Рекомендована д.ф.н., професором П.О.Безуглим

УДК 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

РОЗРОБКА МЕТОДІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ МІАНСЕРИНУ, ПРИДАТНИХ ДЛЯ ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНОГО АНАЛІЗУ

С.В.Баюрка

Національний фармацевтичний університет

Вивчено умови ідентифікації міансерину за допомогою тонкошарової хроматографії, кольорових реакцій, УФ-спектроскопії. Розроблено методики УФ-спектрофотометричного і екстракційно-спектрофотометричного в видимій області визначення міансерину за реакцією з метиловим оранжевим. Відносна невизначеність середнього результата для запропонованих методів складала ±1,1% та ±2,3% відповідно.

Міансерин (1,2,3,4,10,14b-гексагідро-2-метилдибензо-[c,f]-піразино-[1,2-a]азепіну гідрохлорид) – сучасний чотирициклічний антидепресант, який широко застосовується в медичній практиці [8, 9]. Препарат неодноразово був причиною гострих та смертельних інтоксикацій [11, 13, 14, 16]. Для встановлення причини отруєння важливе значення мають результати хіміко-токсикологічного дослідження біологічних об'єктів на вміст у них токсичної речовини.

Для виявлення міансерину у крові запропонована газорідинна хроматографія з використанням лужного полум'яно-іонізаційного [11] та мас-спектроскопічного детекторів після твердофазної мікроекстракції [11, 15]. Опрацьовано також високочутливі методики визначення зазначеного антидепресанта в плазмі за допомогою рідинної хроматографії з електрохімічним детектуванням [11] та сполучення рідинної хроматографії і мас-спектрометрії (РХ-МС) з ультразвуковою іонізацією після твердофазної екстракції із плазми [17]. Метод капілярного електрофорезу з УФ-спектрофотометричним детектуванням використано для аналізу міансерину у грудному молоці після попередньої твердофазної екстракції на поліпропіленовому волокні з шаром поліфенілметилсилоксану, градуювальний графік лінійний в інтервалі меж концентрацій 50-500 нг/мл [10]. Вищеперелічені методики характеризуються високою чутливістю та специфічністю, але потребують ретельної пробопідготовки та спеціального коштовного обладнання, що обмежує можливість їх використання.

З метою хіміко-токсикологічного аналізу запропоновані кольорові реакції, УФ-спектроскопія [4, 11], але результати, наведені різними авторами, містять деякі розбіжності. Наведені умови ідентифікації міансерину за допомогою хроматографії у тонкому шарі сорбенту [4, 11], при цьому перелік використаних рухомих фаз обмежений. На наш погляд, доцільно провести хроматографічне дослідження вказаного антидепресанта з використанням рухомих фаз, рекомендованих Міжнародним комітетом з систематичного токсикологічного аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів [5].

Запропонована методика визначення міансерину в лікарських формах за допомогою спектрофотометрії у видимій області з хромогеном – 3-метил-2-бензотіазоліну гідразоном у присутності іонів Fe^{3+}, оптимальні умови визначення міансерину знаходяться у межах концентрацій 1-16 мкг/мл [12]. З метою визначення міансерину в біологічних об'єктах запропонована екстракційна фотометрія з метиловим оранжевим, лінійність градуювального графіка спостерігається у межах концентрацій 5-100 мкг [3].

Метою нашого дослідження було встановлення умов виявлення, ідентифікації та кількісного визначення міансерину за допомогою простих, доступних та широко впроваджених у практику хіміко-токсикологічного аналізу методів [2, 7, 11]: тонкошарової хроматографії, кольорових реакцій, УФ-спектроскопії, екстракційної спектрофотометрії у видимій області з метиловим оранжевим. Для екстракційно-спектрофотометричного визначення нами була апробована відносно міансерину методика, згідно з якою іонний асоціат, що утворився, руйнують за допомогою кислоти сульфатної в абсолютному етанолі та вимірюють світлопоглинання безпосередньо хлороформного шару [6]. Методика визначення, яка була використана авторами [3], передбачає необхідність реекстракції азобарвника у водний шар за допомогою водного розчину кислоти хлоридної. Збільшення кількості екстракцій ускладнює аналіз та може призвести до збільшення похибки визначення.

