УДК: 615.214.32:543

Н.М. Дармограй, І.Й. Галькевич

Розробка умов ізолювання міртазапіну з біологічного матеріалу

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

Ключові слова: *антидепресанти, міртазапін, біологічний матеріал, методи ізолювання, екстракційна фотометрія.*

Ключевые слова: *антидепрессанты, миртазапин, биологический материал, методы изолирования, экстракционная фотометрия.*

Key words: *antidepressants, mirtazapine, biological material, methods of isolation, extraction photometry.*

Вивчено ефективність ізолювання міртазапіну різними розчинниками (водою, підкисленою оксалатною, сульфатною та перхлоратною кислотами, підкисленими етиловим спиртом і ацетонітрилом). Кількісний вміст міртазапіну у виділених екстрактах визначали екстракційно-фотометричним методом за реакцією утворення іонного асоціату з кислотним азобарвником метиловим оранжевим.

Изучена эффективность изолирования миртазапина различными растворителями (водой, подкисленной оксалатной, серной и перхлоратной кислотами, подкисленными этиловым спиртом и ацетонитрилом). Количественное содержание миртазапина в выделенных экстрактах определяли экстракционно-фотометрическим методом по реакции образования ионного ассоциата с кислотным азокрасителем метиловым оранжевым.

The effectiveness of isolating of mirtazapine by different solvents (water, acidified with oxalate, sulfate and perchloric acids and acidified ethanol and acetonitrile) was studied. The quantitative determination of mirtazapine in the extracts was carried out by extraction photometry by reaction of ionic associate formation of martazapine with methyl orange, the acidic azo dye.

У медичній практиці для лікування депресивних розладів різноманітної етіології застосовують міртазапін. За механізмом фармакологічної дії він належить до норадренергічних і специфічних серотонінергічних антидепресантів [1]. У хімічному відношенні це (±)-1,2,3,4,10,14b-гексагідро-2-[11C] метилпіразино(2,1-а)піридо(2,3-с)(2)бензазепін.

Останнім часом зареєстровано випадки смертельних отруєнь міртазапіном. Слід зазначити, що більшість випадків таких отруєнь описують у зв'язку з прийомом цього препарату разом з антидепресантами інших груп, особливо з СІЗЗС та ТЦА [4].

Оскільки патоморфологічна картина отруєнь міртазапіном є нехарактерною, важливе значення мають результати судово-токсикологічних досліджень біологічного матеріалу на вміст у ньому токсичних речовин.

У спеціалізованій літературі описано методики визначення міртазапіну в біологічних рідинах (крові, сечі). Для аналізу зазначеного антидепресанта в отриманих екстрактах використовували методи газорідинної хроматографії з мас-спектрометрією [6], високоефективної рідинної хроматографії [5], рідинної хроматографії з мас-спектрометрією [8], капілярного електрофорезу [7]. Названі методики характеризуються високою чутливістю і специфічністю, але потребують ретельної пробопідготовки та спеціального дорогого обладнання, що робить їх малодоступними.

Мета роботи

Оскільки в проаналізованій науковій літературі недостатньо даних щодо виділення міртазапіну з органів трупного матеріалу, мета дослідження полягала у визначенні ефективності виділення міртазапіну загальноприйнятими у судово-токсикологічному аналізі методами: настоюванням з водою, підкисленою оксалатною кислотою (метод О.О. Васильєвої), настоюванням з водою, підкисленою сульфатною кислотою (метод В.П. Крамаренка), настоюванням з етанолом, підкисленим оксалатною кислотою (метод Стаса-Отто). Для ізолювання міртазапіну застосовували також воду, підкислену 20% розчином перхлоратної кислоти, та ацетонітрил, підкислений 1 М розчином хлоридної кислоти. Для кількісного визначення міртазапіну, виділеного з біологічного матеріалу, запропоновано метод екстракційної фотометрії.

Матеріали і методи дослідження

Ефективність методик ізолювання міртазапіну з проб біологічного матеріалу вивчали на модельних сумішах. Для цього в ряд хімічних стаканів вносили по 25 г печінки людини, яка загинула від травми, і в кожну пробу вносили по 600 мкг міртазапіну у вигляді водного розчину. Проби залишали на 24 год при кімнатній температурі, після чого проводили ізолювання міртазапіну різними методиками. Паралельно ставили контрольні досліди з біологічним матеріалом.

За даними, отриманими при вивченні екстракції міртазапіну з водних розчинів органічними розчинниками, встановлено, що міртазапін краще екстрагується хлороформом з лужного середовища. Максимальний ступінь екстракції міртазапіну хлороформом визначено при pH 7,0–8,0 (до 91,6%). Тому при ізолюванні досліджуваного препарату з біологічного матеріалу його екстрагували з витяжок хлороформом у цьому інтервалі значень pH.

Виділення міртазапіну з печінки водою, підкисленою оксалатною або сульфатною кислотами, та етанолом, підкисленим оксалатною кислотою. Ізолювання досліджуваного препарату проводили водою та етанолом, підкисленими оксалатною кислотою, а також водою, підкисленою сульфатною кислотою, згідно із загальноприйнятими методиками [2].

