

ВИЗНАЧЕННЯ МІАНСЕРИНУ В СЕЧІ ХРОМАТОГРАФІЧНИМИ МЕТОДАМИ

Вступ. За літературними даними, найбільшу токсикологічну небезпеку становлять лікарські засоби, які впливають на центральну нервову систему. Згідно з даними токсикологічних служб, щорічно у світі реєструють близько 800 тис. летальних отруєнь психотропними, снодійними, седативними, антидепресивними та іншими групами препаратів. В останні роки помітно зростає науковий інтерес у токсикологічній практиці до вивчення антидепресантів і наркотичних речовин. Однак кожна лікарська речовина за певних умов може стати отрутою, особливо при тривалому призначенні, до них належить трициклічний антидепресант – міансерин.

Мета дослідження – провести розробку методик ідентифікації міансерину в біологічних рідинах (сечі) методами тонкошарової хроматографії, високоефективної рідинної хроматографії і газорідинної хроматографії з мас-спектрометрією.

Методи дослідження. Під час дослідження використано: хлороформні розчини міансерину і його метаболіту десметилміансерину М-7, виділеного із сечі отруєних тварин; хроматографічні системи толуол – ацетон – 96 % етиловий спирт – 25 % розчин аміаку (45:45:7,5:2,5), хлороформ – ацетон (10:10), етанол 96 % – метиленхлорид – 25 % розчин аміаку (57,5:40:2,5), етилацетат – метанол – 25 % розчин аміаку (85:10:5); реактиви Маркі та Манделіна; газовий хроматограф "Agilent 1200".

Результати й обговорення. Ідентифікацію міансерину здійснювали за допомогою реакцій ідентифікації, тонкошарової хроматографії. Оптимальною хроматографічною системою є етанол 96 % – метиленхлорид – 25 % розчин аміаку (57,5:40:2,5); проявник – реактив Манделіна. Встановлено параметри ідентифікації речовин за даних умов: час утримування, спектральні співвідношення речовин, спектри поглинання в УФ-спектрах.

Висновки. Розроблено методику виявлення міансерину методом тонкошарової хроматографії на пластинках марки "Sorbfil ПТСХ". Розроблено методику визначення міансерину і його метаболіту М-7 з використанням методу високоефективної рідинної хроматографії. Розроблено методику ідентифікації міансерину і його метаболіту М-7 методом газорідинної хроматографії з мас-спектрометрією. Визначено оптимальні умови ізолювання міансерину і його метаболіту М-7 з модельних сумішей біорідини (сечі).

КЛЮЧОВІ СЛОВА: антидепресанти; міансерин; тонкошарова хроматографія; високоефективна рідинна хроматографія; газорідинна хроматографія з мас-спектрометрією.

ВСТУП. Антидепресанти є одними з найчастіше використовуваних медикаментів. За результатами досліджень, застосування психотропних препаратів швидко збільшується в останні десятиліття. У деяких країнах світу протягом останніх кількох років використання цих засобів зросло більш ніж удвічі. Згідно з даними токсикологічних служб, щорічно у світі реєструють близько 50 тис. летальних отруєнь антидепресивними препаратами. В останні роки помітно зростає науковий інтерес у токсикологічній практиці до вивчення трициклічного антидепресанту – міансерину [1–5].

© Н. В. Горлачук, Н. О. Зарівна, 2023.

У літературних джерелах трапляються дані щодо розробки методик визначення міансерину за допомогою методів тонкошарової хроматографії (ТШХ), газорідинної хроматографії з мас-спектрометрією (ГХ-МС), високоефективної рідинної хроматографії з діод-матричним детектором (ВЕРХ) при хіміко-токсикологічних дослідженнях [6–10].