Матеріали та методи

Хроматографічне дослідження проводили з використанням пластинок для високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) виробництва Естонії (сорбент КСКГ, фракція – 5÷20 мкм, товщина шару – 130±25 мкм, розмір пластинок 20×20 см), «Sorbfil» (силікагель СТХ-1 ВЕ, тип підложки – ПЕТФ, зв'язуюча речовина – силіказоль, фракція – 8÷12 мкм, товщина шару – 100 мкм, розмір пластинок 10×10 см), «Merck» виробництва Німеччини (силікагель GF_{254}, розмір пластинок 10×20 см), «Silufol UV-254» (силікагель, підложка – фольга, зв'язуюча речовина –

Таблиця 1

Значення Rf міансерину у різних рухомих фазах та тонких шарах

Рухомі фази	Значення Rf міансерину			
	ВЕТШХ	Sorbfil	Merk	Silufol
Метанол – 25% розчин амонію гідроксиду (100:1,5)	0,76	0,71	0,56	0,61
Хлороформ – метанол (90:10)	0,84	0,86	0,73	0,47
Етилацетат – метанол – 25% розчин амонію гідроксиду (85:10:5)	0,95	0,93	0,88	0,81
Хлороформ – *н*-бутанол – 25% розчин амонію гідроксиду (70:40:5)	0,97	0,95	0,97	0,64
Метанол – *н*-бутанол (60:40)	0,48	0,45	0,53	0,37
Метанол	0,61	0,55	0,67	0,38
Ацетон	0,45	0,56	0,41	0,33
Етилацетат	0	0	0	0
Циклогексан – толуен – діетиламін (75:15:10)	0,81	0,87	0,76	0,85
Гексан – *і*-пропанол – 25% розчин амонію гідроксиду (24:6:0,3)	0,93	0,96	0,86	0,71
Толуен – ацетон – етанол – 25% розчин амонію гідроксиду (45:45:7,5:2,5)	0,86	0,82	0,72	0,76
Хлороформ – діоксан – ацетон – 25% розчин амонію гідроксиду (47,5:45:5:2,5)	0,88	0,93	0,85	0,77
Хлороформ – ацетон – 25% розчин амонію гідроксиду (12:24:1)	0,87	0,92	0,88	0,85
н-Бутанол – кислота ацетатна – вода (4:0,5:1)	0,10	0,07	0,06	0,07
Етилацетат – ацетон – 25% розчин амонію гідроксиду (50:45:4)	0,92	0,90	0,86	0,87
Бензен – метанол – діетиламін (90:10:10)	0,93	0,97	0,91	0,90
Гексан – етилацетат – етанол – 25% розчин амонію гідроксиду (30:10:5:1)	0,85	0,87	0,80	0,61
Етанол – ацетон – вода (1:1:2)	0,41	0,36	0,46	0,27
Гексан – толуен – діетиламін (75:15:10)	0,77	0,83	0,71	0,61
Хлороформ – ацетон – 25% розчин амонію гідроксиду (25:5:0,3)	0,97	0,95	0,91	0,78
Хлороформ – гексан – етанол (1:1:1)	0,75	0,80	0,43	0,46
Хлороформ	0,11	0,15	0,08	0,07
Хлороформ – ацетон (80:20)	0,22	0,31	0,30	0,23
Етилацетат – метанол – 25% розчин амонію гідроксиду (85:10:2,5)	0,88	0,92	0,61	0,81

крохмаль, розмір пластинок 5×15 см) та рухомих фаз, які наведені в табл. 1. Як проявник міансерину на хроматографічних пластинках використовували реактив Драгендорфа у модифікації за Муньє.

Реакції забарвлення проводили на шматочках хроматографічних пластинок з сухими залишками після видалення хлороформу (хлороформні розчини міансерину гідрохлориду містили від 0,2 до 25 мкг препарату у пробі). Як реагенти використовували кольорові реактиви [7, 11]: кислоти сульфатну, нітратну, перхлорну концентровані, реактиви Маркі, Манделіна, Фреде, Ердмана, Лібермана (табл. 2).

УФ-спектри абсорбції міансерину гідрохлориду в 0,1 М розчині кислоти хлоридної знімали на спектрофотометрі СФ-46 у діапазоні довжин хвиль 200-350 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм; як розчин порівняння використовували 0,1 М розчин кислоти хлоридної.

