

ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ МЕТОДИК ІЗОЛЮВАННЯ МІАНСЕРИНУ З КРОВІ

©І. Й. Галькевич¹, Н. В. Гончарук²

¹Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

²Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського

Резюме: у статті наведено результати порівняльної оцінки ефективності методик виділення міансерину із крові із використанням екстракційної очистки та методу твердофазної екстракції. Для кількісного визначення міансерину, виділеного із крові, розроблено умови аналізу методом високоефективної рідинної хроматографії.

Ключові слова: міансерин, твердофазна екстракція, рідинна екстракція, високоефективна рідинна хроматографія.

Вступ. Міансерин – один із антидепресантів, який належить до представників ряду піперазино-азепінових сполук чотирициклічної структури. За рахунок блокади пресинаптичних α_2 -адренорецепторів і 5-HT₂ рецепторів даний препарат посилює адренергічну передачу у головному мозку і зумовлює вивільнення медіаторів у синаптичній щілині, також міансерин є селективним блокатором зворотного захоплення норадреналіну [1, 3, 4]. За антидепресивною активністю ефективність міансерину не нижча, ніж в інших сучасних антидепресантів [2, 9].

У медичній практиці зустрічаються випадки застосування міансерину з суїцидальною метою в разовій дозі 1 г та вище. Зокрема, у судово-хімічній практиці, досить частими є випадки смертельних отруєнь міансерином, які зумовлені поєднанням останнього з алкогольними напоями та іншими психотропними засобами, такими, як пропоксифен та пропазин [5–8]. Тому мета роботи полягала у розробці методики кількісного визначення міансерину методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та порівняння ефективності методик виділення міансерину з крові з екстракційним методом очистки та методом твердофазної екстракції (ТФЕ).

Методи дослідження. При проведенні досліджень застосовували кров людини (Львівська обласна станція переливання крові); міансерину гідрохлорид та тіанептин (Sigma, США); концентруючі патрони Oasis (Waters, США) масою 60 мг.

Кількісне визначення міансерину в досліджуваних пробах проводили з допомогою рідинного хроматографа Agilent 1200, на колонці Eclipse C18. Довжина колонки 150 мм, внутрішній діаметр 4,6 мм, розмір частинок сорбенту 5 мкм. Рухома фаза 1 % водний розчин триетиламіну та ацетонітрил (34:16), рН рухомої фази 3,5. Швидкість рухомої фази 1 мл/хв. Необхідне значення рН рухомої фази встановлювали з допо-

могою розведеної фосфатної кислоти, а для виготовлення розчину триетиламіну використовували деіонізовану воду. Детектування проводили при 214 нм. Проби вводили в ізократичному режимі, об'єм введеної проби 20 мкл, температура колонки 25°C.

Результати й обговорення. Кількісне визначення міансерину в досліджуваних пробах проводили методом внутрішнього стандарту. Як внутрішній стандарт застосовували метанольний розчин тіанептину, концентрація якого становила 1 мкг/см³.

При зазначених умовах хроматографічного аналізу спостерігалось хороше розділення двох речовин. Час втримування міансерину становив 3,37 хв, а тіанептину – 4,33 хв. Ступінь розділення двох піків (Rs) – 1,14, селективність визначення (α) на даній колонці становить 2,09. Межа виявлення міансерину при даних умовах 0,05 мкг/см³.

Характер отриманої хроматограми наведено на рисунку 1.

Побудова градуовального графіку. Для побудови градуовального графіку готували серію стандартних розчинів міансерину в метанолі із вмістом 0,03; 0,05; 1,0; 3,0; 5,0 мкг препарату в 1 см³ та метанольний розчин внутрішнього стандарту – тіанептину (1 мкг/см³). Перед проведенням досліджень змішували по 100 мкл розчину міансерину та розчину внутрішнього стандарту. Після запису хроматограм за отриманими результатами будували градуовальний графік залежності співвідношень площ піків міансерину та тіанептину від концентрації міансерину.