Виділення міртазапіну з печінки водою, підкисленою 20% перхлоратною кислотою. Проби біологічного ма-

© Н.М. Дармограй, І.Й. Галькевич, 2012

теріалу заливали водою, підкислювали 20% розчином перхлоратної кислоти до pH 2,0–3,0 (за універсальним індикатором) і настоювали протягом 2 год, періодично перемішуючи. Кислі водні витяжки зливали в колби, а проби печінки ще раз настоювали з водою, підкисленою 20% розчином перхлоратної кислоти до pH 2,0–3,0. Витяжки об'єднували і проціджували через подвійний шар марлі. Проціджені витяжки центрифугували протягом 15 хв зі швидкістю 3000 об/хв. Центрифугати зливали, переносили в ділильні лійки, підлужнювали 25% розчином аміаку до pH 7,0–8,0 та тричі екстрагували хлороформом порціями по 10, 10 та 5 мл. Хлороформові екстракти об'єднували та випаровували досуха. Сухі залишки розчиняли в 5,0 мл 96% етанолу і досліджували методом екстракційної фотометрії. Паралельно досліджували контрольні проби, отримані з біологічного матеріалу, що не містив міртазапін.

Виділення міртазапіну з печінки підкисленим ацетонітрилом. Суміші біологічного матеріалу з міртазапіном заливали ацетонітрилом до повного покриття твердих часточок, підкислювали 1 М розчином кислоти хлоридної до pH 2,0 (за універсальним індикатором) і настоювали протягом 30 хв при перемішуванні. Настоювання з підкисленим ацетонітрилом проводили двічі. Витяжки проціджували через марлю та об'єднували, додавали воду, об'єм якої у тричі більший ніж об'єм витяжки, підлужнювали 25% розчином аміаку до pH 7,0–8,0 і тричі екстрагували хлороформом порціями по 10, 10 та 5 мл. Хлороформні екстракти об'єднували, випаровували досуха та розчиняли в 5,0 мл 96% етанолу. В етанольних розчинах визначали вміст міртазапіну.

Для кількісного визначення використовували по 1,0 мл етанольних розчинів. Результати виділення міртазапіну з проб печінки різними методами наведено у *таблиці 1*.

Для кількісного визначення міртазапіну досліджено реакційну здатність препарату з рядом барвників (метиловим оранжевим, бромтимоловим синім, бромкрезоловим зеленим). Встановлено, що найстійкішими й найінтенсивніше забарвленими були розчини препарату з метиловим оранжевим.

В універсальному буферному розчині при pH 3,5 міртазапін з цим кислотно-основним індикатором утворює стійкий іонний асоціат, що екстрагується хлороформом. Для проведення реакції достатньо 0,1 мл 0,1% розчину метилового оранжевого. Для підсилення чутливості методу проводили реекстракцію барвника 0,1 М розчином хлоридної кислоти.

Таблиця 1

Результати виділення міртазапіну з печінки (середнє з 5 паралельних визначень)

Метод ізолювання	Внесено міртазапіну до 25 г печінки, мкг	Визначено міртазапіну		Метрологічні характеристики
		мкг	%	
Настоювання з водою, підкисленою кислотою оксалатною (метод О.О. Васильєвої)	600	97,5	16,3	$\bar{X} = 16,7$ S = 0,25 $S_{\bar{X}} = 0,25$ $\bar{X} \pm \Delta X =$ $16,7 \pm 0,25$ $\varepsilon = \pm 1,5\ \%$
		100	16,7	
		102,5	17,0	
		100	16,7	
		100	16,7	
Настоювання з водою, підкисленою кислотою сульфатною (метод В.П. Крамаренка)	600	147,5	24,6	$\bar{X} = 24,7$ S = 0,33 $S_{\bar{X}} = 0,45$ $\bar{X} \pm \Delta X =$ $16,7 \pm 0,45$ $\varepsilon = \pm 1,36\ \%$
		145	24,2	
		150	25,0	
		147,5	24,6	
		150	25,0	
Настоювання з етанолом, підкисленим кислотою оксалатною (метод Стаса-Отто)	600	75	12,5	$\bar{X} = 12,4$ S = 0,26 $S_{\bar{X}} = 0,27$ $\bar{X} \pm \Delta X =$ $12,4 \pm 0,27$ $\varepsilon = \pm 2,1\ \%$
		77	12,8	
		73	12,1	
		74	12,3	
		75	12,5	
Настоювання з підкисленим ацетонітрилом	600	270	45,0	= 45,06 = 0,19 $S_{\bar{X}} = 0,15$ $\bar{X} \pm \Delta X =$ $45,06 \pm 0,15$ $\varepsilon = \pm 0,43\ \%$
		271	45,2	
		269	44,8	
		272	45,3	
		270	45,0	
Настоювання з водою, підкисленою 20% розчином кислоти перхлоратної	600	75	12,5	$\bar{X}$= 12,4 S = 0,23 $S_{\bar{X}} = 0,2$ $\bar{X} \pm \Delta X =$ $12,4 \pm 0,2$ $\varepsilon = \pm 1,83\ \%$
		74	12,3	
		75	12,5	
		73	12,1	
		76	12,7	

