

ANALIZA CHIMICO-TOXICOLOGICĂ A AMITRIPTILINEI

Tamara Cotelea¹, Tatiana Iungu¹, Lilia Stati¹, Efim Arama²

¹Catedra Chimie farmaceutică și toxicologică USMF „N. Testemițanu”

²Catedra Biofizică, Informatică și Fiziologia omului „N. Testemițanu”

Summary

Chemico-toxicological analysis of amitriptyline

There was elaborated optimum isolation and extraction conditions of amitriptyline from biological fluids. We used physico – chemical methods to identify amitriptyline: chromatography on a thin layer by utilizing four systems of solvents, spectrophotometrical method in UV, HPLC. The methods processed by us for in biological tests “in vitro” are specific and reproductive, and they are recommended for the study of amitriptyline in biological fluids.

Rezumat

Au fost determinate condițiile optime de izolare și extragere a amitriptilinei din lichidele biologice. Am aplicat metodele fizico-chimice de identificare a amitriptilinei: cromatografia pe strat subțire utilizând patru sisteme de solvenți, metoda spectrofotometrică în UV, HPLC. Metodele prelucrate de noi pentru amitriptilină în probele biologice „in vitro” sunt specifice și reproductive și ele se recomandă pentru studierea amitriptilinei în lichidele biologice.

Actualitatea

Se utilizează în medicina în caz de depresii majore, pentru tratarea fazei depresive, sindromul ADHD (deficit de atenție și hiperactivitate), enurezis nocturnis, se poate administra în dureri neuropate de cauză necunoscută, atacul de panică. În literatură sunt descrise numeroase metode de izolare, extragere și dozare a substanțelor și preparatelor medicamentoase din materialul biologic. Principiile de bază ale acestor metode au fost aplicate în cercetările acestei lucrări.

Obiectivele

De a efectua studiul în vederea determinării metodelor de izolare, extracție și de purificare, precum și metodele de analiză în UV, cromatografia pe strat subțire (CSS) și cromatografie de înaltă performanță (HPLC).

Materiale și metode

În cadrul cercetărilor s-a folosit amitriptilina în substanță pură. Am utilizat plasma sanguină și urină ca lichide biologice. În lucrare am aplicat metode chimice și fizico-chimice de analiză. Ca reagenți s-au utilizat: cloroformul, acidul sulfuric, alcool etilic 96%, acidul clorhidric, care au fost cu grad de puritate „pur pentru analiză” și „chimic pur”.

Amitriptilina este o pulbere cristalină albă sau aproape albă, fără miros sau cu miros slab aromat, cu gust amar și arzător. Este foarte ușor solubilă în apă și metanol, ușor solubilă în etanol și cloroform, practic insolubilă în eter. Odată cu creșterea numărului de intoxicații în acelaș timp al intoxicațiilor cu amitriptilină este necesară prelucrarea noilor metode de determinare a preparatelor în materialul biologic. În literatură sunt descrise metode multiple de izolare, extragere și identificare a preparatelor din materialul biologic. Aceste principii de lucru au fost aplicate pentru determinarea amitriptilinei din lichidele biologice.

Pentru identificarea amitriptilinei am aplicat metoda CSS folosind placi cromatografice cu conținut de silicagel G. S-au utilizat 4 sisteme de solvenți: - Toluen – acetonă – alcool etilic 96 % - soluție de amoniac 25 % (45:45:7,5: 2,5) ; Benzen – dioxan – soluție de amoniac 25 % (60: 35: 5); Benzen – acetona – eter dietilic – sol de amoniac. (40:60:10:3); cloroform – alcool etilic 96 % (9:1)), pentru care s-a determinat valoarea R_f egală cu 0,83; 0,54; 0,69; 0,43. Ca relevant s-au utilizat reactivul Dragendorff.

0,01 g de amitriptilină se dizolvă în 100 ml cloroform (soluția A). Din soluția A luăm 1 ml și dizolvăm în 10 ml cloroform (soluția B). Pe linia de strat a plăcii se aplică 2 μl soluție B, placa se introduce în camera de cromatografiere și se cromatografiază ascendent în sistemul de solvenți corespunzător, când frontul de solvenți va parcurge 2/3 din lungimea totală a plăcii cromatografice, ultima se scoate din vas, se usucă la aer și se pulverizează cu reactivul Dragendorff sau se prelucrează cu vapori de iod. Spoturile de amitriptilină se colorează în galben-cafeniu. Se determină valorile Rf. Sensibilitatea reacției este de 10 μg/ml. Sensibilitatea metodei ne dă posibilitate să aplicăm această metodă în extrasul organic din lichidul biologic cu conținut de amitriptilină.