Експериментальними дослідженнями встановлено, що градуовальний графік характеризується прямолінійною залежністю в межах концентрацій міансерину від 0,03 до 5 мкг/см³. Відносна похибка кількісного визначення міансерину в розчинах становила 0,73 %. Даний

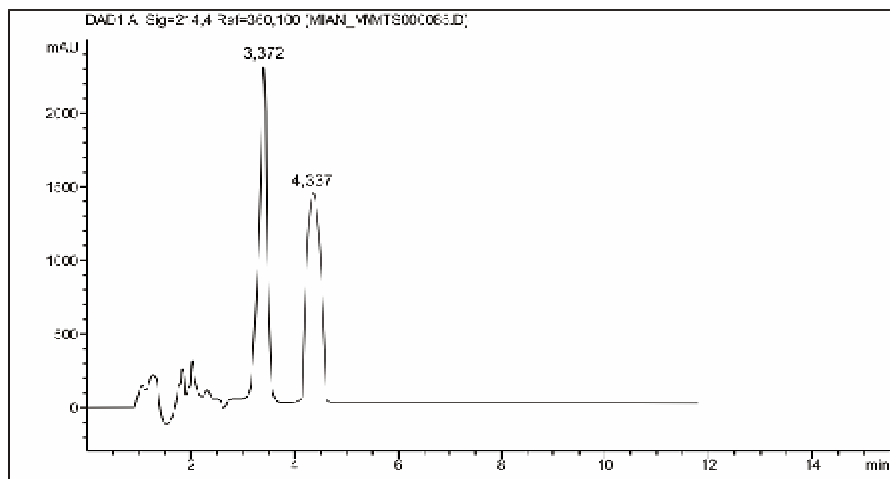


Рис. 1. Хроматограма суміші міансерину з тіанептином (метод ВЕРХ).

графік використовували для кількісного визначення міансерину, виділеного із крові.

Підготовка проб крові. Для оцінки ефективності ізолювання міансерину із крові екстракційним методом і методом твердофазної екстракції готували серію модельних проб крові із різним вмістом міансерину. Для цього до 10 см³ крові вносили по 5, 10, 15, 20 і 25 мкг міансерину у вигляді водного розчину. Проби крові витримували в термостаті при 37 °С протягом 2 год, після чого по 5 см³ використовували для паралельних досліджень двома методиками ізолювання.

Екстракційна очистка. До 5 см³ модельних проб крові вносили 30 % розчин ацетатної кислоти до рН 2-3 (за універсальним індикатором). Проби обробляли ультразвуком (20 хв). Після цього в досліджувані проби крові вносили 30 % розчин натрію гідроксиду до рН 8-9 (за універсальним індикатором). Суміші перемішували, залишали на 5 хв, після чого проби центрифугували (5000 об./хв, 10 хв). Рідину зливали, а осад, що випав від додавання натрію гідроксиду, повторно настоювали з 30 % розчином ацетатної кислоти (при обробці ультразвуком протягом 5 хв) і пробу повторно центрифугували. З об'єднаних проб проводили екстракцію міансерину хлороформом (тричі, порціями по 10 см³). При необхідності рН

досліджуваних проб доводили 30 % розчином натрію гідроксиду до 8-9. Хлороформові витяжки об'єднували та випаровували розчинник досуха. Сухі залишки розчиняли в 1 см³ метанолу і використовували для кількісного визначення міансерину методом ВЕРХ.

Очистка методом твердофазної екстракції. До 5 см³ крові вносили 1 см³ 30 % розчину ацетатної кислоти і 1 см³ ацетонітрилу. Проби крові піддавали обробці ультразвуком (10 хв), після чого центрифугували (при 5000 об./хв протягом 10 хв). Із отриманого центрифугату відбирали 2 см³ проби, яку пропускали через картридж Oasis.

Попередньо картриджі кондиціонували, обробляючи їх 2 см³ метанолу і 2 см³ води.

Після пропускання зразку через картридж його промивали 3 см³ 2 % розчину ацетатної кислоти в 30 % метанолі і елювали міансерин ацетонітрилом (3 см³). Залишок органічного розчинника видавали з картриджів азотом. Ацетонітрильну фракцію випаровували досуха в потоці азоту і сухий залишок розчиняли в 100 мкл метанолу. В цей розчин вносили 100 мкл розчину внутрішнього стандарту тіанептин (1 мкг/см³) і проводили кількісне визначення методом ВЕРХ.

Результати виділення міансерину із крові двома методиками наведено в таблиці 1.

