

## Amitriptilin ve Nortriptilin'in Biyolojik Sıvılarda İnce Tabaka ve Gaz Karzomatografisi Yöntemi ile Tayini

Determination of Amitriptyline and Nortriptyline in Biological Fluids by Thin-Layer and Gas Chromatography

Nevin VURAL\* Tülin SÖYLEMEZOĞLU\* Gülin GÜVENDİK\*

### GİRİŞ

Amitriptilin ve nortriptilin geniş ölçüde kullanılan antidepresan ilaçlardır. Dibenzosikloheptadien yapısında olan bu trisiklik psikotropik ilaçlardan ilk kez amitriptilin 1961 de kullanılmaya başlanmıştır (1). Nortriptilin, amitriptilin N-demetil türevi olup, aynı zamanda metabolitlerinden biridir. Kandaki amitriptilin ve nortriptilin düzeyi ile farmakolojik cevap arasındaki ilişkinin önemi büyüktür. Aynı dozda elde edilen plazma amitriptilin düzeyi, kişilerde genetik etkenlere bağlı olarak değişebileceği gibi, daha önemli olarak karaciğer mikrozomal enzimlerini indükleyen ilaçlarla beraber alınmasında bu farklılık daha belirgindir (3-5).

Amitriptilin ve nortriptilin insanda ve hayvanda başlıca biyotransformasyonları N-dealkilasyon (6) yanında aromatik halka hidrosilasyonu (7) ve N-oksidasyon (8,9) yolu ile olmaktadır. Bu nedenle mikrozomal enzimleri indükleyen ilaçlarla etkileşmesi mümkündür. Nitekim, guanidin türevi hipotansif ilaçlar, barbitüratlar ve benzodiazepinlerin trisiklik antidepresan ilaçlarla etkileşmesi bir çok araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (4). Bu nedenle klinikte tedavi süresince kandaki amitriptilin düzeyinin devamlı tayini terapatik açıdan önemlidir. Ayrıca aşırı doz ve çeşitli nedenlerle ortaya çıkan

Redaksiyona verildiği tarih: 30 Nisan 1980

\*Toksikoloji Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi.

zehirlenmelerde idrarda aranma ve tayinleri de zehirlenmenin tedavisi ve adli tıp açısından gereklidir (1).

Son yıllarda amitriptilin ve nortriptilinin biyolojik sıvılarda tayini ile ilgili çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu amaçla biyolojik sıvıdan ekstraksiyondan sonra, spektrofotometrik (1), ince tabaka kromatografisi (İ.T.K.) (10,11 ) ve gaz likit kromatografisi (GLK) (12, 13) kullanılmaktadır.

Araştırmamızda ülkemizde de kullanılan amitriptilin ve nortriptilinin plazma ve idrardan ekstraksiyondan sonra İ.T.K. ve G.L.K. ile kombinasyonu ile kesin ve duyar bir yöntemin kurulması amaç edinilmiştir.

#### MATERYEL ve YÖNTEM

Saf amitriptilin (Roche), nortriptilin (Mustafa Nevzat), protriptilin (MSD) den 1 mg (miligram) ml metanolde olmak üzere stok standartlar hazırlanmıştır. Hiç ilaç almamış kişilerden alınan, idrar ve kan (plazma) numunelerine bu standartlardan, uygun miktarda ilave edilmiştir. 5, 25, 50 ve 100 µg (mikrogram) amitriptilin ve nortriptilin içeren biyolojik sıvılara yöntem uygulanmıştır.

1- Amitriptilinin ve Nortriptilinin idrardan ekstraksiyonu ve İ. T.K. ile tanımlanması:

Cam kapaklı bir fiyolde 5 ml idrar numunesinin pH 1 5N NaOH ile (1-2 damla) ayarlandıktan sonra 5 ml n-heksan ilave edilerek 1 dakika kuvvetle çalkalanır. Karışım 15 dakika (3000 rpm) de santrifüj edildikten sonra organik faz ayrılır ve işlem 5 ml n-hekzan ile tekrarlanır. Bir tüp içinde birleştirilen hekzan fazları 2 ml su ile yıkanır ve susuz  $Na_2SO_4$  ile kurutulduktan sonra azot akımında kurutulur. Kalıntı 0.1 ml kloroformda çözüldükten sonra 20 µl İ.T.K. için Silikagel-G tabakaya uygulanmıştır. Developman sistemi olarak (etil asetat: n heptan: metanol: amonyak (0.8) 60:20:7.5:7.5) karışımı kullanılmıştır. Kromatogram belirlenmesi için renk reaktifi olarak Dragen-dorff reaktifi kullanılmıştır.

