ФАРМАКОКІНЕТИКА

ЛАБОРАТОРНО-ТОКСИКОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ГОСТРИХ ОТРУЄНЬ АМІТРИПТИЛІНОМ

С.В.Баюрка, С.А.Карпушина, В.С.Бондар, В.І.Степаненко

Національний фармацевтичний університет

Ключові слова: антидепресанти; амітриптилін; біологічні рідини; тонкошарова хроматографія; електрофорез; УФ-спектроскопія; екстракційна фотометрія

Розроблені ефективні методики рідинно-рідинної екстракції амітриптиліну з біологічних рідин хлороформом із лужного середовища при pH 12. Попередньо проводили осадження білкових домішок 10% розчином кислоти хлоридної (сеча) або 10% розчином кислоти трихлорацетатної (кров) з наступним екстрагуванням супутніх речовин діетиловим ефіром з кислого середовища. Ідентифікацію амітриптиліну в отриманих біологічних екстрактах проводили за допомогою кольорових реакцій з кислотою сульфатною, реактивами Маркі, Фреде, Манделіна, тонкошарової хроматографії в системах розчинників метанол — амонію гідроксид 25% розчин (100:1,5) (0,57±0,02 (ВЕТШХ), 0,61±0,02 (Сорбфіл), 0,35±0,02 (Merck)), н-бутанол — кислота ацетатна — вода (4:1:1) (Rf 0,60±0,02, 0,61±0,02, 0,51±0,02, відповідно), електрофорезу на папері в 10% розчині кислоти ацетатної, УФ-спектроскопії після елюювання препарату з фореграм етанолом (λ_{max}=238±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 78,5 ±3,9%, а з крові — 58,9±3,8% препарату.

Амітриптилін — 10,11-дигідро-5-(3'-N, N-диметиламінопропіліден)-5-N-дибензоциклогептану гідрохлорид — трициклічний антидепресант, який широко застосовується у сучасній медичній практиці не тільки для корекції розладів психічного стану [3, 5], а й у комбінації з аналгетиками, у лікуванні хронічних больових синдромів різного походження [1, 18, 19], для зняття депресивного стану при лікуванні алкоголізму [4], опіоїдної та героїнової залежності [6, 8, 10].

Широке коло застосування препарату зумовлює його відносну доступність, що неодноразово було причиною гострих отруєнь [24]. При цьому, за даними літератури, причиною більшості гострих отруєнь амітриптиліном були суїцидальні наміри [21], а також передозування у випадках токсикоманії, у тому числі серед підлітків [14, 20]. Враховуючи відносно високу токсичність трициклічних антидепресантів серед препаратів даної фармакологічної групи, більшість гострих отруєнь амітриптиліном мають летальні наслідки [21]. Він має досить вузький терапевтичний індекс, і доза, менша за 10 терапевтичних денних доз вказаного антидепресанта, може викликати гостре отруєння. Так, добова терапевтична доза амітриптиліну складає 70-200 мг для дорослих, а надходження до організму 10-20 мг/кг препарату per os може викликати отруєння, яке загрожує життю [21]. Токсична концентрація амітриптиліну в плазмі крові становить 0,4 мкг/мл, а смертельна — 10,0-20,0 мкг/мл [9]. Головними симптомами отруєння амітриптиліном є аритмія, судоми, гіпотензія, гіпертермія, розширення зіниць, сухість шкіри та слизових оболонок, кома [21]. При цьому клінічна картина отруєння амітриптиліном нехарактерна, тому важливе значення для діагностики отруєнь мають результати лабораторно-токсикологічного дослідження біологічних рідин. Однак методи хіміко-токсикологічного аналізу біологічних об'єктів на амітриптилін розроблені недостатньо.

Запропоновані методики виявлення та кількісного визначення амітриптиліну в лікарських формах [22] та у плазмі крові [12] методами високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з УФ-детектором, ВЕРХ після твердофазної екстракції з сироватки крові [15], ВЕРХ у комбінації з мас-

С.В.Баюрка — канд. фармац. наук, доцент кафедри токсикологічної хімії Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

спектрометрією (МС) з хімічною або електророзпилювальною іонізацією [17, 23], а також з використанням методики on-line: твердофазна екстракція — рідинна хроматографія — тандемна масспектрометрія (ТФЕ-РХ-МС/МС) [11], а також методики розділення та кількісного визначення амітриптиліну у присутності інших антидепресантів за допомогою капілярного електрофорезу у плазмі крові [13] та лікарських формах [16]. Наведені методики характеризуються дуже значною чутливістю та специфічністю, але потребують ретельної пробопідготовки та спеціального дорогого обладнання і здебільшого недоступні.