Таблиця 1. Результати виділення міансерину з крові з використанням екстракційної очистки та методу твердофазної екстракції (середнє з п'яти паралельних виділень)

Внесено міансерину до 5 см ³ крові	Виділено міансерину методом рідинної екстракції		Виділено міансерину методом ТФЕ	
	мкг	%	мкг	%
5	3,09	63,7	4,43	88,6
10	6,37	64,7	8,95	89,5
15	9,71	65,4	13,59	90,6
20	13,3	66,5	18,26	91,3
25	16,63	66,5	22,93	91,7
Метрологічні характеристики	$\bar{X} = 65,36; S = 1,18; S_x^- = 0,53;$ $\Delta X = \pm 1,46; \varepsilon = 2,24\%; (\alpha = 0,95\%)$		$\bar{X} = 90,34; S = 1,28; S_x^- = 0,57;$ $\Delta X = \pm 1,58; \varepsilon = 1,76\%; (\alpha = 0,95\%)$	

Отже, представлені результати свідчать, що із використанням методу ТФЕ значно покращуються результати виділення міансерину з крові, при цьому можна виділити до 91,7 % міансерину.

Висновки. 1. Розроблено умови кількісного визначення міансерину методом ВЕРХ на колонці Eclips C18. Градувальний графік побудований в межах концентрацій міансерину від

0,03 до 5,0 мкг/см³. Відносна похибка кількісного визначення міансерину у розчинах методом ВЕРХ 0,74%.

2. При ізолюванні міансерину із крові при рН 2-3 і екстракції хлороформом при рН 8-9 можна виділити 61,8 – 66,5 % даної сполуки. Методом твердофазної екстракції з аналогічних проб крові виділяється 88,6 – 91,7% міансерину.

Література

1. Васюк Ю. А. Миансерин в комплексном лечении ИБС / Ю. А. Васюк, А. Б. Хадзева // Клиническая фармакология и терапия. – 2000. – № 2. – С. 57–59.
2. Ушакова А. В. Современные антидепрессанты: проблемы рационального выбора / А. В. Ушакова // Фарматека. – 2007. – № 2. – С. 44–47.
3. Крылова В. И. Антидепрессанты в общемедицинской практике. Эффективность и безопасность терапии / В. И. Крылова // Фарминдекс – Практик. – 2003. – № 5. – С. 22–25.
4. Раневский К. С. Антидепрессанты: нейрохимические аспекты механизма действия / К. С. Раневский // Психиатрия и психофармакотерапия. – 2004. – Т. 1, № 3. – С. 35–38.
5. Schaper A. Suicide with mianserine / A. Schaper, E. Farber // Toxicol. Clin. Toxicol. – 2002. – № 40. – P. 343–345.

6. Koski A. Relation of postmortem blood alcohol and drug concentrations in fatal poisoning involving propoxyphene, mianserine and promazine / A. Koski, E. Vuori, I. Ojanpera // Hum. Exp. Toxicol. – 2005. – Vol. 119, № 6. – P. 344–348.
7. Kelvin A. S. Comparative acute toxicity of mianserine and other antidepressants / A. S. Kelvin, S. M. Hakansson // Acta Psychiatrica Scandinavica. – 2007. – Vol. 80, № 23. – P. 3133.
8. Newman B. The clinical toxicology of mianserine hydrochloride / B. Newman, P. Crome // Vet Hum. Toxicol. – 2001. – № 43. – P. 358–361.
9. Wiker C. Adjunctive treatment with mianserine enhances effects of raclopride on cortical dopamine output and, in parallel, its antipsychotic-like effect / C. Wiker, L. Linner, M. L. Wadenberg // Neuropsychiatr Dis. Treat. – 2005. – № 4. – P. 356–372.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДИК ИЗОЛИРОВАНИЯ МИАНСЕРИНА ИЗ КРОВИ

И. И. Галькевич¹, Н. В. Гончарук²

¹Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого

²Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского

Резюме: в статье приводятся результаты сравнительной оценки эффективности методик выделения міансерина из крови с использованием экстракционной очистки и метода твердофазной экстракции. Для количественного определения міансерина, выделенного из крови, предложено использовать метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: миансерин, твердофазная экстракция, жидкостная экстракция, высокоэффективная жидкостная хроматография.

COMPARATIVE ESTIMATION OF MIANSERINE ISOLATION EFFECTIVENESS FROM BLOOD

I. Y. Halkevych¹, N. V. Honcharuk²

Lviv National Medical University by Danylo Halytskyi

Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky

Summary: the article presents results of comparative estimation of mianserine isolation efficacy from blood using extraction with organic solvents and solid-phase extraction. For mianserine determination is proposed the HPLC conditions.

Key words: mianserine, solid-phase extraction, liquid extraction, HPLC.