Методика побудови градуювального графіка для УФ-спектрофотометричного визначення міансерину гідрохлориду. Розчини міансерину гідрохлориду 1-9 готували наступним чином: 0,0100 г досліджуваної речовини вносили в мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняли у 0,1 М розчині кислоти хлоридної та доводили об'єм розчину до мітки вказаним розчином кислоти (стандартний розчин з концентрацією 200 мкг/мл). У мірні колби місткістю 10 мл вносили по 0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 та 7,5 мл стандартного розчину і доводили об'єми розчинів до мітки 0,1 М розчином кислоти хлоридної (розчини 1-9 відповідно, концентрація – 10; 20; 40; 50; 60; 80; 100; 120; 140 та 150 мкг/мл). Вимірювали оптичну густину і будували графік залежності оптичної густини від концентрації.

Методика побудови градуювального графіка для екстракційно-спектрофотометричного визна-

Таблиця 2

Забарвлення продуктів взаємодії міансерину з кольоровими реактивами

Реактив	Забарвлення	Чутливість, мкг
Реактив Маркі	–	–
Реактив Манделіна	фіолетове (по краю)	0,5
Реактив Фреде	блідо-фіолетове	1,0
Реактив Лібермана	фіолетове → темно-фіолетове	2,0
Реактив Ердмана	фіолетове	2,0
Кислота сульфатна концентрована	фіолетове	10,0
Кислота хлоридна концентрована	–	–
Кислота нітратна концентрована	фіолетове (миттєво) → цегляно-червоне	1,0
Кислота фосфатна концентрована	–	–
Кислота ацетатна концентрована	–	–
Кислота перхлоратна концентрована	фіолетове	4,0

чення міансерину гідрохлориду. Міансерину гідрохлорид (0,0100 г) вносили в мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняли у хлороформі та доводили об'єм розчину до мітки вказаним розчинником (стандартний розчин з концентрацією 200 мкг/мл).

У ділильну лійку вносили 5,0 мл ацетатного буферного розчину з pH 4,6, 5,0 мл 0,05 % розчину метилового оранжевого та по 0,05; 0,075; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 та 1,0 мл стандартного розчину міансерину гідрохлориду відповідно. В усіх випадках, крім останнього, об'єм хлороформу доводили до 1 мл. До отриманої суміші додавали 15 мл хлороформу. А далі чинили так, як вказано нами раніше [1].

Результати та їх обговорення

Результати хроматографічного дослідження міансерину наведені в табл. 1. Рухомі фази №1-9 рекомендовані Міжнародним комітетом з систематичного токсикологічного аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів. Рухомі фази №10-24 використовуються у хіміко-токсикологічному аналізі для виявлення лікарських речовин основного характеру методом тонкошарової хроматографії [1, 10]. Як видно з табл. 1, найбільш придатними для ідентифікації міансерину виявилися рухомі фази №1, 5-7, 18, 19, 21, 23.

При використанні реактиву Драгендорфа у модифікації Муньє як проявника міансерину на хроматографічних пластинках спостерігали оранжевий колір плям препарату на жовтому фоні. Чутливість виявлення мінсерину при цьому знаходилась у межах 1,0-2,0 мкг препарату в пробі в залежності від типу хроматографічних пластинок. Чутливість зазначеного проявника при виявленні міансерину була найвищою при використанні хроматографічних пластинок «Silufol» та «Merck» (1,0 мкг препарату в пробі).

Встановлено, що міансерин утворює забарвлення з рядом кольорових реактивів (табл. 2). Найбільш чутливим для виявлення вказаного антидепресанта є реактив Манделіна (чутливість виявлення складає 0,5 мкг препарату в пробі).

Вивчення світлопоглинання міансерину гідрохлориду в УФ-області спектра показало наявність двох максимумів абсорбції при довжині хвиль 221± ±2 нм (A^1_1= 318; ε = 9565) та 278±2 нм (A^1_1= 81,5; ε = 2451,5) в 0,1 М розчині кислоти хлоридної.

Для розробки методики екстракційно-спектрофотометричного визначення міансерину в видимій області попередньо нами було встановлено, що кислотний азобарвник – метиловий оранжевий (0,05% водний розчин) утворює з міансерину гідрохлоридом у середовищі ацетатного буферного розчину з pH 4,6 іонний асоціат, який екстрагується хлороформом. Забарвлення розчинів іонних асоціатів виявилося малоінтенсивним, тому для підсилення чутливості методу утворені іонні асоціати руйнували додаванням до їх хлороформних розчинів 1% розчину кислоти сульфатної в абсолютному етанолі. При цьому одержували розчини, які мали значно вищу оптичну густину.