Запропоновані імунологічні тести [25] для швидкої лабораторної діагностики отруєнь трициклічними антидепресантами, але імунохімічний метод, який є високочутливим, характеризується недостатньою специфічністю та потребує підтвердження отриманих результатів за допомогою інших хімічних та фізико-хімічних методів [12].

Наведений у літературі простий та доступний метод виділення амітриптиліну з біологічних рідин за допомогою рідинно-рідинної екстракції [7] потребує деякого уточнення чутливості методики подальшого кількісного визначення амітриптиліну в екстрактах за допомогою екстракційної фотометрії з бромфеноловим синім.

Таким чином, метою наших досліджень було вдосконалення методики виділення амітриптиліну з крові та сечі за допомогою рідинно-рідинної екстракції з подальшим виявленням та кількісним визначенням амітриптиліну в отриманих біологічних екстрактах. Для виявлення амітриптиліну в екстрактах із сечі та крові використовували кольорові реакції, тонкошарову хроматографію (ТШХ), електрофорез на папері та УФ-спектроскопію [15]. Кількісне визначення проводили за допомогою апробованої нами щодо амітриптиліну методики екстракційної фотометрії з метиловим оранжевим — азобарвником, який у теперішній час досить широко використовується у хімікотоксикологічному аналізі лікарських речовин [2].

Матеріали та методи

Методика ізолювання амітриптиліну з сечі. До 50 мл сечі людини додавали від 200 до 1000 мкг амітриптиліну і суміш залишали на 24 год. Після цього до сечі додавали 10% розчин кислоти хлоридної до одержання pH 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 50% розчину натрію гідроксиду до pH 12 і тричі екстрагували амітриптилін 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.

При виявленні амітриптиліну у витяжках за допомогою кольорових реакцій використовували кислоту сульфатну концентровану (спостерігали оранжеве забарвлення), реактиви Маркі (коричневе → оранжеве), Фреде (цеглясточервоне → зелене), Манделіна (коричневе → зелене). Паралельно проводили контрольні досліди зі стандартним розчином амітриптиліну в хлороформі (20 мкг/мл) та витяжкою з "холостого" досліду.

Виявлення амітриптиліну в екстрактах методом ТШХ проводили з використанням хроматографічних пластинок для ВЕТШХ (20х20 см), Сорбфіл ПТСХ-П-А (10х10 см), Merck Silica gel 60 F_{254} (10х20 см); 5 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 5 мл досліджуваної біологічної рідини. На відстані 2 см від вказаної точки наносили розчин "свідка" амітриптиліну (10 мкг у пробі). У третю точку наносили 5 мл випареної витяжки, одержаної у "холостому досліді". Хроматограми розвивали у системі рухомих розчинників, перелічених нижче. Після цього пластинки висушували на повітрі і проявляли за допомогою реактиву Драгендорфа у модифікації за Муньє (оранжевий колір на жовтому фоні; чутливість виявлення амітриптиліну складає 0,5 мкг препарату у пробі). Плями амітриптиліну, виділеного з сечі, та амітриптиліну-стандарту за величинами Rf співпадали та складали у системі рухомих розчинників метанол — амонію гідроксид 25% розчин (100:1,5) 0,57±0,02 (ВЕТШХ), 0,61±0,02 (Сорбфіл), 0,35±0,02 (Merck) і у системі н-бутанол — кислота ацетатна — вода (4:1:1), відповідно, 0,60±0,02, 0,61±±0,02, 0,51±0,02. Витяжки з "холостих" дослідів не давали плям з вказаними значеннями Rf.

Для електрофоретичного виявлення і очистки витяжок використовували смуги хроматографічного паперу FN5 розміром 200х80 мм, на яких відмічали три доріжки. На першу з них наносили 5 мкл хлороформного розчину "свідка", що вміщував 10 мкг амітриптиліну у пробі, на другу — 10 мл упареної до мінімального об'єму хлороформної витяжки з біологічної рідини, а на третю доріжку — витяжку, одержану у "холостому" досліді. Електрофорез проводили на приборі ПЕФ-3. Як електроліт використовували 10% розчин кислоти ацетатної. Смугу паперу з нанесеними пробами вміщували в електроліт, залишаючи незмоченою частину фореграми на відстані 10 мм від лінії старту. Залишок електроліту видаляли за допомогою фільтрувального паперу. Незмочену частину смуги зволожували обприскуванням з пульверизатора вказаним електролітом. Електрофорез проводили протягом 60 хв при напрузі 400 В. Фореграму висушували на повітрі при кімнатній температурі і проявляли плями амітриптиліну реактивом Драгендорфа в модифікації Муньє. Пля-

Таблиця 1

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

Додано амітриптиліну до 50 мл сечі, мкг	Виділено амітриптиліну		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
200	164,8	82,4	$\bar{X}$ = 78,5 S = 3,2 $S_{\bar{x}}$ = 1,4 $\Delta\bar{X}$ = 3,9 ε = 5,0% $\bar{X}\pm\Delta\bar{X}$ = 78,5±3,9
300	241,8	80,6	
500	384,0	76,8	
700	548,1	78,3	
1000	743,0	74,3	

ми амітриптиліну, виділеного з біологічної рідини (друга доріжка), за величиною довжини шляху форезу відповідали плямам "свідка" (78-80 мм). Витяжки з "холостих" дослідів не давали плям на вказаному рівні.