Am prelucrat metoda de determinare a amitriptilinei în plasma sanguină și urină după extragere cu cloroform. În scopul izolării amitriptilinei din lichidele biologice au fost folosite amestecuri modele din plasma sanguină. S-au studiat metode de izolare a amitriptilinei cu apa acidulată cu acid sulfuric și acid tricloracetic, precum și gradul de extracție a amitriptilinei cu cloroform în funcție de valoarea pH-ului. Pentru izolarea și extragerea amitriptilinei din plasma sanguină, la 4 ml plasmă se adaugă 2ml soluție amitriptilină 0,02 %, se lasă pe 24 ore, apoi se acidulează cu soluție de acid sulfuric 10 % până la pH 2,0 - 2,5 (hârtia indicator universală). Amestecul se lasă pe 2 ore, agitându-se periodic, apoi se adaugă 3 ml soluție acid tricloracetic 30 % , se agită și se centrifughează timp de 10 minute (5000 rot/min). Centrifugatul se alcalinizează cu soluție de NaOH 10% până la pH 9,0-10,0. Centrifugatul se extrage cu cloroform de 3 ori cu câte 5 ml și extracțiile cloroformice se unesc.

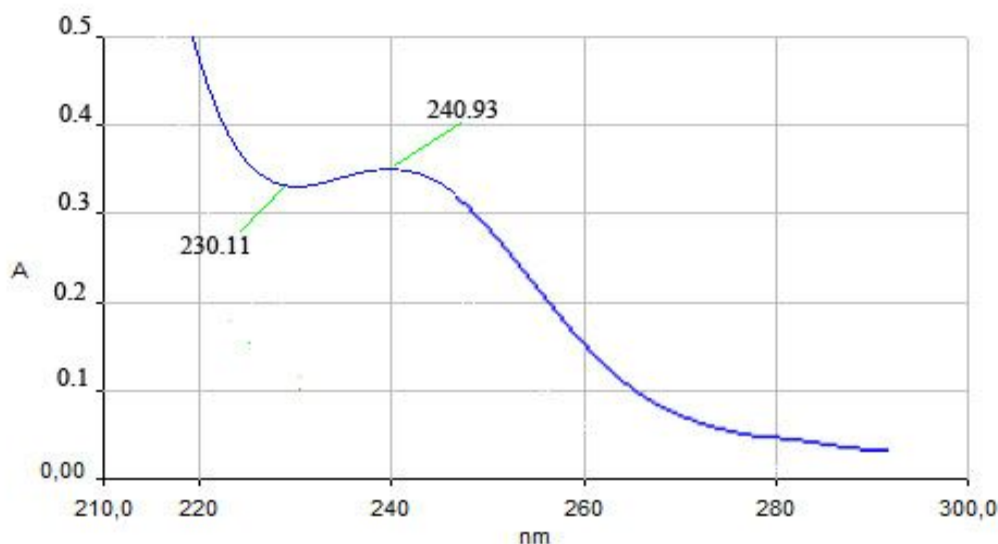


Fig. 1. Spectrul de absorbție al soluției de amitriptilină extrasă cu cloroform din plasma sanguină

În continuare, în extractul cloroformic se determină conținutul de amitriptilină prin metoda spectrofotometrică în UV. Pentru aceasta, 4 ml extract cloroformic se plasează într-un balon cotat cu capacitatea de 10 ml, volumul se aduce cu cloroform la cotă și se citește absorbanta la spectrofotometru, la lungimea de undă 239 ± 2 nm, în cuva cu drumul optic de 10 mm. În calitate de soluție de referință se utilizează cloroformul. Paralel, se analizează proba cu soluție amitriptilină – standard (fig.1)

Prin aceeași metodă se efectuează izolarea și dozarea amitriptilinei din urină (fig. 2).