2- Plazma ve idrardan amitriptilin ve nortriptilinin ekstraksiyonu ve G.L.K. ile tayini:

Gaz kromatografisi ile amitriptilin ve nortriptilinin tayini için biyolojik sıvıdan ekstraksiyon yukarıda açıklanan yöntemle yapılmıştır. 100 µg internal standart (protriptilin) ekstraksiyondan önce numunelere ilave edilmiştir. Ancak plazma önce eşit hacimde su ile seyreltilmiş (5 ml plazma + 5 ml su) ve ekstraksiyon için de 10 ml hekzan kullanılmıştır.

Kalıntı 100 µl (mikrolitre) metanolde çözülmüş ve 1 µl gaz kromatografa enjekte edilmiştir.

Gaz kromatografisi çalışma koşulları:

Gaz Kromatograf: Packard Becker 419 Gas chromatograph

Kolon: 2 m uzunluk X 4 mm (iç çap) cam kolon % 3 OV-17 (Chromosorb) W-HP 100-200 mesh üzerinde)

Dedektör: FID

Kolon sıcaklığı: 240°C

Enjeksiyon giriş sıcaklığı: 260°C

Dedektör sıcaklığı: 260°C

Gaz akış hızı: 50 ml/dak (azot)530 ml/dak (hidrojen); 250 ml/dak (hava)

Elektrometre alanı: 10<sup>2</sup>, Attenuation: X<sub>4</sub> (X<sub>2</sub>)

Kağıt hızı: 0.5 cm/dak.

Kalibrasyon: 50-500 nanogram / µl amitriptilin ve 1 µg iç standart içeren idrar ve plazma numuneleri ekstrakte edildikten sonra kalıntı 100 µl metanolde çözülmüş gaz kromatografa uygulanmıştır.

Standart maddenin pik yüksekliği internal standardın pik yüksekliği oranlarının konsantrasyona karşı grafiği çizilmiştir.

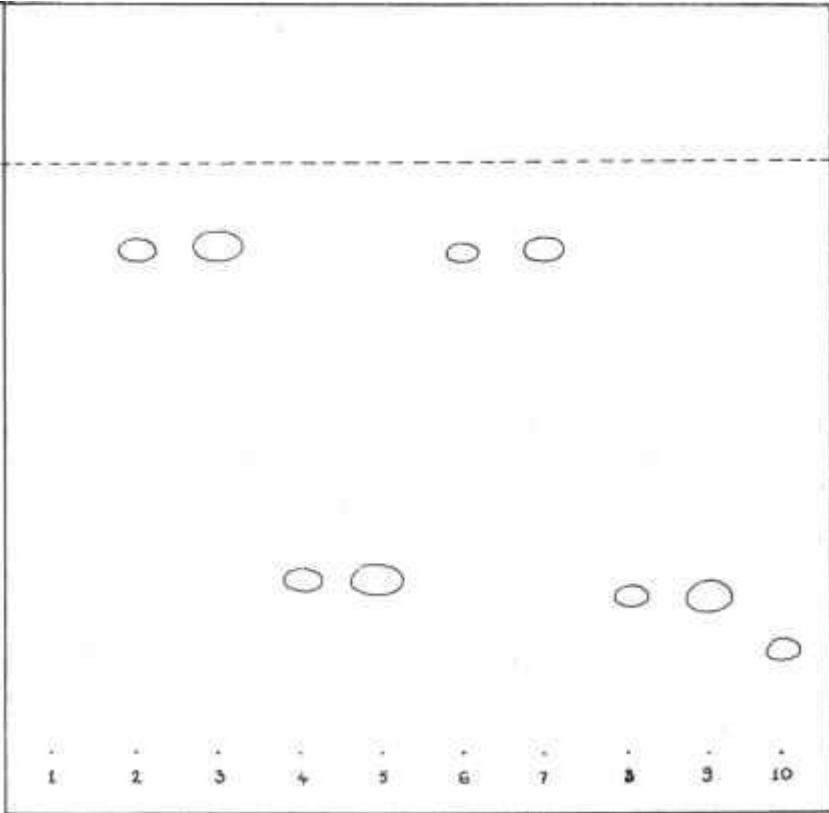
Nortriptilin ile de kalibrasyon grafiği aynı şekilde hazırlanmıştır.