Підтвердження присутності амітриптиліну в екстрактах проводили також УФ-спектроскопічним методом. Для цього вирізали непроявлену частину фореграми розміром 20х30 мм на другій доріжці на рівні, що відповідає місцезнаходженню плям амітриптиліну, подрібнювали її і елюювали на протязі 5 хв 3 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної. УФ-спектр одержаного розчину був аналогічним спектру розчину стандарту амітриптиліну та мав смугу поглинання при λ_{max}=238±2 нм.

Кількісне визначення амітриптиліну у витяжці проводили екстракційно-фотометричним методом за реакцією утворення іонних асоціатів препарату з метиловим оранжевим та розраховували вміст амітриптиліну в екстрактах за допомогою градуювального графіка.

Для побудови градуювального графіка використовували стандартний розчин амітриптиліну в хлороформі, що містив 100 мкг препарату в 1 мл.

У ділильні 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 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 мл стандартного розчину амітриптиліну. Додавали хлороформ до загального об'єму органічного розчинника 15 мл. Суміш у ділильних лійках збовтували протягом 5 хв за допомогою механічного збовтувача 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 1% розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі.

Оптичну густину отриманих розчинів, забарвлених у червоний колір, вимірювали за допомогою фотоелектроколориметра КФК-2 (світлофільтр зелений $\lambda_{еф}$=540± ±10 нм; кювета з товщиною шару рідини 10 мм). В якості розчину порівняння використовували "холостий" дослід (метиловий оранжевий не екстрагується хлороформом в інтервалі pH від 3 до 7 [2]).

Світлопоглинання забарвлених розчинів підлягало закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 5 до 140 мкг амітриптиліну в 14 мл кінцевого об'єму.

Методика ізолювання амітриптиліну з крові. До 10 мл донорської крові додавали водні розчини препарату, які вміщували від 50 до 200 мкг амітриптиліну, перемішували і залишали на добу. Через добу до 10 мл модельної суміші амітриптиліну з кров'ю додавали 10 мл 10% розчину кислоти трихлорацетатної 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 pH 12 50% розчином натрію гідроксиду,тричі екстрагували амітриптилін 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.

Виявлення та кількісне визначення амітриптиліну, виділеного з крові, проводили так, як зазначено вище для сечі.

Таблиця 2

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

Додано амітриптиліну до 10 мл крові, мкг	Виділено амітриптиліну		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
50	29,4	58,7	$\bar{X}$ = 58,9 S = 3,1 $S_{\bar{x}}$ = 1,4 $\Delta\bar{X}$ = 3,8 ε = 6,4% $\bar{X}\pm\Delta\bar{X}$ = 58,9±3,8
75	41,4	55,2	
100	57,2	57,2	
150	95,0	63,3	
200	120,4	60,2	

Результати та їх обговорення

Під час розробки методик виділення амітриптиліну з сечі та крові було встановлено необхідність попереднього видалення супутніх речовин з біологічних рідин, для чого білкові домішки осаджували додаванням 10% кислоти хлоридної (сеча) або 10% кислоти трихлорацетатної (кров) з наступним центрифугуванням та екстрагували залишки супутніх речовин діетиловим ефіром з кислого середовища. У разі відсутності етапу очищення при ізолюванні амітриптиліну з крові та сечі під час екстракції препарату органічними розчинниками з луж-

ного середовища утворювались стійкі емульсії.

Застосовані нами кольорові реакції, методи ТШХ та електрофорезу на папері, УФ-спектроскопії (після додаткового електрофоретичного очищення) виявилися досить чутливими для виявлення досліджених нами меж концентрацій амітриптиліну в біологічних рідинах.

Екстракційно-фотометричне визначення амітриптилину в одержаних за наведеною методикою хлороформних екстрактах проводили без попереднього очищення, бо оптична густина розчинів, одержаних у "холостих" дослідах, не перевищувала 0,03-0,05 в області спектра, яка відповідала максимуму світлопоглинання забарвлених розчинів іонних асоціатів амітриптиліну з метиловим оранжевим.