Conform structurii chimice amitriptilina este un compus ionic. Ținând cont de asemănările de structură și proprietățile chimice ale amitriptilinei cu alcoloizii, ne-am decis să folosim posibilitatea de analiză prin metoda cromatografiei lichide de performanță înaltă (HPLC), folosind o coloana Lichrosorb 100P-8 (4,6 x 250 mm), mărimea particulelor 5 μm; Am utilizat ca eluent amestecul faza mobilă — bifosfat de potasiu- acetoneitril 70:30; (la pH 4 - acid fosforic); Acești eluenți posedă înaltă transparență în regiunea UV și nu conțin impurități, care s-

ar detecta în UV prin picuri nedorite. Prezența acidului în faza mobilă (pH 4) îmbunătățește condițiile de cromatografiere a acizilor carbonici. Condițiile de lucru: faza mobilă A :B: C trietilamină-acid fosforic-apă (0,15:0,25:530), rata curentului 0,6 ml/min, detecția s-a efectuat în UV la $\lambda = 220$ nm.

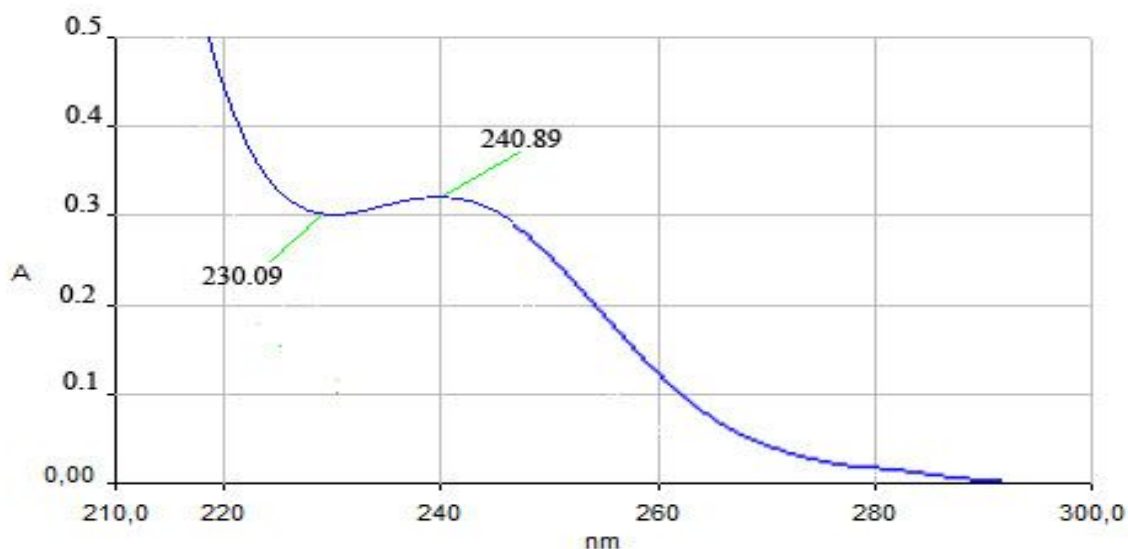


Fig. 2. Spectrul de absorbție al soluției amitriptilina extrasa cu cloroform din urina

În continuare am aplicat metoda cromatografiei lichide de performanță înaltă (HPLC), folosind coloana Lichrosorb 100P-8. Condițiile: faza mobilă A :B: C trietilamină-acid fosforic-apă (0,15:0,25:530), rata curentului 0,6 ml/min, detecția s-a efectuat în UV la $\lambda = 220$ nm.

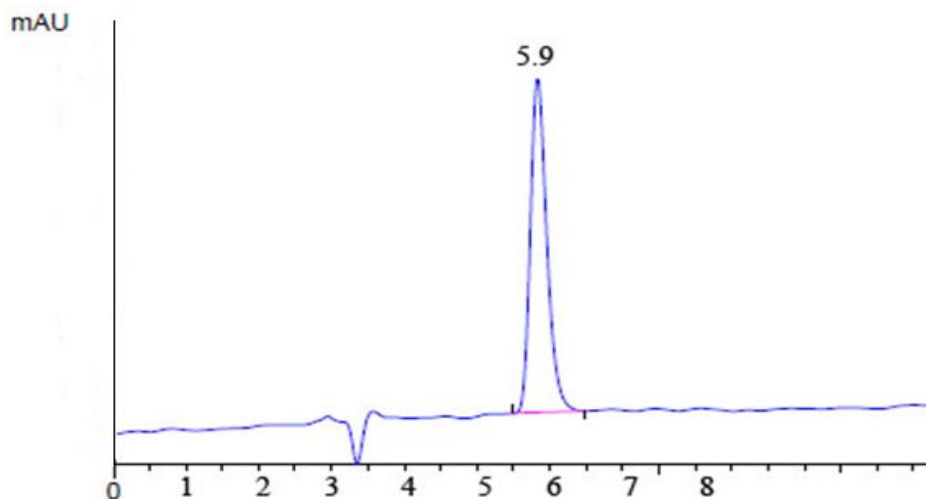


Fig.3. HPLC. Cromatograma extractului de amitriptilina.

