



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **95171**

(13) **U**

(51) МПК

**G01N 33/15** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	<b>u 2014 07572</b>	(72) Винахідник(и):	<b>Баюрка Сергій Васильович (UA), Петюнін Геннадій Павлович (UA), Карпушина Світлана Анатоліївна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки:	<b>07.07.2014</b>	(73) Власник(и):	<b>НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)</b>
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	<b>10.12.2014</b>		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>10.12.2014, Бюл.№ 23</b>		

## (54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ АМІТРИПТИЛІНУ ТА ІНШИХ ЛІПОФІЛЬНИХ РЕЧОВИН З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

### (57) Реферат:

Спосіб виділення амітриптиліну та інших ліпофільних речовин з біологічного матеріалу базується на елююванні їх ліпофільним розчинником хлороформом із зневодненої біологічної тканини з наступною екстракційною очисткою елюату в системі водна фаза (підкислена чи підлужена) - органічний розчинник. Хлороформний елюат очищують від ендогенних домішок, екстрагуючи їх спочатку підлуженою водою, а потім використовуючи систему неводних розчинників н-гексан - ацетонітрил, для чого хлороформний елюат випаровують до видалення органічного розчинника, сухий залишок розчиняють у н-гексані та проводять триразову екстракцію досліджуваної речовини ацетонітрилом, відокремлюють ацетонітрильний шар, який досліджують на наявність амітриптиліну або іншої ліпофільної речовини.

**UA 95171 U**



Корисна модель належить до аналітичної хімії, а саме до аналізу амітриптиліну та інших ліпофільних речовин в біологічних об'єктах, і може знайти застосування у хіміко-токсикологічному аналізі при виділенні вказаних речовин з біологічного матеріалу.

Загальноприйняті у хіміко-токсикологічному аналізі методи ізолювання лікарських речовин базуються на екстракції їх гідрофільними (підкислена вода, підкислений етанол) або амфіфільними розчинниками (ацетонітрил, ацетон) [Вергейчик Т.Х. Токсикологическая химия / Т.Х. Вергейчик. - М.: МЕДпресс-информ, 2009. - 400 с]. Ефективність виділення ліпофільних сполук з використанням вищезазначених методів звичайно є низькою, що пов'язано або з низьким ступенем екстракції ліпофільних речовин з біологічної тканини за допомогою гідрофільних розчинників або з втратою речовини, що вилучається, під час екстракційної очистки, яка є одним з найбільш поширених етапів пробопідготовки у сучасному хіміко-токсикологічному аналізі, і звичайно проводиться в системі водна фаза (підкислена чи підлужена) - органічний розчинник. При цьому разом з жирами та ліпідами, які є складовою частиною ендогенних домішок, в органічну фазу, що відкидається, переходить і певна частина досліджуваної ліпофільної речовини.

Відомий метод ізолювання пестицидів та лікарських речовин за допомогою елюювання їх хлороформом із гомогенізованого біологічного матеріалу [Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде: справ. / М.А. Клисенко, А.А. Калинина, К.Ф. Новиков и др. - М.: Колос, 1992. - Т. 1. - С. 159; Маміна О.О. Пробопідготовка при ізолюванні отрут основного та кислотного характеру з тканини печінки трупів хлороформом / О.О. Маміна, В.В. Болотов // Запорожский мед. журн. - 2006. - № 5. - С. 38-41] також пов'язаний з необхідністю додаткової очистки отриманих елюатів. Використання для цієї мети екстракції у системі водна фаза (підкислена чи підлужена) - органічний розчинник, як вказувалось вище, приводить до втрати ліпофільних речовин під час їх виділення з біологічного матеріалу.

Задача корисної моделі полягає у створенні способу виділення ліпофільних речовин з біологічного матеріалу, що передбачає використання ліпофільного розчинника хлороформа та проведення додаткової екстракційної очистки при таких умовах, коли мінімізується втрата досліджуваної речовини, що вилучається з біологічного об'єкту.