Verim hesabı: 5 ml idrara 25 µg amitriptilin ilave edilerek ekstraksiyon yapılmıştır. Her defasında kullanılan 5 ml hekzanın, ekstraksiyondan sonra 4 ml si pastör pipetiyle ayrılmış ve sonuçta birleştirilen hekzan fazları (8 ml) uçurulduktan sonra 50 µg protriptilin içeren 100 µl metanolde çözülmüştür. Böylece % 100 verimde µ de 200 ng (0.2 µg) amitriptilin + 500 ng (0.5 µg) internal standart

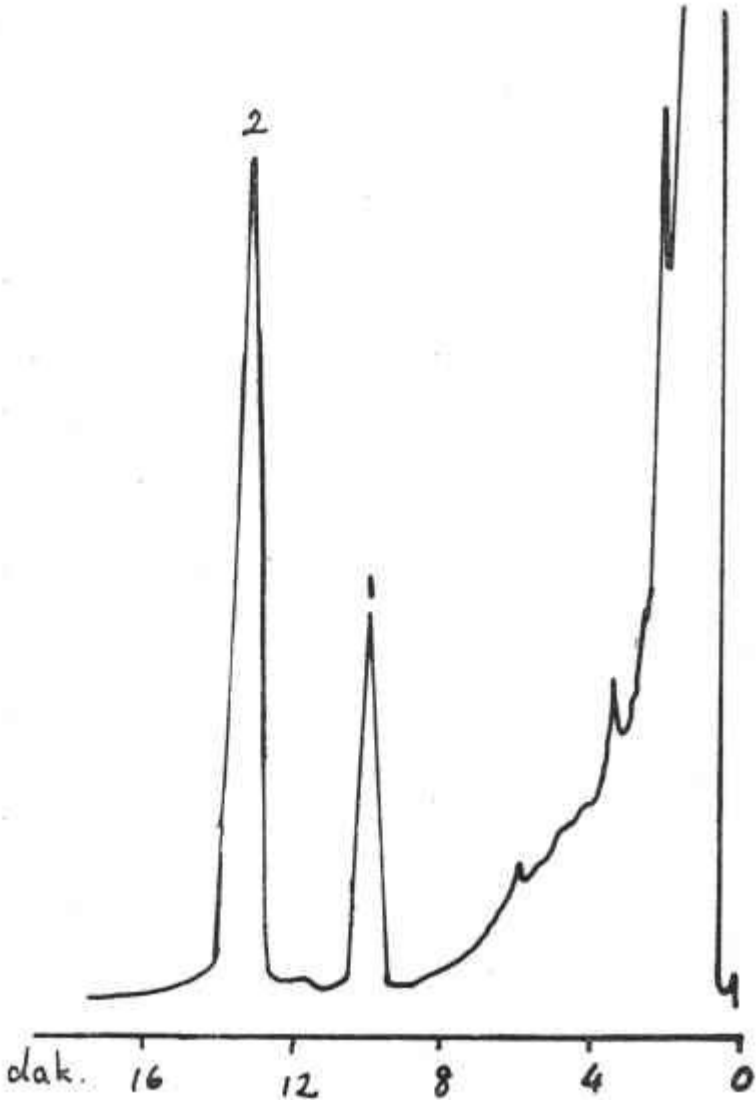
içermesi gereken karışım gaz kromatografisine uygulanmıştır. Aynı oranda hazırlanan standartlar doğrudan doğruya gaz kromatografisine uygulanmış ve sonuçlar karşılaştırılarak verim hesabı yapılmıştır. Aynı çalışmalar plazmaya da uygulanmıştır.

#### BULGULAR

1- İdrar numunesinden ekstrakte edilen amitriptilin ve nortriptilinin, standart maddelerle karşılaştırılmalı olarak İ.T.K. ile elde edilen kromatogram Şekil 1 de gösterilmiştir.



