягом 5 хв за допомогою апарата для струшування рідин і залишали на 10 хв для розділення фаз. Збиравали по 14 мл хлороформних витяжок, відкидаючи їх перші порції (блізько 1 мл), до яких додавали по 2 мл 1% розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі.

Оптичну густину отриманих розчинів, забарвлених у червоний колір, вимірювали за допомогою фотоелектроколориметра КФК-2 (світлофільтр зелений з $\lambda_{ef} = 540 \pm 10$ 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 концентрацій від 5 до 140 мкг амітриптиліну в 14 мл кінцевого об'єму. Відносна помилка кількісного визначення не перевищувала 3%.

Результати та їх обговорення

При ізолюванні амітриптиліну з біологічного матеріалу підкисленим ацетонітрилом за методом І.Шедзінської та нейтральним ацетоном за методом В.А.Карташова було встановлено, що отримані біологічні екстракти містили деяку кількість домішок, присутність яких була небажаною для подальшого виявлення та кількісного визначення

досліджуваної "лікарської" отрути. Так, результати вимірювань показників оптичної густини, отримані екстракційно-фотометричним методом з метиловим оранжевим для екстрактів з "холостих" дослідів за наведеними вище методами ізолювання, становили, відповідно, 0,12-0,16 та 0,06-0,10.

Для видалення супутніх домішок проводили додаткове екстракційне очищення витяжок за методикою, наведеною вище. Але у випадку, коли екстракти з біологічного матеріалу вміщували значну кількість співекстрактивних речовин, вони заважали процесу хроматографування (розтягнуті плями амітриптиліну разом з співекстрактивними речовинами навіть після додаткового екстракційного очищення). 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 хлороформом (фронт розчинника 8 см). Попередніми дослідами з витяжками з "холостих" проб біологічного матеріалу, а також зі стандартним розчином амітриптиліну, нанесеними на хроматографічну пластинку, було встановлено, що співекстрактивні речовини при цьому мігрували до фінішу, а плями амітриптиліну залишались на лінії старту (плями співекстрактивних речовин і амітриптиліну проявлялися за допомогою реактиву Драгендорфа в модифікації за Мунье). Хроматографічні пластинки з очищеними таким чином пробами амітриптиліну з біологічного матеріалу далі використовували для виявлення препарату за методом ТШХ та після елюювання амітриптиліну з хроматографічної пластинки за УФ-спектрами.

Додаткового екстракційного очищення було достатньо для проведення кольорових реакцій та екстракційно-фотометричного визначення амітриптиліну в екстрактах, яке проводили на фоні "холо-

стих" дослідів. Їх оптична густина після додаткового екстракційного очищення не перевищувала 0,03–0,04 в області спектра, що відповідала максимуму світлопоглинання забарвлених розчинів іонних асоціатів амітриптиліну з метиловим оранжевим.

Результати кількісного визначення амітриптиліну, виділеного з печінки за методами І.С shedзінські та В.А.Карташова, наведені в таблиці.

Як видно, за допомогою запропонованих методик з печінки можна виділити $29,80 \pm 2,52\%$ та $34,50 \pm 2,83\%$ амітриптиліну відповідно.

ВИСНОВКИ

1. Вивчено роздільну спроможність відносно амітриптиліну методів ізолявання "лікарських"

отрут підкисленим ацетоніトリлом (метод І.С shedzінські) та нейтральним ацетоном (метод В.А.Карташова), які дозволили виділити відповідно $29,80 \pm 2,52\%$ та $34,50 \pm 2,83\%$ амітриптиліну.

2. Показана можливість використання методу тонкошарової хроматографії, кольорових реакцій, УФ-спектроскопії для виявлення амітриптиліну, виділеного з біологічного матеріалу, після попередньої додаткової очистки витяжок від супутніх домішок за допомогою методів екстракції та ТШХ. Отримані результати можуть бути використані для судово-токсикологічних досліджень біологічного матеріалу при смертельних отруєннях амітриптиліном.

ЛІТЕРАТУРА

1. Крамаренко В.П. Токсикологічна хімія. — К.: Вища шк., 1995. — 423 с.
2. Николаева Э.Г. // СМЭ. — 1990. — Т. 33, №1. — С. 39-40.
3. Чернова Л.В., Карташов В.А. // СМЭ. — 1989. — №2. — С. 56-57.
4. Bateman N.D. Antidepressants: Poisonous substances. — Amsterdam: Elsevier, 2007. — P. 587-589.
5. Carson H.J. // J. Leg. Med. — 2007. — Vol. XXX. — P. 1-4.
6. Clark's analysis of Drugs and Poisons. 3-rd Ed. — Pharmaceutical Press, 2005 (CD).
7. 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.
8. Jonsson A., Holmgren P., Ahlner J. // Forens. Sci. Int. — 2004. — Vol. 143. — P. 53-59.
9. Poisoning & Drug Overdose. 4-th Ed. / Ed. K.R.Olson. — Zange Medical Books, Mc Graw-Hill, 2004. — P. 88-93.
10. Randall C.B. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. — California, Foster City: Chemical Toxicological Institute, 2000. — 919 p.
11. Sampson S.M. // Mayo Clin. Proc. — 2001. — №76. — P. 739.
12. Szredzinski I. // Arch. Med. Sad. Krymin. — 1978. — Vol. 28. — P. 199.

УДК 615.065:547.728.54.061/062]001.8

ИЗОЛИРОВАНИЕ АМИТРИПТИЛИНА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА АМФИФИЛЬНЫМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ

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

Установлена степень изолирования амитриптилина из биологического материала подкисленным ацетонитрилом и нейтральным ацетоном, которая составила $29,80 \pm 2,52\%$ и $34,50 \pm 2,83\%$ соответственно. Показана возможность использования метода тонкослойной хроматографии, цветных реакций, УФ-спектроскопии для обнаружения амитриптилина, выделенного из биологического материала, после предварительной дополнительной очистки вытяжек от сопутствующих примесей с помощью методов экстракции и ТШХ. Количественное содержание препарата в экстрактах устанавливали экстракционно-фотометрическим методом по реакции образования ионного ассоциата с кислотным азокрасителем метиловым оранжевым. Светопоглощение окрашенных растворов подчинялось закону Бугера-Ламберта-Бера в пределах концентраций от 5 до 140 мкг амитриптилина в 14 мл конечного объема. Относительная ошибка количественного определения не превышала 3%. Полученные результаты могут быть использованы для судебно-токсикологических исследований биологического материала при смертельных отравлениях амитриптилином.

UDC 615.065:547.728.54.061/062]001.8

ISOLATION OF AMITRIPTYLINE FROM THE BIOLOGICAL MATERIAL BY AMPHIPHILIC SOLVENTS

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

The degree of amitriptyline isolation from the biological material by acidified acetonitrile and neutral acetone, which was $29,80 \pm 2,52\%$ and $34,50 \pm 2,83\%$, respectively, has been determined. The possibility of application of the Thin Layer Chromatography method, colour reactions, UV-spectroscopy for detection of amitriptyline isolated from the biological material after the previous 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 photometry method using the reaction of ion associate with the acid azodye — methyl orange. The light absorbance of coloured solutions was submitted to the Bouguer-Lambert-Beer law within the concentrations from 5 to 140 mkg of amitriptyline in 14 ml of the final volume. The relative error of the quantitative determination did not exceed 3%. The results obtained may be used for forensic and toxicological examinations of the biological material in lethal amitriptyline poisonings.