

KAPITEL 1 / CHAPTER 1¹
**DEVELOPMENT OF METHODS OF CHEMICAL-TOXICOLOGICAL
ANALYSIS OF THE ANTIDEPRESSANT MIANSERINE**

DOI: 10.30890/2709-2313.2024-26-00-035

Вступ

Серед захворювань центральної нервової системи депресія є одним з найбільш поширених психічних розладів. Це патологічний стан організму, виникнення якого пов'язане з дефіцитом одного з трьох головних біогенних амінів – серотоніну, норадреналіну або дофаміну .

Депресія розцінюється спеціалістами, як стан із характерним відчуттям туги, відчаю, пригніченості, розумової та рухової загальмованості. Розрізняють три види депресій:

- психогенні або реактивні – виникають у відповідь на реальні чинники (горе, страх) і зустрічаються найчастіше до 70%;

- ендогенні – виникають внаслідок ендогенно-обумовлених порушень біохімічних процесів у ЦНС і проявляються нездатністю впоратися із звичайними стресами (зустрічаються у 25%);

- соматичні – виникають при різноманітних соматичних захворюваннях (10–15%) .

В медичній практиці для лікування депресивних станів використовуються різні групи антидепресантів, які сприяють поверненню активності та підвищенню життєвого тонусу [1].

Антидепресанти, як новий клас психоактивних речовин з'явилися в кінці 50-х років ХХ століття, коли швейцарський психіатр R. Kuhn вперше повідомив про терапевтичний ефект іміпраміну, який спостерігався у депресивних хворих. Дещо пізніше з'явилися дані, що протитуберкульозний препарат іпроніазид викликає ейфоризуючу та збуджуючу дію на пацієнтів. Вслід за цими відкриттями розпочався пошук нових активних сполук з антидепресивними властивостями [2, 3].

¹*Authors: Horlachuk Natalja*



Спектр застосування антидепресантів достатньо широкий. Крім психіатричних показань, антидепресивні препарати використовуються в комплексній терапії при багатьох психосоматичних захворюваннях, зокрема: різноманітних больових синдромах, виразковій хворобі шлунку та дванадцятипалої кишки, нейродермітах, енурезі.

В теперішній час існує понад 50 діючих речовин, які відносяться до антидепресантів. Вони представлені декількома сотнями препаратів і виробляються різними фармацевтичними фірмами. Із них в Україні зареєстровано 41 торгова назва, причому постійний прогрес фармацевтичної науки та створення нових препаратів не дає можливості зупинитися на досягнутому .

Існують різні підходи до систематики і класифікації антидепресантів.

В даний час виділено не менше 10 різноманітних класів антидепресантів. Класифікація, яка заснована на особливостях хімічної будови антидепресантів, виділяє наступні групи препаратів:

1. Моноциклічні антидепресанти: флуоксатин, флувоксамін, мілнацепран, бупропіон, вілоксазин, оксафлоран, орфенадрин та інші.
2. Біциклічні: серталін, пароксетин, цитолопрам, тразодон, бефуралін, цитапром та інші.
3. Трициклічні: іміпрамін, амітриптілін, тріміпрамін, дезипрамін, доксерін, тіанептин, кломіпрамін.
4. Тетрациклічні: міансерин, мапротилін, міртазапін, ліразидол.
5. Похідні бензамідів: маклобемід.
6. Похідні гідразину: фенелзин, ніаламід [4].

1.1. Загальна характеристика міансерину

Об'єктами нашого дослідження є міансерин, який використовується у психіатричній практиці для лікування та профілактики депресивних станів.

Міансерин в медичній та фармацевтичній практиці зустрічається під синонімами: атиміл, болвідон, бонсерин, гопасен, лантанон, лерівон, люмін, міабене, міанеурин, міаксан, нарвал, призма, талмін, толвон.

Міансерин – похідне чотирьохциклічних антидепресантів, відноситься до піперазино-азепінових похідних. У хімічному відношенні він представляє собою – 1,2,3,4,10,14,б-гексагідро-2-метилдibenзо-с,f-піразино-1,2-а-азепіну гідрохлорид [5]:

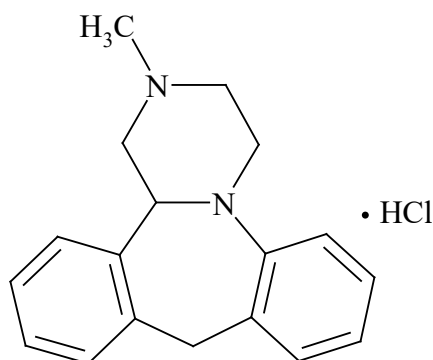


Рисунок 1- Структурна формула міансерину

Джерело [5]

М.м. (C₁₈H₂₀N₂·HCl)=300,9 г/моль

t_{топл} = 282°C

Це білий кристалічний порошок без запаху, який розчиняється у воді (1:50), в етанолі (1:100), в хлороформі (1:20).

Поряд із лікувальними властивостями препарати виявляють токсичну дію на організм і являються причиною отруєнь. Описані смертельні отруєння даними препаратами [6].

Родоначалником нової групи антидепресантів з переважаючим рецепторним механізмом дії являється міансерин, який одержав назву типічного антидепресанта у зв'язку з відсутністю у нього помітного впливу на зворотне захоплення моноамінів і здатність інгібувати MAO. Це сполука чотирьохциклічної структури .

Периферичний ланцюг міансерину приєднується до четвертого кільця і завдяки цьому антидепресивна активність повністю зберігається, а побічні



ефекти зменшуються. Він блокує 5-HT₂ рецептори в ЦНС. Посилює адренергічну передачу до головного мозку і таким чином стимулює вивільнення медіаторів в синаптичну щілину [7]. Він є селективним блокатором зворотнього захоплення норадреналіну .

У хімічній структурі міансерину відсутній боковий ланцюг, який визначає холіноблокуючу дію трициклічних антидепресантів. По антидепресивній активності ефективність досліджуваного препарату співставлена з іншими сучасними антидепресантами. При цьому його особливість полягає в тому, що він має анксиолітичну дію і позитивно впливає на сон [8, 9].

Міансерин також проявляє антистресову активність, що дуже важливо при лікуванні пацієнтів у яких депресія поєднується із тривогою [10]. Використовують даний препарат при ендогенних, психогенних і соматогенних депресіях. Нещодавно у вітчизняних та іноземних джерелах з'явилися дані про використання міансерину (лерівону) в якості анальгетичного засобу при головних болях і фіброміалгії [11].

