

## ДІАГНОСТИКА СМЕРТЕЛЬНИХ ОТРУЄНЬ АМІТРИПТИЛІНОМ ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ СУДОВО-ТОКСИКОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

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

Національний фармацевтичний університет

*Ключові слова: антидепресанти; амітриптилін; біологічний матеріал; тонкошарова хроматографія; кольорові реакції; УФ-спектроскопія; екстракційна фотометрія*

*Вивчено розрізняючу спроможність відносно амітриптиліну загальноприйнятих у судово-токсикологічному аналізі методів ізолювання "лікарських" отрут за методами О.О.Васильєвої, Стаса-Отто, В.П.Крамаренка, які дозволили виділити, відповідно,  $15,84 \pm 1,49\%$ ,  $11,46 \pm 1,08\%$ ,  $9,60 \pm 1,43\%$  амітриптиліну. Показана можливість використання методу тонкошарової хроматографії (ТШХ), 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. 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 амітриптиліну 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 амітриптиліном.*

Антидепресанти поряд з опіатами, бензидіазепінами та етанолом [7], а також іншими психоактивними речовинами (аналгетиками, анксиолітиками) [9] є причиною більшості комбінованих лікарських отруєнь з летальним кінцем. При цьому серед антидепресантів група трициклічних сполук характеризується досить високою токсичністю, що обумовлено їх вузьким терапевтичним індексом та серйозними побічними ефектами [6, 10].

Одним з сучасних трициклічних антидепресантів, який знайшов широке застосування в медичній практиці [2, 3], є амітриптилін — 10,11-дигідро-5-(3'-N, N-диметиламінопропіліден)-5-N-добензоциклопентану гідрохлорид. Так, у 10% посмертних розтинів, що були проведені в ході судово-токсикологічних досліджень з приводу комбінованих лікарських отруєнь, були встановлені токсичні та смертельні концентрації амітрипти-

ліну в біологічних об'єктах [9]. При цьому смертельна доза амітриптиліну складала 10-20 мг/кг препарату per os [10], смертельна концентрація в плазмі крові становила 10,0-20,0 мкг/мл [11].

Через те, що більшість гострих отруєнь амітриптиліном має летальний кінець, а симптоматика отруєнь цим препаратом нехарактерна [10], важливе значення має розробка методів аналізу біологічного матеріалу (органів трупа) на вміст у них амітриптиліну.

Слід відмітити, що при судово-токсикологічних дослідженнях біологічного матеріалу у випадках комбінованих лікарських отруєнь або при відсутності припущень про природу лікарського засобу доцільно використовувати загальноприйняті у судово-токсикологічному аналізі методи ізолювання лікарських сполук [1, 8].

У літературі наведені деякі дані за методами ізолювання амітриптиліну з біологічного мате-

ріалу [4, 5]. Але вони потребують систематизації та уточнень, так як наведені методики містять деякі модифікації загальноприйнятих методів ізолювання "лікарських" отрут стосовно амітриптиліну.

Таким чином, метою наших досліджень було встановлення розрізняючої спроможності загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів ізолювання лікарських сполук з біологічного матеріалу відносно амітриптиліну: екстракцією водою, підкисленою кислотою оксалатною (метод Васильєвої О.О.), екстракцією етанолом, підкисленим кислотою оксалатною (метод Стаса-Отто), екстракцією азотовмісних органічних основ водою, підкисленою кислотою сульфатною (метод Крамаренка В.П.). Виявлення та кількісне визначення амітриптиліну в отриманих екстрактах з біологічного матеріалу проводили за допомогою простих, доступних та ефективних для судово-токсикологічного аналізу методів: тонкошарової хроматогра-

фії (ТШХ), УФ-спектроскопії, кольорових реакцій, екстракційної фотометрії.

**Матеріали та методи**

Подрібнену печінку людини (20 г), яка загинула від травми, вміщували у стакан, додавали 2 мл водного розчину амітриптиліну, який містив 100 мкг препарату. Суміш ретельно перемішували і залишали на 24 години. Паралельно ставили “холості” досліді.

Виділення амітриптиліну з печінки водою, підкисленою кислотою оксалатною, проводили за методом Васильєвої О.О; етанолом, підкисленим кислотою оксалатною — за методом Стаса-Отто; водою, підкисленою кислотою сульфатною — за методом Крамаренка В.П. [1]. При цьому, зменшивши наважку біологічного об’єкта в п’ять разів, об’єми органічних розчинників зменшували вдвічі.

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 підлогували 20% розчином натрію гідроксиду до рН 11-12 і тричі екстрагували амітриптилін 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.

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

При виявленні амітриптиліну у витяжках за допомогою кольо-

рових 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 досліді зі стандартним розчином амітриптиліну в хлороформі (20 мкг/мл) та витяжкою з “холостого” досліді.