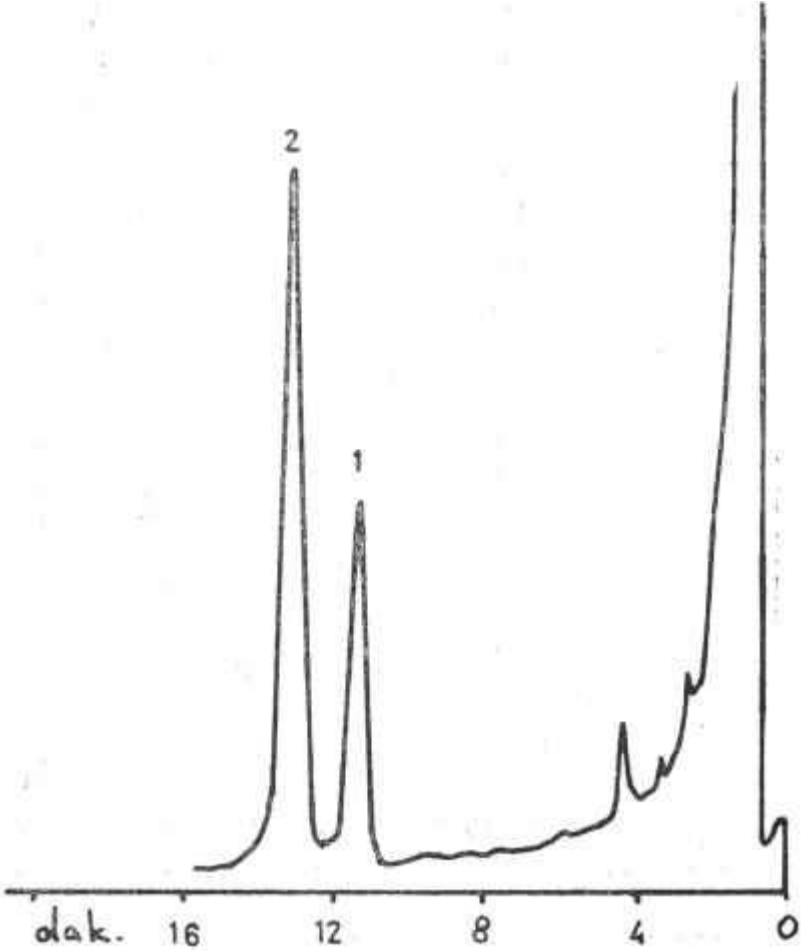
Şek. 1. Amitriptilin, nortriptilin ve protriptilinin İ.T.Kromatogramları 1)İlaçsız idrar ekstraktı, 2,3) amitriptilin, 4,5) nortriptilin standartları (5 ve 10 µg), 6-9) idrardan ekstrakte edilen amitriptilin ve nortriptilin (10 ve 5 µg), 10) protriptilin (5 µg)



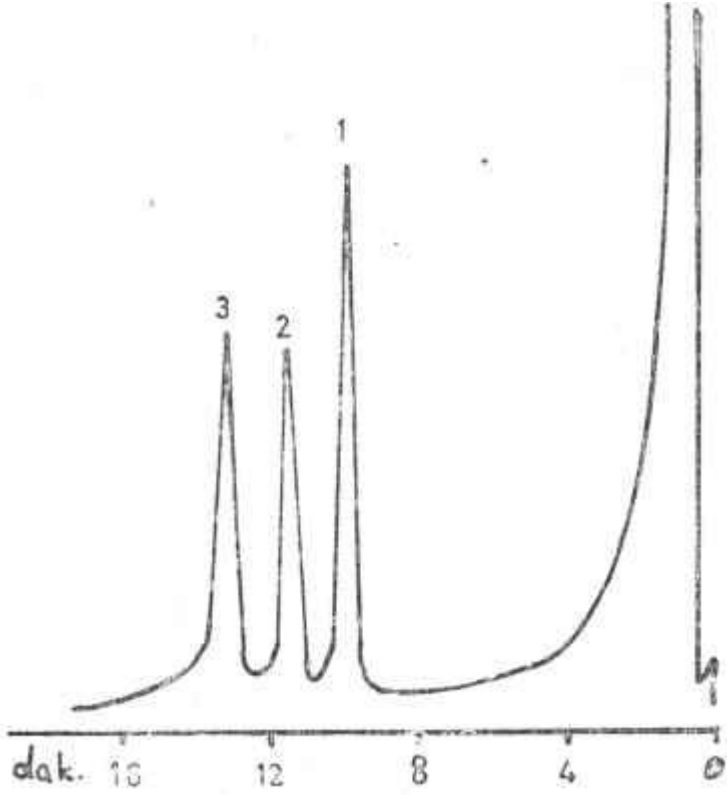
Şek. 2. Plazmadan ekstrakte edilmiş amitriptilinin Gaz Kromatogramı 1) Amitriptilin (200 ng) 2) internal standart (1 µg)