Цікаві дані були одержані норвежськими вченими при лікуванні міансерином функціональних розладів шлунково-кишкового тракту. Міансерин являється агоністом як H₁, так і H₂ гістамінових рецепторів, тому при прийомі знижується секреція шлункового соку і стимулюється перистальтика кишківника [12].

Даний лікарський засіб добре переноситься, особливо геріатричними хворими і пацієнтами, які страждають серцево-судинними захворюваннями. Дозування підбирають індивідуально. Рекомендована початкова добова доза 30 мг, з подальшим поступовим підвищенням до 60-90 мг. Лікування адекватними дозами призводять до позитивних результатів протягом 2-4 тижнів терапії .

При пероральному прийомі міансерин швидко всмоктується в шлунково-кишковому тракті. Його біодоступність складає 20%. Максимальна концентрація міансерину в плазмі крові досягається через 3 год. після прийому терапевтичних доз і становить від 0,04-0,09 мг/л [13].

За даними ряду авторів зв'язування міансерину з білками плазми крові

становить 95%. Рівновага концентрації міансерину в плазмі досягається після 6-ти денного приймання. Період піввиведення досліджуваного препарату після приймання разової дози становить 21-30 год., після багаторазового прийому – 61 годину [13].

Біотрансформація міансерину проходить в два етапи: перший етап – реакції 8-гідроксилування, N-деметилування та N-окислення, які протікають із затратою необхідної для цього енергії; другий етап – реакції кон'югації (з'єднання з білками та глюкуроною кислотою).

За літературними даними [14] основними метаболітами є 8-гідроксо-міансерин(I) і деметилміансерин (II) (рис. 2):

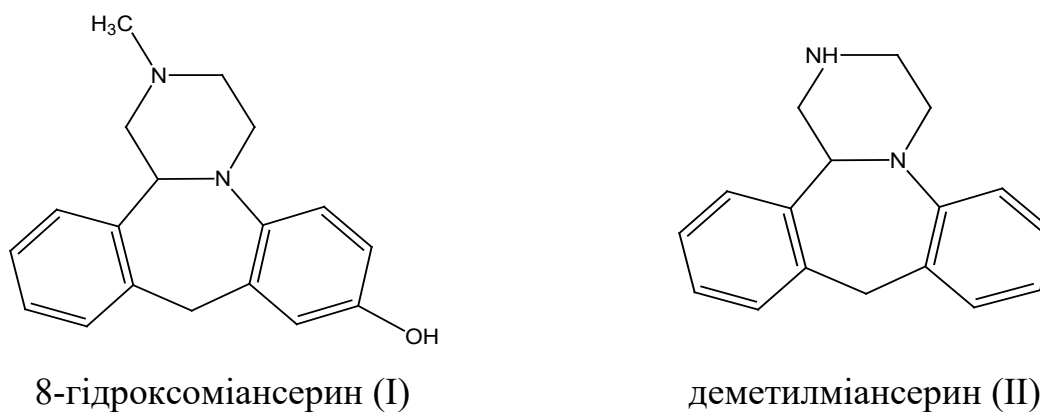


Рисунок 2 - Структурні формули метаболітів міансерину

Джерело [14]

Frahnert C., Rao M., Grasmader K. [15] досліджували вісімнадцять атипічних антидепресантів і вивчали їх метаболізм на тваринах. Для виявлення метаболітів використовували сечу та кров щурів. За допомогою ВЕРХ визначали активні метаболіти міансерину: 8-гідроксоміансерин і деметилміансерин.

Toshio C., Toyoko H. [16] вивчали метаболізм міансерину. Головною ферментативною реакцією детоксикації в печінці є окислення міансерину на цитохромі Р-450. Потрапляючи в організм, даний лікарський засіб з'єднується з альбумінами і у вигляді комплексу транспортується в печінку. На цитохромі Р-450 в мембранах ендопластичної сітки гепатоцитів проходить окислення



міансерину, утворюючи його метаболіти.

Laimer M., Kramer-Reinstadler K., Rauchenzauner M. [17] проводили вивчення ефективності міансерину та його кінетичного розподілу в мозку, крові, кишківнику, печінці та нирках, а також досліджували метаболізм препарату. Найбільші кількості міансерину спостерігалися в мозку, печінці і крові до 55% препарату від введеної дози. Метаболізується в печінці шляхом деметилювання і окислення. До 64-74% дози виводиться сечею в перші декілька днів, в основному у вигляді метаболітів, до 8-28% – кишківником в незміненому виді.

Небажані побічні ефекти при терапії міансерином різноманітні і пов'язані з фармакодинамічними властивостями препарату. Зокрема, описані такі побічні та токсичні прояви міансерину, як алергічні реакції шкіри, порушення зору, сонливість, в перші дні прийому гіпоманіакальний стан, судоми, артеріальна гіпотензія, порушення функції печінки, жовтяниця, набряки, лейкопенія, важкий агранулоцитоз, тромбоцитопенія .

Newman B., та Haine Se. [18, 19] вивчали вплив міансерину на серцево-судинну систему. Було доведено, що великі дози та тривалий прийом препарату приводить до розвитку кардіотоксичної дії. Кардіотоксичність міансерину проявляється порушенням провідності в атріовентрикулярному вузлі та шлуночках серця, вентрикулярною тахікардією[20].

Міансерин несумісний з інгібіторами MAO, після їх прийому необхідний двохтижневий інтервал. Алкоголь разом із досліджуваним препаратом посилює депримируючий вплив на центральну нервову систему. Зокрема Schaper A. та Koski A. із колегами [9, 10], описують смертельні випадки отруєння міансерином в поєднанні із алкогольними напоями та психотропними засобами, такими як пропоксифен і пропазин.

Зафіксовано смерть людини, що була зумовлена міансерином в дозі 3,8 мг/кг. Летальною дозою міансерину вважають 1200 мг і більше [21, 22], при цьому вміст в крові 2,3 мг/л, а в печінці – 8,1 мг/кг.

2. Методи ідентифікації за допомогою хімічних реакцій

Для ідентифікації міансерину та тіанептину Британська Фармакопея [23] пропонує метод інфрачервоної абсорбційної спектроскопії (спектр, що досліджується повинен відповідати спектру міансерину гідрохлориду та тіанептину натрієвій солі EPCRS). Також для ідентифікації міансерину гідрохлориду пропонується реакція на хлориди з розчином срібла нітрату в кислому середовищі, а для тіанептину – реакція на натрій з цинкураніацетатом. Крім того для якісного аналізу міансерину та перевірки на присутність домішок використовують метод тонкошарової хроматографії (ТШХ) з проявленнями парами йоду (система розчинників метанол- дихлорметан (10:90).