Були визначені також оптимальні умови проведення екстракційно-фотоколориметричного визначення [5]: об'єми розчину метилового оранжевого, ацетатного буферного розчину та хлороформу, кількість екстракцій іонного асоціату відповідним органічним розчинником, а також оптимальне значення pH буферного розчину, для чого нами було виготовлено ряд ацетатних буферних розчинів з pH

Таблиця 3

Метрологічні характеристики градуювальної залежності оптичної густини від вмісту міансерину (y = bx + a), отриманої УФ-спектрофотометричним та екстракційно-спектрофотометричним методами

Метод	r	b	a	S^2	Δb	Δa
УФ-спектрофотометричний	0,9998	0,00780	0,016	$6 \cdot 10^{-5}$	0,00008	0,007
Екстракційно-спектрофотометричний	0,9997	0,00570	0,018	$4 \cdot 10^{-4}$	0,00004	0,005

Таблиця 4

Результати УФ-спектроскопічного визначення міансерину в модельних розчинах (середнє з п'яти визначень)

Взято міансерину, мкг	Оптична густина	Знайдено міансерину		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
15	0,134	15,2	101,5	$\bar{X} = 99,4$ $S = 1,38$ $S_{\bar{x}} = 0,46$ $\Delta\bar{X} = 1,1$ $\varepsilon = 1,1$ $\bar{X}\pm\Delta\bar{X} = 99,4\pm1,1$
30	0,246	29,5	98,2	
45	0,360	44,2	98,1	
60	0,476	59,1	98,5	
75	0,595	74,3	99,0	
90	0,724	90,8	100,9	
105	0,821	103,3	98,4	
120	0,962	121,3	101,1	
135	1,054	133,1	98,6	

Таблиця 5

Результати екстракційно-спектрофотометричного визначення міансерину за реакцією утворення іонного асоціату з метиловим оранжевим в модельних розчинах (середнє з п'яти визначень)

Взято міансерину, мкг	Оптична густина	Знайдено міансерину		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
25	0,157	24,4	97,5	$\bar{X} = 99,6$ $S = 2,73$ $S_{\bar{x}} = 0,96$ $\Delta\bar{X} = 2,3$ $\varepsilon = 2,3$ $\bar{X}\pm\Delta\bar{X} = 99,6\pm2,3$
50	0,310	51,4	102,8	
75	0,433	72,9	97,2	
100	0,574	97,6	97,6	
125	0,719	123,1	98,5	
150	0,850	146,1	97,4	
175	1,031	177,8	101,6	
200	1,201	207,6	103,8	

від 3,0 до 6,0. Отримані результати потім нами були використані при встановленні градуювальної залежності для екстракційно-спектрофотометричного визначення міансерину гідрохлориду, методика якого наведена вище.

Для розрахунку вмісту міансерину в модельних розчинах УФ-спектрофотометричним та екстракційно-спектрофотометричним методами використовували градуювальні графіки або рівняння (1) та (2), відповідно, які мали вигляд:

$$A = 0,0078\cdot C + 0,016 \qquad (1)$$

$$A = 0,0057\cdot C + 0,0178, \qquad (2)$$

де: A – оптична густина; C – концентрація розчину міансерину гідрохлориду, відповідно, мкг/мл або мкг в пробі.

Загальний вигляд вищенаведених рівнянь відповідає лінійній регресії виду: $y = bx + a$. Значення параметрів *a* та *в* розраховували за методом найменших квадратів. Метрологічні характеристики отриманих градуювальних залежностей наведені в табл. 3. Після перевірки значущості параметра *a* у рівняннях (1) та (2) було зроблено висновок про неможливість переходу до рівняння виду: $y = b'x$.

Світлопоглинання розчинів підлягало закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 10 до 150 мкг/мл (УФ-спектрофотометричний метод) та від 10 до 200 мкг міансерину в пробі в 15 мл кінцевого об'єму (екстракційно-спектрофотометричний метод у видимій області).

Результати кількісного визначення міансерину у модельних розчинах УФ-спектрофотометричним та екстракційно-спектрофотометричним методами наведені в табл. 4 та 5 відповідно. Як видно, відносна невизначеність середнього результату для УФ-спектрофотометричного методу становила ±1,1%, для екстракційно-спектрофотометричного – ±2,3%.