İ.T.K. ile duyarlık  $1 \mu\text{g}$  a kadar inilmiştir.

2- Amitriptilin ve nortriptilinin idrar ve kandan ekstrakte edildikten sonra gaz kromatografisi ile elde edilen kromatogramlar Şekil 2 ve 3 de görülmektedir. Şekil 4 de ise standart maddelerin kromatogramı verilmiştir.



Şek. 3. idrardan ekstrakte edilmiş nortriptilinin Gaz Kromatogramı (1) Nortriptilin (300 ng) 2) internal standart (1  $\mu\text{g}$ )

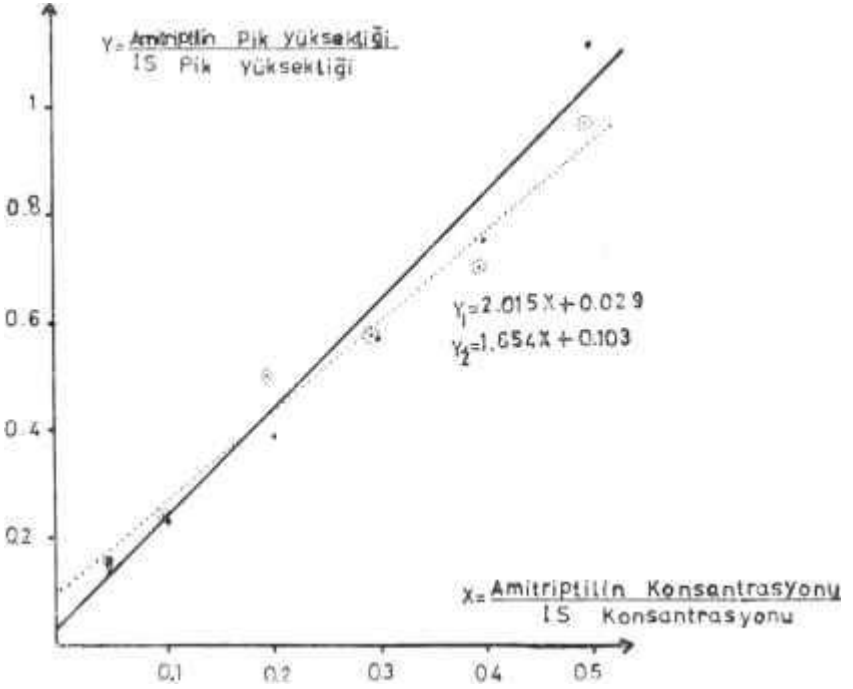


Şek. 4. Standart amitriptilin, nortriptilin ve protriptilinin Gaz Kromatogramları 1) Amitriptilin (200 ng), 2) Nortriptilin (200 ng), 3) Protriptilin (300 ng-1 µg)

3- Amitriptilin ve nortriptilinin gaz kromatografisi ile kantitatif tayini için hazırlanan kalibrasyon grafikleri Şekil 5 ve 6 da gösterilmiştir.

Çalıştığımız koşullarda gaz kromatografisi ile duyarlık alt sınırı amitriptilin için 0.5 µg/ml vücut sıvısı (idrar veya plazma), nortriptilin için ise 1 µg/ml vücut sıvısına inilmiştir.

Verim ise amitriptilinin idrarda % 62 ± 1.3 (n = 5), plazmada vücut sıvısında % 74.3 ± 1.5 (n = 5) saptanmıştır.