Поставлена задача вирішується таким чином, що проводиться зневоднення біологічної тканини шляхом її розтирання з натрій сульфатом безводним, амітриптилін чи іншу ліпофільну речовину елюють з отриманої маси за допомогою хлороформу, який є гарним розчинником як для ліпофільних сполук, так і для жирів та ліпідів, в яких розчиняється певна кількість досліджуваної речовини; екстракційна очистка елюатів від ендогенних домішок, як передбачено корисною моделлю, проводиться в два етапи: підлуженою водою (рН 8), а потім за допомогою системи неводних розчинників н-гексан - ацетонітрил. Як показали модельні "холості" досліди з біологічним матеріалом, у підлужену воду переходять водорозчинні ендогенні домішки, так УФ-спектр водної підлуженої фази, що відкидалася, показав значне світлопоглинання з максимумом абсорбції в діапазоні довжин хвиль 240-280 нм, значення оптичної густини при цьому порівнювали 0,05-0,23. Жири та ліпіди, а також розчинений в них амітриптилін (або інша ліпофільна речовина), розчиняються в н-гексані, з якого потім досліджувана речовина екстрагується ацетонітрилом. Триразова екстракція амітриптиліну та інших ліпофільних речовин з гексану ацетонітрилом в модельних дослідах показала, що вказані речовини повністю екстрагуються ацетонітрилом. Така операція дозволяє очистити амітриптилін та інші ліпофільні речовини від жирів та ліпідів.

Заявлений спосіб здійснюють таким чином: наважку біологічної тканини (печінка) переносили до ступки, додавали потрібну кількість натрій сульфату безводного і розтирали до утворення однорідної сипкої маси. Отриманий об'єкт переносили до скляної колонки діаметром 20 мм, в нижню частину якої заздалегідь, перед заповненням, вміщували невеликий ватний тампон. Через відкритий кран колонку заповнювали хлороформом за допомогою гумової груші до утворення "дзеркала" над поверхнею об'єкту завтовшки до 2 см. Кран закривали і над колонкою встановлювали ділильну лійку з хлороформом (50 мл). Через колонку пропускали хлороформ зі швидкістю 60-80 крапель за хвилину. Отримані елюати переносили до ділильної лійки і додавали 50 мл води, підлуженої 25 % розчином амоній гідроксиду до рН 8 і збовтували протягом 5 хвилин. Після цього воронку залишали на 5 хвилин для розділення фаз, хлороформний шар відокремлювали, пропускаючи його через паперовий фільтр, який вміщував 1,0 г безводного натрію сульфату. Елюати збирали у порцелянові чашки і випарювали на водяній бані при температурі не вище, ніж 40 °С або під струмом азоту до видалення органічного розчинника. Сухий залишок розчиняли в 10 мл н-гексану та проводили триразову екстракцію амітриптиліну (або іншої ліпофільної речовини) ацетонітрилом по 5 мл кожного разу. Ацетонітрил випарювали на водяній бані при температурі не вище, ніж 40 °С або під струмом

азоту до видалення органічного розчинника, сухий залишок розчиняли в 5 мл хлороформа та кількісно переносили до мірної колби на 10 мл і доводили до позначки зазначеним розчинником.

Корисна модель ілюструється прикладами.

#### Приклад 1

5 Амітриптилін є ліпофільною речовиною, про що свідчать високі значення його коефіцієнту ліпофільності ( $\log P(\text{октанол/вода})=4,94$ ), а також об'єму розподілу ( $V_d=15\text{л/кг}$ ) [Clark's analysis of Drugs and Poisons: Third edition [Електронний ресурс] / Ed. Laurent Y Galichet. - London: Pharmaceutical Press, 2005.-1 електрон, опт. диск (CD-ROM); 12 см. - Систем. Вимоги: Pentium; 128 Mb RAM; CD-ROM Windows XP / Vista. -Назва з титул, екрану].

10 До модельних проб печінки (5 г) додавали водні розчини амітриптиліну гідрохлориду, що у перерахунку містили 500 мкг амітриптиліну-основи. Об'єкти залишали на добу при кімнатній температурі, а потім виділяли амітриптилін за запропонованим способом. Аналіз амітриптиліну в отриманому хлороформному екстракті проводили методом ВЕРХ з мультитхвильовим УФ-детектуванням. Ідентифікацію амітриптиліну здійснювали за часом утримування ( $t_R = 22,80 \pm 0,02$  хв.,  $RSD=0,03\%$ ,  $\varepsilon = 0,09\%$ ,  $P=95\%$ ,  $v=2$ ), кількісне визначення - за залежністю площі піку від концентрації (мкг/мл) при  $\lambda_{\max}=240$  нм. Ступінь виділення амітриптиліну з біологічного матеріалу за заявленим способом складав  $42,0 \pm 4\%$ . Згідно з результатами наших попередніх дослідів, ступінь ізолювання водою, підкисленою кислотою оксалатною (метод Васильєвої А.О.) складав  $16 \pm 1\%$ , етанолом, підкисленим кислотою оксалатною (метод Стаса-Отто) -  $11 \pm 1\%$ , водою, підкисленою кислотою сульфатною (метод Крамаренка В.П.) -  $9 \pm 1\%$ , підкисленим ацетонітрилом (метод Шведзінські) -  $30 \pm 2\%$ , ацетоном (метод Карташова В.А.) -  $34 \pm 3\%$ , хлороформом з гомогенізованої біологічної тканини з наступною екстракційною очисткою в системі водна фаза (підкислена чи підлужена) - органічний розчинник -  $13 \pm 1\%$ .