Concluzie

Pentru izolarea amitriptilinei din obiectele biologice s-a aplicat metoda de izolare cu apă acidulată cu acid sulfuric până la pH 2,0 – 2,5 prin adăugare de acid tricloracetic 30 %, apoi am neutralizat cu NaOH 10% pînă la pH 9,0-10,0. Rezultatele metodei se confirmă prin metoda de dozare spectrofotometrică în UV și CSS. Prin aplicarea acestei metode de analiză a plasmii sanguine s-a izolat 50,44 % amitriptilina, iar din urina 46,80 %.

Bibliografie

1. Baloescu C, Curea E. Contolul medicamentelor - București: Ed. Didactică și pedagogică, 1983. p.129 – 130.
2. Bodoga B., Maria Virginia Coman . Cromatografie pe strat subțire – București: Ed. Tehnică, 1995 – 160p.
3. Cotelea T. Teza de doctor ”Investigații chimico – toxicologice asupra cinarizinei și clonidinei”. Chișinău, 2002, .208p.
4. Аншелес О.М. Буракова Т.Н. Микрохимический анализ на основе кристаллооптически ЛГУ.Л 1948
5. Бабилев Ф.В. Андроник И.Я. Полиморфизм лекарственных веществ Кишинев Штиинца 1981 – 239 с.
6. Приняжко Р.М. Калинюк Т.Г. Методы УФ-спектроскопии в фармацевтическом анализе Киев. Здоровье. 1976 – 126 с.

OPTIMIZAREA METODEI HPLC PENTRU ANALIZA FRUCTELOR DE ARMURARIU (SILYBUM MARIANUM (L.) GAERTN)

Igor Casian¹, Victor Luca², Ion Ungureanu³, Ana Casian¹

Centrul Științific în domeniul Medicamentului¹, Agenția Medicamentului²,

Centrul de Cultivare a Plantelor Medicinale³

Summary

Optimization of the HPLC method for analysis of Milk-Thistle fruit (*Silybum marianum* (L.) Gaertn).

An interlaboratory irreproducibility of the results of Milk-Thistle fruit assay has been discovered at realization of analytical procedure by the European Pharmacopoeia. It was found, that this irreproducibility is caused by insufficient plenitude of the analytes extraction from vegetal material.

A new procedure of probe preparation, that consists of two sequential extractions by ethylic alcohol 40% for 60 min at 70°C, has been developed. The offered procedure ensures recovery about 98 % and essentially decreases the volume of work.

Use of acetonitrile in the mobile phase composition and optimization of the gradient shape or switch-over to isocratic elution are offered for decrease of the analysis time.

Key words: *Silybum marianum*, flavonolignans, HPLC-UV, pharmaceutical analysis.

Rezumat

La efectuarea analizei cantitative a fructelor de armurariu prin metoda Farmacopeei Europene s-a depistat o ireproductibilitate interlaborator al rezultatelor. S-a stabilit că aceasta ireproductibilitate este condiționată de insuficiența plenitudinii de extracție a analiților din produsul vegetal.

S-a elaborat un nou procedeu de preparare a probelor, care constă din două extracții consecutive cu alcool etilic 40% timp de 60 min la temperatura 70°C. Procedeu propus asigură regăsirea circa 98% și micșorarea esențială a volumului de lucru.

Pentru reducerea timpului analizei cromatografice s-a propus utilizarea acetonitrilului în componența fazei mobile și optimizarea formei gradientului sau trecerea la eluare izocratică.

Cuvinte cheie: *Silybum marianum*, flavonolignane, HPLC-UV, analiza farmaceutică.

Actualitatea

Armurariul sau Ciulin (*Silybum marianum* (L.) Gaertn, familia Asteraceae) este o plantă ierboasa anală sau bienală, care crește în regiunile mediteraneene și în Asia, iar la noi în țară ea numai se cultivă. Semințele (fructele) de armurariu sunt folosite în scopuri medicinale - datorită