Виявлення амітриптиліну в екстрактах за методом ТШХ проводили з використанням скляних хроматографічних пластинок для ВЕТШХ (силікагель КСКГ, фракція 5-20 мкм, товщина шару 130±25 мкм, розмір 20x20 см, виробництво Естонії), Сорбфіл (силікагель ПТСХ-П-А, фракція 5-17 мкм, розмір 10x10 см), Merck (Silica gel 60 F254, розмір 10x20 см); 25-35 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 10 до 14 г досліджуваного біологічного об’єкту. 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 Мунье (жовтогарячий колір плям амітриптиліну на жовтому фоні; чутливість виявлення амітриптиліну складала 0,5 мкг препарату у пробі). Плями амітриптиліну, виділеного з печінки, та амітриптиліну-стандарту за величинами Rf співпадали та склали у системі рухомих розчинників метанол — амонію гідроксид 25% розчин (100:1,5) 0,57±0,02 (для пластинок ВЕТШХ), 0,61±0,02 (для пластинок Сорбфіл), 0,35±0,02 (для пластинок Merck) і у системі н-бутанол — кислота ацетатна — вода (4:1:1), відповідно для зазначених вище хро-

матографічних пластинок, 0,60±0,02, 0,61±0,02, 0,51±0,02. Витяжки з “холостих” дослідів не давали плям із вказаними значеннями Rf.

Підтвердження присутності амітриптиліну в екстрактах проводили також УФ-спектроскопічним методом. Для цього елюювали амітриптилін з непроявленої смуги хроматограми на рівні, що відповідав місцю знаходження плями “свідка” амітриптиліну, етанолом. УФ-спектр одержаного розчину був аналогічним спектру розчину стандарту амітриптиліну в етанолі та мав смугу поглинання при λ<sub>max</sub>=238±2 нм.

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

Для побудови градувального 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 рН 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 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 з λ<sub>еф</sub>=540±10 нм; кювета з товщиною шару рідини 10 мм). В якості розчинів порівняння використовували “холості” досліді (метиловий оран-

Таблиця

**Результати екстракційно-фотометричного визначення  
амітриптиліну, виділеного з печінки за методами  
Васильєвої О.О., Стаса-Отто, Крамаренка В.П.  
(середнє з п'яти визначень)**

Метод ізолювання	Додано амітриптиліну до 20 г печінки, мкг	Виділено амітриптиліну		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
Настоювання з водою, підкисленою кислотою оксалатною (метод Васильєвої О.О.)	100	16,2	16,2	$\bar{X} = 15,84$ $S = 1,20$ $S_{\bar{X}} = 0,53$ $\Delta\bar{X} = 1,49$ $\varepsilon = 9,43$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 15,84 \pm 1,49$
		17,0	17,0	
		14,2	14,2	
		15,0	15,0	
		16,8	16,8	
Настоювання з етанолом, підкисленим кислотою оксалатною (метод Стаса-Отто)	100	12,6	12,6	$\bar{X} = 11,46$ $S = 0,88$ $S_{\bar{X}} = 0,39$ $\Delta\bar{X} = 1,08$ $\varepsilon = 9,42$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 11,46 \pm 1,08$
		11,4	11,4	
		12,1	12,1	
		10,3	10,3	
		10,9	10,9	
Настоювання з водою, підкисленою кислотою сульфатною (метод Крамаренка В.П.)	100	9,4	9,4	$\bar{X} = 9,60$ $S = 1,14$ $S_{\bar{X}} = 0,51$ $\Delta\bar{X} = 1,43$ $\varepsilon = 14,89$ $\bar{X} \pm \Delta\bar{X} = 9,60 \pm 1,43$
		8,7	8,7	
		8,7	8,7	
		11,5	11,5	
		9,7	9,7	

жевий не екстрагується хлороформом в інтервалі рН 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 розробці методів аналізу амітриптиліну в біологічному матеріалі було встановлено, що після ізолювання зазначеного препарату за методами Васильєвої О.О., Стаса-Отто, Крамаренка В.П. отримані біологічні екстракти вміщували значну кількість домішок, які

заважали подальшому виявленню та кількісному визначенню 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, 0,10-0,15; 0,35-0,75; 0,07-0,12.

Для видалення супутніх домішок проводили додаткове екстракційне очищення витяжок за методикою, наведеною вище. Отримані таким чином очищені екстракти використовували для виявлення в них амітриптиліну за методами ТШХ та кольорових реакцій. Ідентифікацію препарату

за УФ-спектрами проводили тільки після додаткового очищення екстрактів методом ТШХ, аналізуючи елюати з хроматограм.