#### Приклад 2

25 Венлафаксин є ліпофільною речовиною, про що свідчить високе значення його об'єму розподілу ( $V_d = 4-12$  л/кг) [Clark's analysis of Drugs and Poisons: Third edition [Електронний ресурс] / Ed. Laurent Y Galichet. - London: Pharmaceutical Press, 2005.-1 електрон, опт. диск (CD-ROM); 12 см. -Систем. Вимоги: Pentium; 128 Mb RAM; CD-ROM Windows XP / Vista. - Назва з титул, екрану].

30 До модельних проб печінки (5 г) додавали водні розчини венлафаксину гідрохлориду, що у перерахунку містили 500 мкг венлафаксину-основи. Об'єкти залишали на добу при кімнатній температурі, а потім виділяли венлафаксин за запропонованим способом. Аналіз венлафаксину в отриманому хлороформному екстракті проводили методом ВЕРХ з мультитхвильовим УФ-детектуванням. Ідентифікацію венлафаксину здійснювали за часом утримування ( $t_R = 17,81 \pm 0,08$  хв.,  $RSD=0,20\%$ ,  $\varepsilon=0,51\%$ ,  $P=95\%$ ,  $v=2$ ), кількісне визначення - за залежністю площі піку від концентрації (мкг/мл) при  $\lambda_{\max}=280$  нм. Ступінь виділення венлафаксину з біологічного матеріалу за заявленим способом складав  $51 \pm 3\%$ . Згідно з результатами наших попередніх дослідів, ступінь ізолювання водою, підкисленою кислотою оксалатною (метод Васильєвої А.О.), складав  $44 \pm 2\%$ , етанолом, підкисленим кислотою оксалатною (метод Стаса-Отто) -  $36 \pm 3\%$ , водою, підкисленою кислотою сульфатною (метод Крамаренка В.П.) -  $28 \pm 3\%$ , підкисленим ацетонітрилом (метод Шведзінські) -  $43 \pm 3\%$ , ацетоном (метод Карташова В.А.) -  $25 \pm 2\%$ , хлороформом з гомогенізованої біологічної тканини з наступною екстракційною очисткою в системі водна фаза (підкислена чи підлужена) - органічний розчинник -  $35 \pm 2\%$ .

#### Приклад 3

45 Циталопрам є ліпофільною речовиною, про що свідчать високі значення його коефіцієнту ліпофільності ( $\log P(\text{октанол/вода})=3,71$ ), а також об'єму розподілу ( $V_d=12-16$  л/кг) [Clark's analysis of Drugs and Poisons: Third edition [Електронний ресурс] / Ed. Laurent Y Galichet. - London: Pharmaceutical Press, 2005.-1 електрон, опт. диск (CD-ROM); 12 см. - Систем. Вимоги: Pentium; 128 Mb RAM; CD-ROM Windows XP / Vista. - Назва з титул, екрану].

50 До модельних проб печінки (5 г) додавали водні розчини циталопраму гідроброміду, що у перерахунку містили 500 мкг циталопраму-основи. Об'єкти залишали на добу при кімнатній температурі, а потім виділяли циталопрам за запропонованим способом. Аналіз циталопраму в отриманому хлороформному екстракті проводили методом ВЕРХ з мультитхвильовим УФ-детектуванням. Ідентифікацію циталопраму здійснювали за часом утримування ( $t_R = 19,95 \pm 0,09$  хв.,  $RSD=0,17\%$ ,  $\varepsilon = 0,43\%$ ,  $P=95\%$ ,  $v = 2$ ), кількісне визначення - за залежністю площі піку від концентрації (мкг/мл) при  $\lambda_{\max}=240$  нм. Ступінь виділення циталопраму з біологічного матеріалу за заявленим способом складав  $60 \pm 4\%$ . Згідно з результатами наших попередніх дослідів, ступінь ізолювання водою, підкисленою кислотою оксалатною (метод Васильєвої А.О.) складав  $22 \pm 2\%$ , етанолом, підкисленим кислотою оксалатною (метод Стаса-Отто) -  $10 \pm 1\%$ , водою, підкисленою кислотою сульфатною (метод Крамаренка В.П.) -  $15 \pm 1\%$ , підкисленим