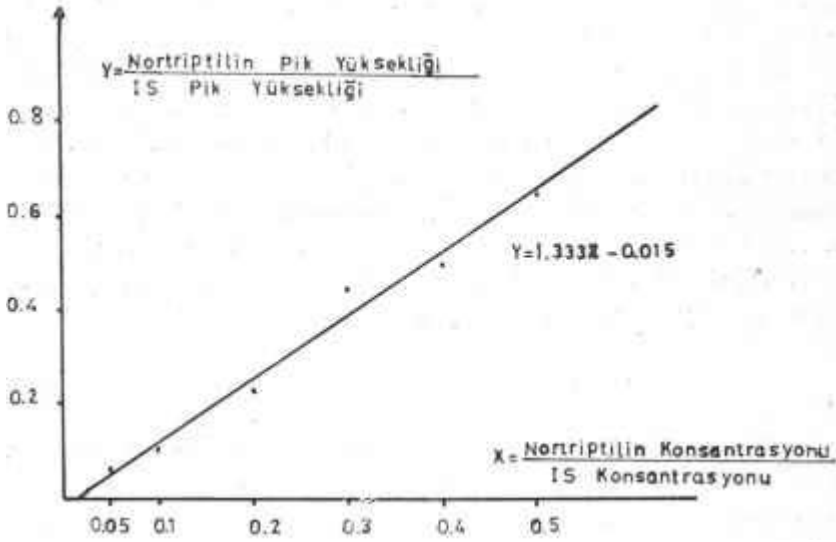


Şek. 5. Amitriptilinin GLK ile idrar ve plazmada tayini için hazırlanan kalibrasyon grafiği  
 - - - idrar, - - - plazma,  $Y_1$  : idrar, amitriptilin,  $Y_2$  : plazma amitriptilin regresyon denklemleri.

#### TARTIŞMA ve SONUÇ

Amitriptilin ve nortriptilin çok kullanılan antidepresan ilaçlardır. Bu nedenle aşırı dozla ortaya çıkan zehirlenmelerde idrarda aranması ve kısa zamanda sonuç alınması önemlidir. Ekstraksiyondan sonra İ.T.K. ilaçla zehirlenmede kullanılan en duyar bir tarama yöntemidir (15). Çalışmamızda İ.T.K. ile  $1 \mu\text{g}$  duyarlığa inilmiştir. Verim amitriptilin için  $\% 60.1 \pm 1.3$ ; nortriptilin için  $\% 74.3 \pm 1.5$  olduğu göz önünde bulundurulursa  $20 \mu\text{g}$  ilaç / 100 ml vücut sıvısında saptanabilir. Bu ise normal tedavi dozlarında bile tarama testi olarak kullanılan ekstraksiyon yöntemi ve İ.T.K. nin yeterli olduğunu göstermektedir (4). İ.T.K. de kullandığımız developman sistemi diğer araştırı-





Şek. 6. Nortriptilinin GLK ile idrarda tayini için hazırlanan kalibrasyon grafiği.

cıların kullandıkları sistemleri de deneyerek yaptığımız karşılaştırmaya göre (14, 16) iyi sonuç vermiştir. Bu sistem MOFFAT'ın kullandığı sistemlerden biri olmakla beraber (14), amonyak oranını 3 katına çıkarmakla daha iyi sonuç alınmıştır.

Çalıştığımız koşullarda GLK ile elde ettiğimiz duyarlık sınırı İ.T.K. den çok farklı olmamakla beraber deney sonuçlarının desteklenmesi ve kantitatif tayin için gerekli bir tekniktir. Literatürde türevleme yöntemi ve elektron yakalama detektörü (17) kullanarak ng/ml düzeyine inilmiştir. Ancak kendi çalışmamızda elde ettiğimiz verim ve duyarlık amitriptilin ve hem amitriptilin metaboliti olarak ve hem de aynı grup ilaç olarak kullanılan nortriptilinin kesin tanımı ve en düşük tedavi dozunda bile (25 mg 1 defalık doz) plazmada tayin olanağını veren GLK ile aldığımız sonuçlar rutin çalışmalar için yeterli duyarlık ve kesinliktedir.