Побудова градуювального графіку. Для побудови градуювального графіку використовували водний розчин міртазапіну з концентрацією 120 мкг в 1 мл. У ряд ділильних лійок вносили по 9,0 мл універсального буферного розчину зі значенням pH 3,5, по 0,1 мл 0,1% водного розчину метилового оранжевого та по 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 і 0,7 мл стандартного водного розчину міртазапіну. Іонний асоціат двічі екстрагували хлороформом (порціями по 6,0 та 5,0 мл). Хлороформні екстракти об'єднували, поміщали у ділильні лійки і проводили реекстракцію 0,1 М розчином хлоридної кислоти (двічі по 5,0 та 5,0 мл). Отримані кислі розчини доводили дистильованою водою до 10 мл. Паралельно готували розчин порівняння.

Оптичну густину отриманих розчинів вимірювали за допомогою спектрофотометра СФ-56 при довжині хвилі 510 нм (l=1 см). Як розчин порівняння використовували контрольну пробу.

Використану методику застосовували для кількісного визначення міртазапіну, виділеного з проб печінки. Для кількісного визначення використовували по 1,0 мл етанольних розчинів.

Результати та їх обговорення

При побудові градуювального графіку встановлено, що оптична густина забарвлених розчинів підпорядковується основному закону світлопоглинання в межах концентрацій міртазапіну від 6 до 84 мкг в 10 мл кінцевого об'єму. Вміст міртазапіну в пробах визначали, користуючись рівнянням прямої, що розраховували методом найменших квадратів [3]: A = 0,012C+0,058 (A – оптична густина; C – концентрація міртазапіну, мкг/мл).

Встановлено, що водою, підкисленою перхлоратною кислотою, та етанолом, підкисленим оксалатною кислотою, можна виділити до 12,4% міртазапіну. Дещо вищі результати отримали при використанні води, підкисленої оксалатною та сульфатною кислотами (відповідно 16,7% та 24,7%). Найбільші кількості міртазапіну (до 45,06%) ізолювали ацетонітрилом, підкисленим 1 М розчином хлоридної кислоти.

Висновки

Вивчено ефективність ізолювання міртазапіну з проб печінки водою, підкисленою оксалатною, сульфатною та перхлоратною кислотами, етанолом, підкисленим оксалатною кислотою, та підкисленим ацетонітрилом.

Найкращим екстрагентом для виділення міртазапіну з біологічного матеріалу є підкислений ацетонітрил. При цьому з модельних зразків досліджуваного біологічного матеріалу можна виділити до 45,06% міртазапіну.

Для кількісного визначення міртазапіну, виділеного з біологічного матеріалу, розроблено умови екстракційної фотометрії на основі реакції з метиловим оранжевим при pH 3,5.

Список літератури

1. Компендиум 2008 – лекарственные препараты: В 2-х т. / Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. – К.: МОРИОН, 2008. – Т. 2.
2. *Крамаренко В.П.* Токсикологічна хімія / Крамаренко В.П. – К.: Вища школа, 1995. – С. 158–183.
3. *Чарыков А.К.* Математическая обработка результатов химического анали за / Чарыков А.К. – Л.: Химия, 1984. –168 с.
4. *Álvarez E.* Mirtazapine in combination / Álvarez E., Viñas F. // Actas Esp Psiquiatr. – 2010. – V. 38, №2. – P. 121–128.
5. *Hong X.* LC–MS–MS Analysis of Mirtazapine in Plasma, and Determination of Pharmacokinetic Data for Rats / Hong X., Yao Y., Hong S. // Chromatographia. – 2008. – V. 68, №1–2. – P. 65–70.
6. *Sarah M.* Determination of antidepressants in human postmortem blood, brain tissue, and hair using gas chromatography–mass spectrometry / Sarah M. [et al.]. // International Journal of Legal Medicine. – 2008. – V. 123, №6. – P. 451–458.
7. *Santana F.* Capillary electrophoretic chiral determination of mirtazapine and its main metabolites in human urine after enzymatic hydrolysis / Santana F., Lanchote V., Bonato P. // Electrophoresis. – 2008. – V. 29, №18. – P. 3924–3932.
8. *Santana F.* Enantioselective analysis of mirtazapine and its two major metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry after three-phase liquid-phase microextraction / Santana F., Bonato P. // Anal Chim Acta. – 2008. – V. 606, №1. – P. 80–91.

Відомості про авторів:

Дармограй Н.М., аспірант каф. токсикологічної та аналітичної хімії ЛНМУ ім. Д. Галицького.

Галькевич І.Й., к. фарм. н., доцент каф. токсикологічної та аналітичної хімії ЛНМУ ім. Д. Галицького.

Надійшла в редакцію 27.03.2012 р.