Європейська фармакопея пропонує для кількісного визначення міансерину та тіанептину застосовувати метод ВЕРХ, використовуючи, як мобільну фазу метанол-ацетонітрил доведений до рН 2,5 за допомогою фосфатної кислоти для тіанептину і метанол-калію дигідрогенфосфат доведений до рН 7 для міансерину. Хроматографічний аналіз проводиться в сталій колонці довжиною 0,25 м та внутрішнім діаметром 4,6 см, заповненій хімічно модифікованим октадецилсілілсилікагелем [24].

Для ідентифікації міансерину хімічними методами ми використовували осадкові та кольорові реакції. Для цього застосовували ряд реактивів, які при взаємодії з досліджуваними препаратами давали позитивні чи негативні результати.

З ряду апробованих реактивів позитивні ефекти кольорових реакцій спостерігалися із реактивом Манделіна (розчин 0,01 г амонію ванадату в 2 мл концентрованої сульфатної кислоти), реактивом Маркі (суміш 1 мл концентрованої сульфатної кислоти і 1 краплі формальдегіду), реактивом Ерדмана (суміш 20 мл концентрованої сульфатної кислоти та 10 мл розведеної нітратної кислоти), реактивом Фреде (розчин амонію молібдату в концентрованій сульфатній кислоті), реактивом Лібермана (1% розчин натрію нітриту в концентрованій сульфатній кислоті), з концентрованими сульфатною



та нітратною кислотами.

Для виконання кольорових реакцій використовували хлорформові розчини міансерину із вмістом 200 мкг/мл кожного із препаратів. По 2-3 краплі цих розчинів наносили в заглиблення фарфорової пластинки і після випаровування хлороформу додавали по 2 краплі відповідних реактивів, проби перемішували скляною паличкою і відмічали колір продуктів реакції. Паралельно на пластинку наносили краплю відповідного реактиву (контрольний дослід) [25]. Результати спостережень наведені в табл. 1.

Таблиця 1- Результати кольорових реакцій міансерину з різними реактивами

№ п/п	Реактив	Міансерин	
		Колір продукту	Межа виявлення, мкг
1.	Реактив Манделіна	Фіолетово- зелене	0,2
2.	Реактив Маркі	Фіолетово- рожеве	0,3
3.	Реактив Фреде	Коричневе	5
4.	Реактив Ерדмана	Червоне	5
5.	Реактив Лібермана	Зелене	10
6.	H ₂ SO ₄ (конц.)	Червоно-оранжеве	10
7.	HNO ₃ (конц.)	Темно-червоне	5

Авторська розробка

Результати, наведені в таблиці 1 показують, що міансерин дає позитивні кольорові реакції зі всіма реагентами, перерахованими вище. Найчутливішими для виявлення міансерину є реакції з реактивами Манделіна та Маркі. Межа виявлення 0,2-0,3 мкг міансерину в пробі.

Нами також вивчалась реакційна здатність досліджуваного препарату із загальноосадковими реактивами. Реакції осадження проводили на предметному склі. Для цього в центр предметного скла наносили по 2 краплі хлороформових розчинів міансерину із вмістом 200 мкг відповідного препарату в 1 мл розчину і при кімнатній температурі випаровували органічний розчинник досуха. Сухий залишок на предметному склі розчиняли у 1-2 краплях 0,01 н. розчину кислоти

хлоридної. Поряд з цим розчином на предметне скло наносили краплю одного з реактивів, з'єднуючи краплі за допомогою скляної палички. Результати спостережень наведені в табл. 2. [25].

Таблиця 2- Результати осадових реакцій міансерину з осадовими реактивами

№ п/п	Реактив	Міансерин	
		Колір та характер осаду	Межа виявлення, мкг
1	2	3	4
1.	Реактив Драгендорфа модифікований за Мун'є	Темно-коричневий, аморфний (осад)	3
2.	Реактив Драгендорфа	Оранжевий, аморфний	5
3.	Реактив Бушарда	Чорно-коричневий,	5
4.	Реактив Майера	Білий, аморфний	10
5.	1% розчин калію перманганату	Темно-коричневий, аморфний	5
6.	2% розчин феруму (III) хлориду	Жовто-зелений, аморфний	3
7.	0,5% розчин пікринової кислоти	Жовтий, аморфний	5
8.	Реактив Зоненшейна	Білий, аморфний	10
9.	Реактив Вагнера	Коричневий, аморфний	30
10.	Сіль Рейнеке	Білий, аморфний	20

Авторська розробка

Дані, які наведені в таблиці 2 свідчать про те, що з більшістю реактивів групового осадження міансерин утворює аморфні осадки. Найчутливішими реактивами є реактив Драгендорфа модифікований за Мун'є, який дозволяє виявити 3 мкг міансерину в пробах.

Осадкові та кольорові реакції рекомендовано нами для виявлення міансерину та тіанептину в біологічних об'єктах при суїцидних отруєннях, а також в промивних водах шлунку при проведенні клініко-токсикологічного аналізу для



швидкої діагностики отруєнь з метою вибору методу лікування. При проведенні судово-хімічного аналізу дані тести вказують лише на наявність ксенобіотика у витяжці з трупного матеріалу [25].

1.3. Ідентифікація міансерину методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту

В судово-хімічному аналізі метод хроматографії в тонкому шарі сорбенту (ТШХ) застосовують як один із експресних методів, який дозволяє ідентифікувати і розділяти токсичні речовини різних груп, виділені із біологічного матеріалу. У лабораторній діагностиці гострих отруєнь даний метод дозволяє одержати потрібну інформацію за короткий термін, використовуючи мінімальний об'єм досліджуваної проби. Висока чутливість, широкі можливості у визначенні хімічних сполук різної будови, відносна простота і доступність техніки експерименту забезпечують методу ТШХ широке застосування. Використання реактивів селективних для певних класів хімічних сполук, в першу чергу наркотичних, психотропних та сильнодіючих речовин, різко підвищує надійність їх ідентифікації. Хроматографічні зони досліджуваних речовин легко елюються із пластинок, що дозволяє додатково підтверджувати інформацію про ці речовини результатами дослідження з використанням інших методів, наприклад спектральних.