Екстракційно-фотометричне визначення амітриптиліну в одержаних після екстракційного очищення хлороформних екстрактах проводили на фоні "холостих" дослідів, оптична густина яких після додаткового екстракційного очищення не перевищувала 0,03-0,05 в області спектра, що відповідала максимуму світлопоглинання забарвлених розчинів іонних асоціатів амітриптиліну з метиловим оранжевим.

Результати кількісного визначення амітриптиліну, виділеного з печінки за методами Васильєвої О.О., Стаса-Отто, Крамаренка В.П., наведені в таблиці.

Як видно, за допомогою запропонованих методик з печінки можна виділити 15,84±1,49%, 11,46±1,08%, 9,60±1,43% амітриптиліну відповідно.

### ВИСНОВКИ

1. Вивчено розрізняючу спроможність відносно амітриптиліну загальноприйнятих у судово-токсикологічному аналізі методів ізолювання "лікарських" отрут за методами Васильєвої О.О., Стаса-Отто, Крамаренка В.П., які дозволили віділити, відповідно, 15,84±1,49%, 11,46±1,08%, 9,60±1,43% амітриптиліну.

2. Показана можливість використання методу ТШХ, 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. Крыжановский С.А., Вититнова М.В. Полный современный справочник лекарственных препаратов: Практическое руководство. — 2-е изд., перераб. доп. — М.: РИПОЛ КЛАССИКА, 2002. — 1216 С.

3. Машковский М.Д. *Лекарственные средства: 15-е изд.* — М.: ООО “Изд-во Новая Волна”, 2006. — С. 412.
4. Николаева Э.Г. //СМЭ. — 1990. — Т. 33, №1. — С. 39-40.
5. Николаева Э.Г. //Фармація. — 1978. — №5. — С. 37-40.
6. Bateman N.D. *Antidepressants. Poisonous substances.* — Amsterdam: Elsevier, 2007. — P. 587-589.
7. Carson H.J. //J. Leg. Med. — 2007. — Vol. XXX. — P. 1-4.
8. *Clark's analysis of Drugs and Poisons.* — 3-rd Ed. — Pharmaceutical Press, 2005 (CD).
9. Jonsson A., Holmgren P., Ahlner J. //Forens. Sci. Int. — 2004. — Vol. 143. — P. 53-59.
10. *Poisoning & Drug Overdose.* — 4-th Ed. / Edited by Kent R. Olson. — Zange Medical Books, McGraw-Hill, 2004. — P. 88-93.
11. *Randall C.B. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man.* — California, Foster City: Chemical Toxicological Institute, 2000. — 919 p.

Адреса для листування: 61002, м. Харків,  
вул. Пушкінська, 53. Тел. (0572) 67-91-92.  
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 12.05.2008 р.

### **Інформаційне повідомлення відділу фармакологічного нагляду ДП “Державний фармакологічний центр” МОЗ України**

Про підозрювану побічну дію препарату, діючою речовиною якого є **ципрофлоксацин** (Антибактеріальні засоби групи фторхінолонів. Код АТС J01M A02)

Хворій П. (35 років) з діагнозом гострий трахеобронхіт було призначено препарат, діючою речовиною якого є ципрофлоксацин (перорально по 500 мг 2 рази на добу). Одночасно хвора приймала настояйку відхаркувальну. Через 4 дні лікування препаратом, діючою речовиною якого є ципрофлоксацин, у хворой з'явилися нудота, біль в епігастрії, висипання за типом кропив'янки на животі, свербіж. Після відміни препарату, діючою речовиною якого є ципрофлоксацин, зазначені явища минули без наслідків.

Алергологічний анамнез не обтяжений. Будь-які незвичайні реакції на ліки або хімічні речовини в минулому невідомі.

Інформація надійшла від Київського регіонального відділення ДП “Державний фармакологічний центр” МОЗ України.

Про підозрювану побічну дію препарату, діючою речовиною якого є **спіраміцин** (Антибактеріальні засоби для системного застосування. Макроліди. Код АТС J01F A02)

Хворому М. (30 років) з діагнозом гострий бронхіт було призначено препарат, діючою речовиною якого є спіраміцин (по 3000000 МО 2 рази на добу перорально). Одночасно хворий приймав ереспал, АЦЦ лонг. На третій день прийому препарату, діючою речовиною якого є спіраміцин, у хворого з'явилися кропив'янка на шкірі верхньої частини тулуба, відчуття гіркоти в ротовій порожнині, діарея. Препарат, діючою речовиною якого є спіраміцин, було відмінено. Реакцію купірували за допомогою лорано, мультисорбу. Після вжитих заходів зазначені явища минули без наслідків.

Алергологічний анамнез не обтяжений. Будь-які незвичайні реакції на ліки або хімічні речовини в минулому невідомі.

Інформація надійшла від Дніпропетровського регіонального відділення ДП “Державний фармакологічний центр” МОЗ України.