Результати кількісного визначення амітриптиліну, виділеного з сечі та крові, наведені у табл. 1 та 2, відповідно. Як видно, за допомогою запропонованих методик рідинно-рідинної екстракції з лужного середовища хлороформом можна виділити з сечі 78,5± ±3,9%, а з крові — 58,9±3,8% амітриптиліну, що свідчить про ефективність розроблених методик.

ВИСНОВКИ

1. Розроблені ефективні методики рідинно-рідинної екстракції амітриптиліну з біологічних рідин хлороформом з лужного середовища, які дозволяють виділити з сечі 78,5±3,9%, а з крові — 58,9±3,8% препарату.

2. Доведена можливість використання кольорових реакцій, ТШХ, електрофорезу на папері, УФ-спектроскопії, екстракційної фотометрії для виявлення та визначення амітриптиліну в одержаних біологічних екстрактах.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Ершова Е.М. Применение антидепрессантов при депрессивных расстройствах у больных с хроническим болевым синдромом: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М.: Гос. научн. центр соц. и суд. психиатрии, 2004. — 25 с.*
2. *Жебентяев А.И., Арзамасцев А.П. //Фармация. — 1993. — №5. — С. 63-71.*
3. *Крыжановский С.А., Вититнова М.В. Полный современный справочник лекарственных препаратов: Практ. руковод. 2-е изд., перераб. и доп. — М.: РИПОЛ КЛАССИК, 2002. — 1216 с.*
4. *Лекции по наркологии: 3-е изд., перераб. и расшир. / Под ред. Н.Н.Иванец. — М.: Медпрактика, 2001. — 343 с.*
5. *Машковский М.Д. Лекарственные средства. 15-е изд. — М.: ООО "Изд-во Новая Волна", 2006. — С. 412.*
6. *Мишнев В.Д. //Журн. практ. лікаря. — 2004. — №2. — С. 27-30.*
7. *Николаева Е.Г. //СМЭ. — 1980. — Т. 23, №4. — С. 40-41.*
8. *Рохлина М.Л. //Наркол. — 2005. — №12. — С. 36-39.*
9. *Селезнев Е.Ф. //Фармация. — 1985. — №4. — С. 80-85.*
10. *Сиволап Ю.П., Савченков В.А., Янушкевич М.В. та ін. //Нарколог. — 2005. — №3. — С. 21-25.*
11. *Castro A., Fernandez M.d.M.R., Laloup M. et al. //J. Chromatogr. A. — 2007. — Vol. 1160, №1. — P. 3-12.*
12. *Clark's analysis of Drugs and Poisons. 3-rd Ed. — Pharmaceutical Press, 2005 (CD).*
13. *Delmar C.M., Sandro H., Costa Q. M.E. et al. //J. Chromatogr. B. — 2004. — Vol. 799, №1. — P. 127-132.*
14. *FDA создаст независимый комитет по контролю безопасности лекарств //Химич. журн. — 2005. — №3. — С. 18.*
15. *Frahnert Ch. Luise R.M., Grasmader K. //J. Chromatogr. B. — 2003. — Vol. 794, №1. — P. 35-47.*
16. *Hwang-Shang K., Cheng-Chung Ch., Yu-Hua H. et al. //Anal. Chim. Acta. — 2004. — Vol. 525, №1. — P. 23-30.*
17. *Kagan M., Chlenov M., Kraml C.M. //J. Chromatogr. A. — 2004. — Vol. 1033, №2. — P. 321-331.*
18. *Kenneth J.C., Erin O.L. St. //Pain Pract. — 2003. — Vol. 3, №2. — P. 135-143.*
19. *Lynch M.E., Clark A.J., Sawynok J. et al. //J. of Pain. — 2005. — Vol. 6, №10. — P. 644-649.*
20. *Okulicz-Kozaryn K., Borucka A., Koson K. //Alk. i narkomania. — 2006. — 19, №1. — C. 35-52.*
21. *Poisoning & Drug Overdose. 4-th Ed. / Ed. by Kent R.Olson. — Zange Medical Books, Mc Graw-Hill, 2004. — P. 88-93.*
22. *Ruiz-Angel M.J., Carda-Broch S., Simo-Alfonso E.F. et al. //J. Pharm. and Biomed. Anal. — 2003. — Vol. 32, №1. — P. 71-84.*
23. *Shinozuka T., Terada M., Tanaka E. //Forens. Sci. Int. — 2006. — №162. — P. 108-112.*
24. *Vucinic S. //J. Toxicol. Clin. Toxicol. — 2004. — Vol. 42, №4. — P. 552-553.*
25. *Wu Alan H.B., Mc Kay Ch., Broussard L. et al. //Clin. Chem. — 2003. — Vol. 49, №3. — P. 357-379.*

Адреса для листування: 61118, м. Харків,
вул. Блюхера, 4. Тел. (0572) 67-91-92.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 12.05.2008 р.