Виявлення міансерину, а також його метаболітів методом ТШХ в літературі висвітлено недостатньо. У зв'язку з чим нами проводились дослідження, мета яких включала розробку складу оптимальних систем хроматографічного розділення суміші міансерину та тіанептину, які можна рекомендувати для проведення цілеспрямованого дослідження на вказані препарати, якими підтверджується їх наявність в досліджуваних пробах, і для проведення скринінгових досліджень зразків невідомої природи.

На першому етапі нами проводилось визначення придатності

хроматографічних систем, які найчастіше застосовуються в міжнародній практиці судово-хімічних та клінічних лабораторій для виявлення речовин, що характеризуються різними кислотно-основними властивостями. Системи, серед яких проводився вибір, широко використовуються в стандартних аналітичних тестах, у науково-дослідних лабораторіях західної Європи та в літературних оглядах загального скринінгу лікарських речовин [26, 27, 28]. Серед таких стандартизованих систем, які найчастіше використовуються для розділення наркотичних і психотропних речовин, нами були вибрані наступні системи: етилацетат, хлороформ-метанол (9:1), хлороформ-ацетон (10:10) та етилацетат-метанол-25% аміак (17:2:1).

В даних системах вивчали хроматографічну поведінку міансерину і тіанептину в присутності ряду препаратів: флуоксетину, меліпраміну, трамадолу та амітриптіліну, які екстрагували з біологічних витяжок одночасно із досліджуваними препаратами.

Для проведення ТШХ-скринінгу використовували хроматографічні пластинки „Sorbfil” (силікагель СТХ-1А, фракція 5-17 мкм, товщина шару 110 мкм, тип основи – алюміній, розмір пластинки 10×10 см). Перед використанням пластинки активували в сушильній шафі при температурі 105°C протягом 30 хв. Активовані пластинки зберігали в ексікаторі над шаром прокаленого кальцію хлориду.

Хроматографування проводили в камерах об'ємом 1000 см³, в які вносили по 50 мл відповідної системи розчинників (камеру насичували протягом 60 хв.), довжина пробігу розчинників – 8 см.

На лінію старту, на відстані 1,5 см від нижнього краю хроматографічної пластинки мікрошприцем наносили зразки розчинів міансерину, тіанептину, трамадолу, меліпраміну, флуоксетину та амітриптіліну. Для нанесення на пластинки використовували хлороформові розчини цих препаратів з концентраціями по 500 мкг/мл кожного із них.

Пластинки поміщали в камери і після досягнення системою розчинників лінії фронту, їх виймали, підсушували на повітрі та проявляли рядом реактивів.



Для проявки використовували проявники: 10% розчин купруму (II) сульфату, з наступною обробкою пластинок 0,3 М розчином калію йодиду, реактив Драгендорфа, реактив Манделіна, 0,1% розчин бромтимолового синього, 0,2% розчин нінгідрину та опромінення пластинок УФ-променями.

Результати виявлення міансерину у присутності трамадолу, меліпраміну, флуоксетину, тіанептину та амітриптіліну методом ТШХ наведені в таблиці 3, а колір плям та межа виявлення кожного із препаратів відповідним реактивом наведені в таблиці 1.

Як свідчать дані, представлені в таблиці 3, усі системи розчинників, які застосовуються для виявлення речовин можна використовувати для експрес-скринінгу міансерину. При цьому встановлено, що реактивом Драгендорфа, модифікованим за Мун'є, проявляються плями всіх досліджуваних препаратів (див. таб.1). При позитивних пробах на досліджуванні препарати проводили підтверджуючі хроматографічні тести в запропонованих нами системах.

Таблиця 3 - Значення R_f міансерину у суміші з іншими препаратами в загальних системах розчинників ТШХ

Препарат	R _f у системах розчинників			
	Хлороформ-ацетон (10:10)	Етилацетат-метанол-аміак (17:2:1)	Хлороформ-метанол (9:1)	Етилацетат
Міансерин	0,63	0,76	0,54	0,82
Тіанептин	0,10	0,34	0,46	0,38
Флуоксетин	0,65	0,47	0,24	0,78
Трамадол	0,23	0,63	0,78	0,07
Амітриптілін	0,64	0,68	0,31	0,51
Меліпрамін	0,52	0,45	0,44	0,78

Авторська розробка

Як свідчать дані, представлені в таблиці 3, усі системи розчинників, які застосовуються для виявлення речовини можна використовувати для експрес-скринінгу міансерину. При цьому встановлено, що реактивом Драгендорфа, модифікованим за Мун'є, проявляються плями всіх досліджуваних препаратів.

При позитивних пробах на досліджуванні препарати проводили підтверджуючі хроматографічні тести в запропонованих нами системах.

Вибір оптимальних систем розчинників різної полярності проводили із врахуванням їх здатності розділяти міансерин та тіанептин. При вивченні роздільної здатності враховували значення величин R_f , які в оптимальному повинні бути близькими до 0,5.

Підтверджуючі тести проводили в системах розчинників: метанол-ацетонітрил-25% аміак (30:10:5), метанол-25% аміак (40:5), ацетон-етилацетат-льодова ацетатна кислота (10:20:2) та метанол-ацетон (10:10).

Для визначення роздільної здатності даних систем використовували такі типи сорбентів: „Sorbfil”(10×10 см, силікагель СТХ-А, на алюмінієвій основі), „Silufol”(15×15 см, сорбент Silpearl, UV 254 на алюмінієвій основі) та „Merck” (10×20 см, силікагель 60 UV 254, алюмінієва основа).

На пластинках на висоті 1,5 см вище нижнього краю відмічали лінію старту, на яку наносили по декілька крапель хлороформних розчинів міансерину (10 мкг/мл). Після цього пластинки з підсушеними на повітрі плямами нанесених речовин поміщали в камери для хроматографування, насичені парами відповідних систем розчинників (60 хв.). Пластинки „Merck” і „Silufol” знаходилися в камерах до тих пір, поки системи розчинників піднімалися на висоту 10 см вище лінії старту, фронт систем розчинників на пластинках Sorbfil становив 8 см.

Для проявлення плям міансерину використовували УФ-світло з наступною обробкою пластинок 0,1% розчином бромтимолового синього та реактивом Манделіна. Міансерин при опроміненні УФ-променями на пластинці проявляється у вигляді голубуватої флуоресценції. При обробці пластинок реактивом Манделіна плями міансерину забарвлюються у фіолетовий колір. А при обробці 0,1% розчином бромтимолового синього [25].

Значення R_f досліджуваних препаратів в підтверджуючих системах розчинників наведені в таблиці 4.