ВИСНОВКИ

1. Вивчено хроматографічну поведінку міансерину у рухомих фазах, які є загальноприйнятими у токсикологічному скринінгу речовин основного характеру з використанням чотирьох типів тонких шарів.
2. Встановлено умови виявлення міансерину за допомогою кольорових експрес-тестів.
3. Досліджено УФ-спектр поглинання міансерину в 0,1 М розчині кислоти хлоридної та визначені коефіцієнти світлопоглинання.
4. Розроблено методики УФ-спектрофотометричного та екстракційно-спектрофотометричного у видимій області (за реакцією з метиловим оранжевим) визначення міансерину. Світлопоглинання розчинів підлягало закону Бугера-Ламберта-Бера в межах концентрацій від 10 до 150 мкг/мл (УФ-спектрофотометричний метод) та від 10 до 200 мкг міансерину у пробі в 15 мл кінцевого об'єму (екстракційно-спектрофотометричний метод). Відносна невизначеність середнього результату складала для запропонованих методів ±1,1% та ±2,3% відповідно.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Баюрка С.В., Бондар В.С., Болотов В.В. та ін. // Вісник фармації. – 2010. – №4 (64). – С. 33-37.*
2. *Вергейчик Т.Х. Токсикологическая химия. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 400 с.*
3. *Гончарук Н.В., Галькевич І.Й. // Мед. хімія. – 2008. – Т. 10, №1. – С. 118-120.*
4. *Гончарук Н.В., Галькевич І.Й. // Фармац. журн. – 2008. – №6. – С. 58-61.*
5. *Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В. Анализ наркотических средств. – М.: Мысль, 1993. – 272 с.*
6. *Коренман И.М. Фотометрический анализ: Методы определения органических соединений: Изд. 2-е; перераб. и доп. – М.: Химия, 1975. – 359 с.*

7. *Крамаренко В.П. Токсикологічна хімія. – К.: Вища шк., 1995. – 423 с.*
8. *Крылов В.И. // ФАРМиндекс-Практик. – 2003. – Вып. 5 – С. 22-32.*
9. *Машковский М.Д. Лекарственные средства: 15-е изд. – М.: ООО «Изд-во Новая Волна», 2006. – С. 108-109.*
10. *Bjorhovde A., Halvorsen G.T., Rasmussen K.E. et al. // Anal. Chim. Acta. – 2003. – Vol. 491, №2. – P. 155-161.*
11. *Clark's analysis of Drugs and Poisons: Third edition [Електронний ресурс] / Laurent Y. Galichet. – 80 Min / 700 MB. – 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.*
12. *Devani M.B., Pandya S.S., Shah S.A. // Ind. J. Pharm. Sci. – 1990. – Vol. 52, №2. – P. 123-124.*
13. *Druid H., Holmgren P. // J. For. Sci. – 1997. – №42. – P. 79-87.*
14. *Jönsson A., Holmgren P., Ahlner J. // Forens. Sci. Int. – 2004. – Vol. 143. – P. 53-59.*
15. *Namera A., Watanabe T., Yashiki et al. // J. Anal. Tox. – 1998. – №22.– P. 396-400.*
16. *Randall C.B. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. – California, Foster City: Chemical Toxicological Institute, 2000. – P. 488-489.*
17. *Shinozuka T., Terada M., Tanaka E. // Forens. Sci. Int. – 2006. – Vol. 162. – P. 108-112.*

УДК 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИАНСЕРИНА, ПРИГОДНЫХ ДЛЯ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

С.В.Баюрка

Изучены условия идентификации миансерина с помощью тонкослойной хроматографии, цветных реакций, УФ-спектроскопии. Разработаны методики УФ-спектрофотометрического и экстракционно-спектрофотометрического в видимой области определения миансерина по реакции с метиловым оранжевым. Относительная неопределенность среднего результата для предложенных методов составляла ±1,1% и ±2,3% соответственно.

UDC 615.065:54.061/.062:547.712.22:001.8

DEVELOPMENT OF IDENTIFICATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION METHODS OF MIANSERIN SUITABLE FOR THE CHEMICAL AND TOXICOLOGICAL ANALYSIS

S.V.Bayurka

The conditions of mianserin identification by means of the Thin Layer Chromatography, colour reactions and UV-spectroscopy have been studied. The methods of UV-spectrophotometry and extraction spectrophotometry of mianserin quantitative determination in the visible region by the reaction with methyl orange have been developed. The relative error of the methods suggested was ±1.1% and ±2.3%, respectively.