ацетонітрилом (метод Сшедзінські) -  $35 \pm 2$  %, ацетоном (метод Карташова В.А.) -  $15 \pm 1$  %, хлороформом з гомогенізованої біологічної тканини з наступною екстракційною очисткою в системі водна фаза (підкислена чи підлужена) - органічний розчинник -  $22 \pm 1$  %.

#### Приклад 4

Сертралін є ліпофільною речовиною, про що свідчать високі значення його коефіцієнту ліпофільності ( $\log P(\text{октанол/вода})=5,29$ ), а також об'єму розподілу ( $V_d=20$  л/кг) [Clark's analysis of Drugs and Poisons: Third edition [Електронний ресурс] / Ed. Laurent Y Galichet. - London: Pharmaceutical Press, 2005. - 1 електрон, опт. диск (CD-ROM); 12 см. - Систем. Вимоги: Pentium; 128 Mb RAM; CD-ROM Windows XP / Vista. - Назва з титул, екрану].

До модельних проб печінки (5 г) додавали водні розчини сертраліну гідрохлориду, що містили у перерахунку 500 мкг сертраліну-основи. Об'єкти залишали на добу при кімнатній температурі, а потім виділяли сертралін за запропонованим способом. Аналіз сертраліну в отриманому хлороформному екстракті проводили методом ВЕРХ з мультитхвильовим УФ-детектуванням. Ідентифікацію сертраліну здійснювали за часом утримування ( $t_R=23,32 \pm 0,01$  хв.,  $RSD=0,02$  %,  $\varepsilon = 0,05$  %,  $P=95$  %,  $v = 2$ ), кількісне визначення - за залежністю площі піку від концентрації (мкг/мл) при  $\lambda_{\max}=280$  нм. Ступінь виділення сертраліну з біологічного матеріалу за заявленим способом складав  $62 \pm 5$  %. Згідно з результатами наших попередніх дослідів, ступінь ізолювання водою, підкисленою кислотою оксалатною (метод Васильєвої А.О.) складав  $21 \pm 2$  %, етанолом, підкисленим кислотою оксалатною (метод Стаса-Отто) -  $15 \pm 2$  %, водою, підкисленою кислотою сульфатною (метод Крамаренка В.П.) -  $11 \pm 1$  %, підкисленим ацетонітрилом (метод Сшедзінські) -  $39 \pm 3$  %, ацетоном (метод Карташова В.А.) -  $8 \pm 1$  %, хлороформом з гомогенізованої біологічної тканини з наступною екстракційною очисткою в системі водна фаза (підкислена чи підлужена) - органічний розчинник -  $15 \pm 2$  %.

Таким чином, використання ліпофільного екстрагенту хлороформу при ізолюванні ліпофільних речовин із зневодненого біологічного матеріалу, а також екстракційної очистки отриманих елюатів в системі неводних розчинників н-гексан - ацетонітрил, робить зазначений спосіб виділення ліпофільних речовин більш ефективним, ніж запропоновані раніше методи з використанням гідрофільних та амфіфільних розчинників.

Таким чином, заявлено новий спосіб виділення ліпофільних речовин з біологічного матеріалу, який дає можливість ефективно вилучити їх з зазначеного об'єкту при хіміко-токсикологічних дослідженнях.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виділення амітриптиліну та інших ліпофільних речовин з біологічного матеріалу, що базується на елююванні їх ліпофільним розчинником хлороформом із зневодненої біологічної тканини з наступною екстракційною очисткою елюату в системі водна фаза (підкислена чи підлужена) - органічний розчинник, який **відрізняється** тим, що хлороформний елюат очищують від ендогенних домішок, екстрагуючи їх спочатку підлуженою водою, а потім використовуючи систему неводних розчинників н-гексан - ацетонітрил, для чого хлороформний елюат випаровують до видалення органічного розчинника, сухий залишок розчиняють у н-гексані та проводять триразову екстракцію досліджуваної речовини ацетонітрилом, відокремлюють ацетонітрильний шар, який досліджують на наявність амітриптиліну або іншої ліпофільної речовини.

---

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601