Таблиця 4- Значення Rf міансерину та тіанептину в підтверджуючих системах розчинників

Система розчинників	Величина Rf на пластинках					
	„Silufol”		„Sorbfil”		„Merk”	
	Міансерин	Тіанептин	Міансерин	Тіанептин	Міансерин	Тіанептин
Метанол-ацетонітрил-25% аміак (30:10:15)	0,60	0,32	0,58	0,35	0,59	0,38
Метанол-25% аміак (40:5)	0,47	0,24	0,45	0,28	0,43	0,26
Ацетон-етилацетат-льодова ацетатна кислота (10:20:2)	0,76	0,63	0,74	0,59	0,77	0,54
Метанол-ацетон (10:10)	0,71	0,58	0,67	0,54	0,73	0,54

Авторська розробка

Дані, які представлені в таблиці 4 свідчать, що в усіх системах досліджувані препарати добре розділяються між собою і це дозволяє використовувати їх в якості підтверджуючих тестів при аналізі зразків біологічного матеріалу на наявність міансерину та тіанептину. Оптимальне значення Rf міансерину є у системах метанол-ацетонітрил-25% розчин аміаку (30:10:15) та метанол-25% розчин аміаку (40:5); При виявленні міансерину пластинку доцільно обробляти реактивом Манделіна, при цьому межа виявлення даного препарату становить 0,2 мкг. А при використанні УФ-променів, межа виявлення даних препаратів становить 0,5 мкг міансерину та 1 мкг тіанептину в пробі.

1.4. Ідентифікація міансерину методом УФ- спектрофотометрії

Дуже часто в хіміко-токсикологічному аналізі для встановлення ідентичності сполук використовують спектрофотометію в УФ-ділянці спектру. Провести повну ідентифікацію речовин на основі лише результатів УФ-спектроскопії в судово-хімічному аналізі практично неможливо, оскільки часто спостерігається інтерференція, зумовлена попаданням в організм декількох лікарських засобів або сполук. Проте, при дослідженні чистих екстрактів із біологічних об'єктів аналізу, а також при дослідженні зразків залишків препаратів із місця події, чи при дослідженні рвотних мас УФ-спектроскопія все ще залишається одним із інформативних методів експрес-аналізу речовин, що стали причиною отруєнь. Наявність максимумів поглинання в досліджуваній речовині може пригодитися для попередньої ідентифікації, оскільки в теперішній час узагальнено УФ-спектральні характеристики багатьох сотень токсикологічно-важливих речовин та їх метаболітів, що дозволяє використовувати отримані дані в хіміко-токсикологічному аналізі.

У зв'язку з цим, ми вивчили УФ-спектри міансерину в розчинниках, які відрізняються за своєю полярністю: етанолі, хлороформі, бензені та 0,1 М розчині кислоти хлоридної і 0,1 М розчині натрію гідроксиду. Отримані дані ми використали для ідентифікації міансерину, виділеного із біологічного матеріалу (печінки, крові, сечі, мозку та шлунку із його вмістом). Для зняття УФ-спектрів готували розчини міансерину у відповідному розчиннику, із вмістом препарату 20 мкг/мл.

УФ-спектри світлопоглинання знімали за допомогою спектрофотометра СФ-46, в кюветі з товщиною поглинаючого шару 1 см. В якості розчинів порівняння використовували відповідний розчинник.

Характер УФ-спектрів міансерину в різних розчинниках представлені на рис. 3.

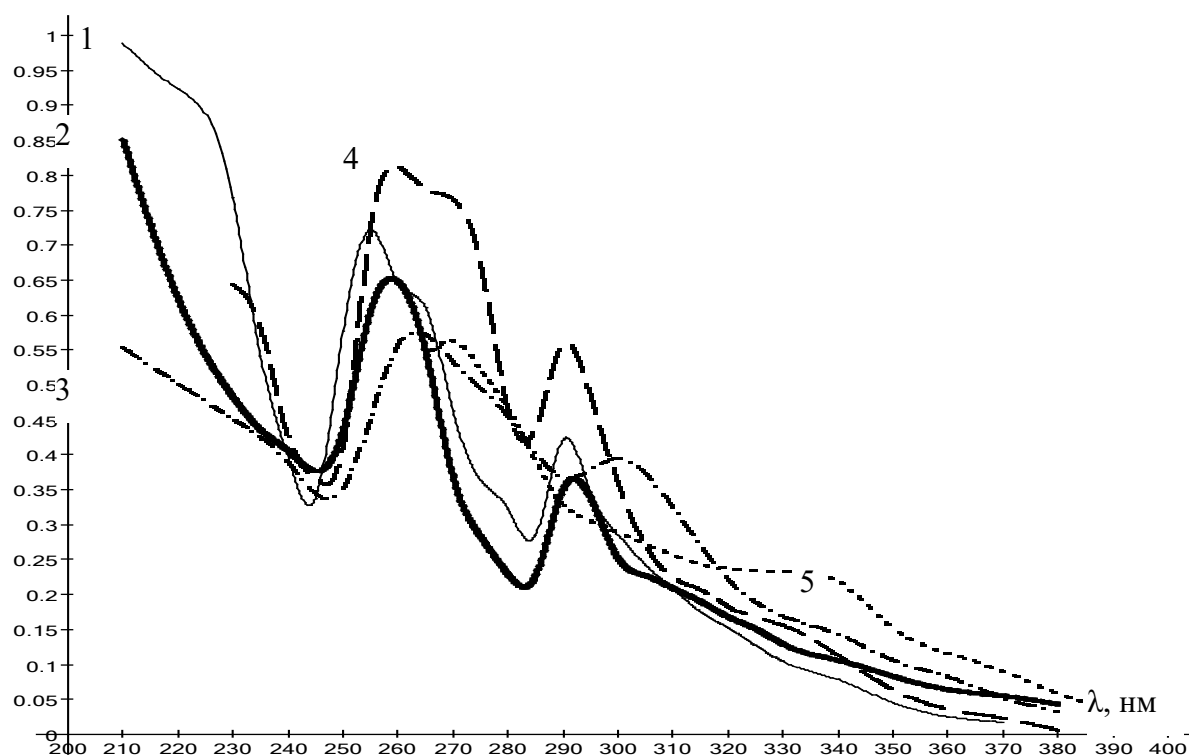


Рисунок 3 - УФ-спектри міансерину в різних розчинниках:

1 – 0,1 М НСІ; 2 – етанол; 3 – 0,1 М NaOH; 4 – хлороформ; 5 – бензен.