#### ÖZET

Bu çalışmada trisiklik antidepresan ilaçlardan amitriptilin ve nortriptilinin idrar ve plazmadan pH = 11 de n-heksan ile ekstraksi-

yonu yapılmış ve İ.T.K. tarama testi olarak kullanılmıştır. Silikagel-G adsorban tabakasında (etil asetat: n-heptan:metil alkol: amonyak 60:30:7.5:7.5:) developman sistemi ile en iyi ayrılma sağlanmış ve Dragendorff reaktifi ile duyarlık alt sınırı 1 µg olarak saptanmıştır. Destekleyici analiz ve miktar tayini ise GLK ile yapılmıştır. Packard-Becker 419 gaz kromatografında % 3 OV-17 (Chromosorb w-HP 100 - 120 mesh üzerinde) kolonu ve FID detektörü kullanılmıştır. Duyarlık amitriptilin ile 0.5 µg/ml vücut sıvısı, nortriptilin ile 1 µg/ml vücut sıvısı olarak saptanmıştır. verim ise amitriptilin ve nortriptilin ile sıra ile % 62 ± 1.3 ve % 74.3 ± 1.5 elde edilmiştir.

#### SUMMARY

Thin-Layer Chromatography was used as a serening test in this research for urine and plazma extracts containing amitriptyline and nortriptyline at concentrations 5,25, 50 and 100 µg/5 ml biologic fluid. Extraction was made with n- heptane at pH 11. The developing system (ethyl acetate: n-heptane: methyl alcohol: ammonia: 60:30: 7-3:7-5) we used on Silicagel-G plates gave the test separation and 1 µg drug can be detected using Dragendorff reagent.

Gas-Liquid Chromatography (GLC) was used for confirmation and for the quantitative determination of the drugs in the extract. Analyses were performed on Packard-Becker 419 Gas Chromatograph equipped with FID and glass column 2 m X 4 mm (i.d) packed with 3% OV-17 on Chromosorb W-HP, 100-120 mesh and protriptyline was used as an internal standart. The lower limit of sensitivity with GLC was 0.5 µg/ml biologic fluid for amitriptyline and 1 µg/ml biologic fluid for nortriptyline.

The recoveries were 62 ± 1.3 % for amitriptyline and 74.3 ± 1.5 % for nortriptyline.

#### LİTERATÜR

1. Henwood, C.R., *J.Forens. Sci. Soc.* 15, 147-151 (1975)
2. Braitwaite, R.A., Goulding, R., Theana, G., **The Lancet**, 1297-1300 (1972)
3. Braitwaite, R.A., Flanagan, R.J., *Br. J.Clin. Pharmac.* 2, 469 (1975)
4. Braitwaite, R.A., *Br. J.Chn. Pharmac, Supplement*, 29-34 (1976)

5. Montgomery, S., Braitwaite, R., *Presented at the joint British and Scandinavian Associations of psychopharmacology meeting, London, July 1915 Dept. of pschiatry and poisons Unit. Guy's Hospital, London S.E.1*
6. Leenheer, A.O., Heyndrickx, A., *J. Pharm. Sei.* 60, 1403-1405 (1971)
7. Facino, M., Corono, G.L., *J. Pharm. Sei.* 58, 764-765 (1968)
8. Santagastino, G., Facino, R.P., Pirillo, D., *J.Pharm. Sei.* 63, 1690-1692 (1974)
9. Beckett, A.H., Sarray, S. Al., *J. Pharm. Pharmac.*, 25, 335-336 (1973)
10. Zingales, I., *J.Chromatogr.* 31, 405-419 (1967)
11. Haefelfinger, P., *J.Chromatogr.* 145, 445-451 (1978)
12. Huckler, B.H., Stanffer, S.C., *J. Pharm. Sei.* 63, 296-297 (1974)
13. Wallace, J.E., Hamilton, H.E., Goggin, L.K., Bhim, K., *J. Pharm. Sei.* 63, 1690-1692 (1974)
14. Moffat, A.C., Clare, B., *J. Pharm. Pharmac.* 26, 665-670 (1974)
15. Berry, D. and Grove, J., *J.Chromatogr.* 80, 205-219 (1973)
16. Ertan, R., Bertucat, M., *Ankara Ecz. Fak. Mec.* 5, 41-46 (1975)
17. Hartvig, P. and Naslund, B., *J.Chlomatogr.* 133, 367-371 (1977)