Джерело: побудовано автором

УФ-спектри міансерину (рис. 3.) характеризуються двома смугами поглинання та одним плечем в діапазоні довжин хвиль від 220 до 360 нм у всіх розчинниках. Положення максимумів поглинання та інтенсивність смуг поглинання значною мірою залежать від природи розчинника (табл.5).

Таблиця 5- Характеристики УФ-спектрів поглинання міансерину в різних розчинниках

Розчинник	$\lambda_{\max 1}$, нм	$A_{1\text{cm}}^{1\%}$	ϵ	$\lambda_{\max 2}$, нм	$A_{1\text{cm}}^{1\%}$	ϵ
0,1 М НСІ	255	361	9546	290-291	211	5574
0,1 М NaOH	261	278	7351	295	191	5055
етанол	260-262	324	8552	291	183	4841
хлороформ	257-259	406	10731	295-296	278	7353
бензен	272	287	7589	344	119	3137

Авторська розробка

Зокрема в 96% етанолі та 0,1 М розчині гідроксиду натрію УФ-спектри м'ансерину подібні між собою, як за інтенсивністю поглинання, так і за положенням максимумів світлопоглинання. Так, УФ-спектр в етанолі має дві смуги поглинання з максимумами при 260-262 нм і 291 нм, а в 0,1 М розчині гідроксиду натрію при 261 нм і 295 нм. У хлороформі інтенсивність світлопоглинання значно зростає. В цьому розчиннику спостерігається дві смуги поглинання з максимумами при 257-259 нм і 295-296 нм. В бензені спостерігається багатохромне зміщення в довгохвильову ділянку спектру і максимуми двох смуг поглинання знаходяться при довжинах хвиль 272 нм і 344 нм. В 0,1 М розчині хлоридної кислоти препарат має дві смуги поглинання з максимумами при 255 нм і 290-291 нм.

Враховуючи характер УФ-спектрів світлопоглинання м'ансерину перша смуга поглинання зумовлена наявністю $p-\pi$ електронного переходу ароматичного конденсованого циклу з атомом N, про що свідчить сильне гіпсохромне зміщення першої смуги поглинання в короткохвильову ділянку в 0,1 М розчині хлоридної кислоти. Друга смуга поглинання зумовлює $\pi-\pi^*$ електронним переходом.

1.5. Екстракційно-фотоколориметричний метод кількісного визначення м'ансерину

Екстракційно-фотометричний метод кількісного визначення ґрунтується на утворенні забарвлених продуктів реакції при взаємодії речовин, що визначаються, з відповідними реактивами, наступної екстракції забарвлених продуктів, що утворилися, органічними розчинниками і вимірюванні оптичної густини отриманих розчинів за допомогою спектрофотометра або фотоелектроколориметра.

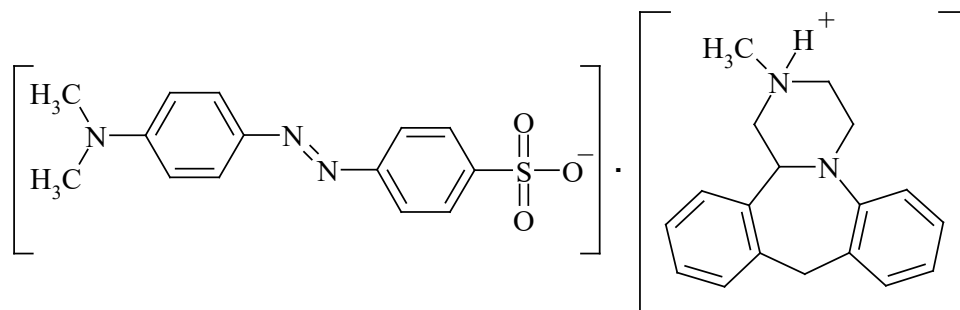
Дуже часто для екстракційно-фотометричного визначення органічних речовин основного характеру використовують барвники кислого характеру, а для сполук, що проявляють кислотний характер – основного [29].



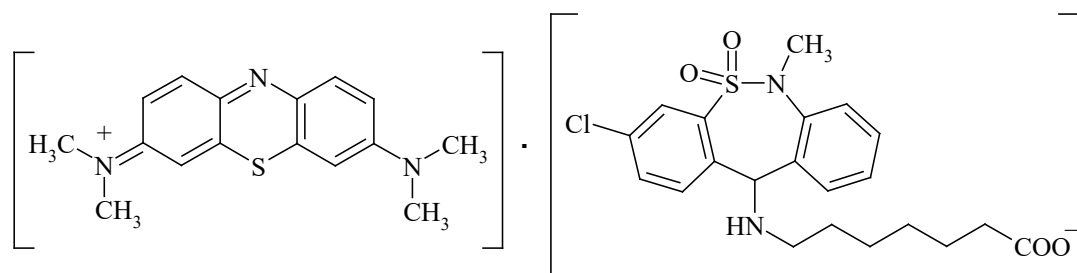
Досліджуваний нами препарат відрізняється за своїми кислотно-основними властивостями. Міансерин проявляє слабкі основні властивості ($pK=8,1$). Тому на першому етапі експериментальних досліджень нами вивчалась реакційна здатність даного препарату з деякими барвниками, що характеризуються різними кислотно-основними властивостями: метиленовим синім, бромфеноловим синім, бромтимоловим синім, бромкрезоловим зеленим, метиловим оранжевим, тропеоліном 00 та іншими. При цьому враховували вплив рН, чутливість реакцій утворення йонних асоціатів та репродуктивність методик.

В результаті проведених досліджень найчутливішою для міансерину виявилася реакція з кислотним барвником метиловим оранжевим.

Метиловий оранжевий – в хімічному відношенні являє собою натрієву сіль 4-диметиламіноазобензен-4-сульфоїкислоти. Розчини індикатора у воді при рН = 4,4 мають жовте забарвлення, а в більш кислому середовищі – червоне, що пов'язано з утворенням хінондиїмінної структури. Склад іонного асоціату міансерину з метиловим оранжевим можна представити формулою:



Метиленовий синій – це N,N,N,N-тетраметилтіонін-хлорид тригідрату [128]. У водному середовищі даний барвник дисоціює з утворенням позитивно заряджених іонів, тому склад іонних асоціатів тіанептину з даним барвником можна представити формулою:



При розробці умов екстракційно-фотокolorиметричного визначення досліджуваного препарату ми вивчали вплив рН водної фази і об'єму розчину барвника на повноту протікання реакцій, а також підбирали оптимальний світлофільтр та робочу довжину кювети.

Експериментально нами було встановлено, що йонний асоціат м'янсерину з метиловим оранжевим у кислому середовищі (рН=2,8) добре екстрагується хлороформом, забарвлюючи його у оранжевий колір. Вільний барвник в цих умовах хлороформом не екстрагується. З метою підвищення чутливості методу отриманий йонний асоціат розкладали, додаванням до хлороформного розчину 0,1 н. розчину хлоридної кислоти. При цьому барвник вивільнюється і надає водному розчину інтенсивного червоного забарвлення. Кількість барвника, що виділяється, еквівалентна кількості м'янсерину в йонному асоціаті.

Вибір світлофільтра і робочої довжини кювети. Точність і чутливість фотометричних методів залежить від довжини хвилі світла, що проходить крізь забарвлений розчин. При виборі світлофільтру виходять з того, що правильно підібраний світлофільтр повинен забезпечувати максимальне значення оптичної густини для одного й того ж розчину .

Для цього в ряд ділильних лійок вносили по 10 мл універсальної буферної суміші (рН=2,8), по 0,2 мл та 0,5 мл хлороформового розчину м'янсерину (в 1 мл – 100 мкг препарату), по 1 мл 0,1% водного розчину метилового оранжевого і хлороформу, щоб об'єм органічної фази становив 10 мл. Суміші в ділильних лійках збовтували протягом 1 хвилини і залишали на 10 хвилин до повного розділення фаз. Після розділення фаз хлороформові витяжки відділяли, а водну фазу повторно збовтували з 5 мл хлороформу. Хлороформові витяжки об'єднували і екстрагували метиловий оранжевий 10 мл 0,1 н. розчину хлоридної кислоти. Кислі водні витяжки відділяли в градуйовані пробірки і доводили дистильованою водою до 15 мл.

Оптичну густину забарвлених у червоний колір розчинів вимірювали за допомогою фотоелектрокolorиметра КФК-2МП, використовуючи світлофільтри: № 3 ($\lambda_{\text{еф}} = 400 \pm 5$ нм), № 4 ($\lambda_{\text{еф}} = 440 \pm 5$ нм), № 5 ($\lambda_{\text{еф}} = 490 \pm 10$ нм),



№ 6 ($\lambda_{\text{сф}} = 540 \pm 10$ нм), № 7 ($\lambda_{\text{сф}} = 582 \pm 10$ нм), № 8 ($\lambda_{\text{сф}} = 597 \pm 10$ нм) і в кюветах з товщиною шару розчину 5, 10 і 20 мм, відносно розчину порівняння.

Для приготування розчину порівняння у ділильну лійку вносили 10 мл універсальної буферної суміші (рН=2,8) та додавали 1 мл 0,1% водного розчину метилового оранжевого і 10 мл хлороформу. Суміш в ділильній лійці збовтували протягом 1 хвилини і залишали на 10 хвилин. Після розділення фаз хлороформову витяжку відділяли, а водну фазу повторно збовтували з 5 мл хлороформу. Хлороформові витяжки об'єднували і екстрагували метиловий оранжевий 10 мл 0,1 н. розчину хлоридної кислоти. Кислу водну витяжку відділяли, переносили в градуйовану пробірку і доводили дистильованою водою до 15 мл.

Результати залежності значень оптичної густини йонних асоціатів міансерину з метиловим оранжевим від світлофільтру і робочої довжини кювети представлені в таблиці 6.

На основі даних, які наведені в таблиці 6, найкращими для кількісного екстракційно-фотометричного визначення міансерину є кювета з товщиною шару рідини 20 мм і світлофільтр № 5 (зелений, $\lambda_{\text{сф}} = 490 \pm 10$ нм).

Вплив рН середовища на екстракцію іонного асоціату міансерину. Для розробки методики екстракційно-фотометричного визначення міансерину ми вивчали вплив рН середовища на інтенсивність забарвлення йонного асоціату даного препарату з метиловим оранжевим. При цьому готували буферні розчини Бріттона-Робінсона в інтервалі із значень рН від 2 до 8. Значення рН буферних розчинів контролювали за допомогою рН-метра ОР-110 фірми Radelkis (Угорщина).

Для встановлення значення рН при якому максимально екстрагується йонний асоціат, поступали наступним чином: в ряд ділильних лійок вносили по 10 мл універсальної буферної суміші з різними значеннями рН, додавали по 0,5 мл хлороформового розчину міансерину (в 1 мл – 100 мкг препарату), по 1 мл 0,1% водного розчину метилового оранжевого і по 9,5 мл хлороформу. Суміші в ділильних лійках збовтували протягом 1 хвилини і залишали на 10 хвилин.

Таблиця 6 - Залежність оптичної густини забарвлених розчинів м'янсерину з метиловим оранжевим від використаного світлофільтра та товщини шару рідини в кюветі (середнє з 5 визначень)

$\lambda_{\text{сф}}$ світлофільтра, нм	Робоча довжина кювети, мм	Оптична густина розчинів, А	
		20 мкг	50 мкг
400 ± 5	5	0,004	0,007
	10	0,006	0,009
	20	0,009	0,017
440 ± 5	5	0,026	0,048
	10	0,052	0,097
	20	0,108	0,210
490 ± 10	5	0,079	0,162
	10	0,104	0,281
	20	0,206	0,530
540 ± 10	5	0,041	0,089
	10	0,088	0,154
	20	0,161	0,333
582 ± 10	5	0,020	0,036
	10	0,038	0,061
	20	0,055	0,092
597 ± 10	5	0,007	0,010
	10	0,013	0,026
	20	0,019	0,035

Авторська розробка

Після розділення фаз хлороформові витяжки відділяли, а водну фазу повторно збовтували з 5 мл хлороформу. Хлороформові витяжки об'єднували і екстрагували метиловий оранжевий 10 мл 0,1 н. розчину хлоридної кислоти. Кислу водну витяжку відділяли і доводили дистильованою водою в градуйованій пробірці до 15 мл.

Оптичну густина забарвлених у червоний колір розчинів вимірювали за допомогою фотоелектроколориметра КФК-2МП, використовуючи кювету з товщиною шару рідини 20 мм і світлофільтр № 5 (зелений, $\lambda_{\text{сф}} = 490 \pm 10$ нм), відносно розчину порівняння.

Результати залежності значень оптичної густини йонних асоціатів м'янсерину з метиловим оранжевим від рН середовища представлені в таблиці 7.



Таблиця 7- Залежність оптичної густини іонних асоціатів м'янсерину з метиловим оранжевим від рН середовища

рН середовища	Оптична густина А		
	A ₁	A ₂	A ₃
2	0,480	0,471	0,453
2,4	0,505	0,507	0,512
2,6	0,525	0,530	0,527
2,8	0,536	0,527	0,533
3,0	0,530	0,526	0,522
3,5	0,505	0,511	0,508
4,5	0,482	0,441	0,473
5,5	0,241	0,217	0,235
6,5	0,180	0,169	0,181
8,0	0,093	0,084	0,077

Авторська розробка

Проведені нами дослідження показали, що йонний асоціат м'янсерину з метиловим оранжевим максимально екстрагується при рН 2,6-3,0. У подальших дослідженнях доцільно застосовувати універсальну буферну суміш з рН 2,8.

Перевірка надійності і відтворюваності методик екстракційно-фотометричного визначення м'янсерину. Ми вивчали стабільність інтенсивності забарвлення йонних асоціатів м'янсерину з метиловим оранжевим в часі. Для цього в ділильні лійки вносили по 10 мл універсальної буферної суміші (рН=2,8), по 0,5 мл хлороформового розчину м'янсерину (в 1 мл – 100 мкг препарату), по 1 мл 0,1% водного розчину метилового оранжевого і двічі збовтували з хлороформом порціями по 9,5 мл та 5 мл. Після розділення фаз хлороформові витяжки відділяли, об'єднували і екстрагували метиловий оранжевий 10 мл 0,1 н. розчину хлоридної кислоти. Кислі водні витяжки відділяли, переносили в градуйовані пробірки і доводили дистильованою водою до 15 мл. Оптичну густина цих розчинів вимірювали відносно розчину порівняння при вибраному світлофільтрі та кюветі.

Результати проведених експериментальних досліджень представлені в таблиці 8.

Таблиця 8- Стабільність забарвлення розчинів іонних асоціатів міансерину з метиловим оранжевим

Взято міансерину, мкг	Час вимірювання, хв	Оптична густина		
		A ₁	A ₂	A ₃
50	5	0,528	0,532	0,525
	15	0,530	0,531	0,526
	30	0,530	0,532	0,526
	45	0,529	0,532	0,526
	60	0,529	0,531	0,526

Авторська розробка

Як видно з даних, наведених в таблиці 8. інтенсивність забарвлень йонних асоціатів міансерину з метиловим оранжевим є сталою протягом однієї години, що свідчить про надійність даної методики за показником стабільності оптичної густини.

Готували серію хлороформових розчинів цього препарату різної концентрації (від 5 до 50 мкг/мл) В ряд ділительних лійок вносили по 10 мл універсальної буферної суміші (рН 2,8), додавали по 1 мл 0,1% водного розчину метилового оранжевого, по 1 мл хлороформового розчину міансерину відповідної концентрації.

Кількісний вміст міансерину в досліджуваних пробах, визначали, використовуючи рівняння прямої та за градууювальним графіком.

Дані, які наведені в таблицях 9 і 10 свідчать, що результати кількісного визначення міансерину є надійними і точними, так як межі довірчих інтервалів вкладаються в норму. Відносна похибка визначення міансерину за градууювальним графіком становить 1,48%, а при використанні рівняння регресії – 1,81%.



Таблиця 9- Результати екстракційно-фотоколориметричного визначення м'ансерину в розчинах, розрахованих за допомогою градуювального графіку (середнє з п'яти визначень)

Вміст м'ансерину, мкг/мл	Оптична густина, А	Знайдено препарату		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
5	0,054	5,02	100,4	$\bar{X} = 100,30$ $S = 1,40$ $S_{\bar{x}} = 0,57$ $\Delta X = 1,48$ $\varepsilon = 1,48\%$
10	0,107	9,82	98,2	
15	0,161	14,95	99,7	
20	0,214	20,38	101,9	
30	0,321	30,56	101,8	
50	0,535	49,92	99,8	

Джерело: розраховано автором

Таблиця 10 - Результати екстракційно-фотоколориметричного визначення м'ансерину в розчинах, розрахованих з використанням рівняння регресії (середнє з п'яти визначень)

Вміст м'ансерину, мкг/мл	Оптична густина, А	Знайдено препарату		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
5	0,054	4,95	99,0	$\bar{X} = 99,25$ $S = 1,71$ $S_{\bar{x}} = 0,69$ $\Delta X = 1,81$ $\varepsilon = 1,81\%$
10	0,107	10,13	101,3	
15	0,161	14,64	97,6	
20	0,214	19,80	99,0	
30	0,321	29,52	98,4	
50	0,535	50,77	101,5	

Джерело: розраховано автором

Висновки

1. Реакційну здатність м'ансерину з рядом реактивів та чутливість реакцій виявлення. Встановлено, що, найчутливішою для виявлення м'ансерину є реакція з реактивом Манделіна та Маркі. Препарат осаджується реактивами Драгендорфа, Бушарда, Майєра, Зоненшейна, Вагнера, Рейнеке, а також розчинами калію перманганату, хлориду феруму (III) та пікринової кислоти.

2. Вивчено можливість ТШХ-скринінгу міансерину в системах розчинників, які використовуються для розділення наркотичних та психотропних речовин. Встановлено, що дані препарати добре розділяється із флуокситином, трамаadolом, амітриптиліном, тіанептином та меліпраміном.

3. Запропоновано склад чотирьох підтверджуючих систем розчинників для виявлення та розділення міансерину на пластинках Silufol, Sorbfil та Merck. Встановлено, що для виявлення міансерину оптимальними є системи розчинників: метанол-ацетонітрил-25% розчин аміаку (30:10:15) та метанол-25% розчин аміаку (40:5).

4. Вивчено характер УФ-спектрів міансерину в залежності від природи розчинника. При цьому встановлено, що розчинник значною мірою впливає на інтенсивність смуг поглинання та положення їх максимумів.

5. Для кількісного визначення міансерину розроблено екстракційно-фотометричну методику на основі реакції утворення іонного асоціату з метиловим оранжевим (при рН 2,8). Встановлено, що оптична густина забарвлених розчинів підпорядковується основному закону світлопоглинання від 5 мкг до 100 мкг міансерину в 15 мл кінцевого об'єму. Відносна похибка кількісного визначення міансерину в розчинах становить 1,48% (за градууювальним графіком) та 1,81% за рівняння регресії.