Мета дослідження – провести розробку методик ідентифікації міансерину в біологічних рідинах (сечі) методами тонкошарової хроматографії, високоефективної рідинної хроматографії і газорідинної хроматографії з мас-спектрометрією.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Як об'єкти дослідження взято хлороформні розчини міансерину і його метаболіту десметилміансерину М-7, виділеного із сечі отруєних тварин. Хроматографія в тонких шарах сорбенту знайшла широке застосування як попередній етап аналітичного скринінгу. Для ідентифікації міансерину за допомогою ТШХ використовували пластинки "Силуфол УФ-254" (широкопористий силікагель Сільперл, алюмінієва основа, товщина шару – 100–120 мкм, розмір – 15×15 см), "Sorbfil ПТСХ" (силікагель СТХ-1А, фракція 5–17 мкм, товщина шару – 110 мкм, тип основи – ПЕТФ, розмір – 10×10 см), скляні пластинки для високоефективної тонкошарової хроматографії (силікагель КСКГ, фракція – 5–20 мкм, товщина шару – (130±20) мкм, розмір – 20×20 см). Перед застосуванням пластинки очищали хлороформом і висушували на повітрі, після цього активували в сушильній шафі при 110 °С протягом 30 хв.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Хроматографування проводили в камері об'ємом 1000 см³, в яку вносили по 50 мл систем розчинників (камеру насичували протягом 40 хв). Довжина пробігу розчинників для пластинок "Силуфол УФ-254" – 10 см, для інших – 7 см. На лінію старту на відстані 2 см від краю пластинки в точку діаметром 2–3 мм скляним капіляром наносили зразок міансерину, що містив від 0,1 до 10,0 мкг препарату.

Ефективність поділу досліджуваної речовини визначали в чотирьох хроматографічних системах:

- 1) толуол – ацетон – 96 % етиловий спирт – 25 % розчин аміаку (45:45:7,5:2,5) – універсальна система, яку застосовують в експрес-аналізі гострих інтоксикацій;
- 2) хлороформ – ацетон (10:10);
- 3) етанол 96 % – метиленхлорид – 25 % розчин аміаку (57,5:40:2,5);
- 4) етилацетат – метанол – 25 % розчин аміаку (85:10:5).

Вищевказані системи розчинників експериментально підібрано для аналізу міансерину.

Отримані результати хроматографування розчинів свідчать про те, що у всіх проаналізованих рухомих системах відбувався поділ речовини. Найкращу роздільну здатність спостерігали

в системі № 3. Ці результати було підтверджено і в дослідах з модельними сумішами. Для проявлення плям міансерину на хроматографічних пластинках використовували реактиви Маркі та Манделіна; розраховували величину R_f для даної речовини. Результати дослідження наведено в таблиці 1.

Подальше дослідження проводили методом газорідної хроматографії з мас-спектрометрією. Для аналізу використовували газовий хроматограф "Agilent 1200" з мас-селективним детектором ("Agilent Technologies", США).

Хроматографування проводили за розробленими для міансерину умовами аналізу (час утримування: міансерину – 1,49 хв, а його метаболіту М-7 – 1,35 хв).

З метою поліпшення хроматографування зразків ми проводили процедуру дериватизації – отримання ацетильних похідних. У процесі дослідження було встановлено, що міансерин за цих умов прободіготовки дериватів не утворює, час його утримування залишається сталим.

Умови ГХ-МС-аналізу міансерину:

1. Прободіготовка – отримання ацетильних похідних.
2. Колонка HP-5ms.
3. Температура колонки: до 70 °С за 5 хв; далі зі швидкістю 10 °С за 1 хв до 300 °С, витримка – 10 хв.
4. Температура інтерфейсу – 310 °С.
5. Іонізація – електронним ударом (70 eV), сканування по повному іонному струму в діапазоні 40–550 а.е.м.
6. Обсяг проби – 1 мкл у режимі без поділу потоку.
7. Ідентифікація – час утримування, мас-спектр.

ГХ-МС-хроматограму та мас-спектри міансерину і його метаболіту М-7 наведено на рисунку 1, параметри ідентифікації речовин та їх метрологічну характеристику – в таблицях 2, 3.

При хроматографуванні екстрактів з модельних сумішей сечі встановлено, що параметри ідентифікації речовин (час утримування та мас-спектри) відповідають параметрам ідентифікації в дослідах зі стандартами.

Аналіз методом ВЕРХ дозволяє провести як якісне, так і кількісне визначення речовини. Дослідження проводили на хроматографі "Agilent

Таблиця 1 – Результати ідентифікації міансерину (n=5)

Речовина	Значення R _f речовини залежно від складу рухомої фази				Колір плями, межа відкриття, мкг у пробі	
	система № 1	система № 2	система № 3	система № 4	реактив Маркі	реактив Манделіна
Міансерин	0,76±0,50	0,32±0,05	0,63±0,05	0,86±0,05	Рожево-фіолетовий, 100 мкг	Зелений, 50 мкг

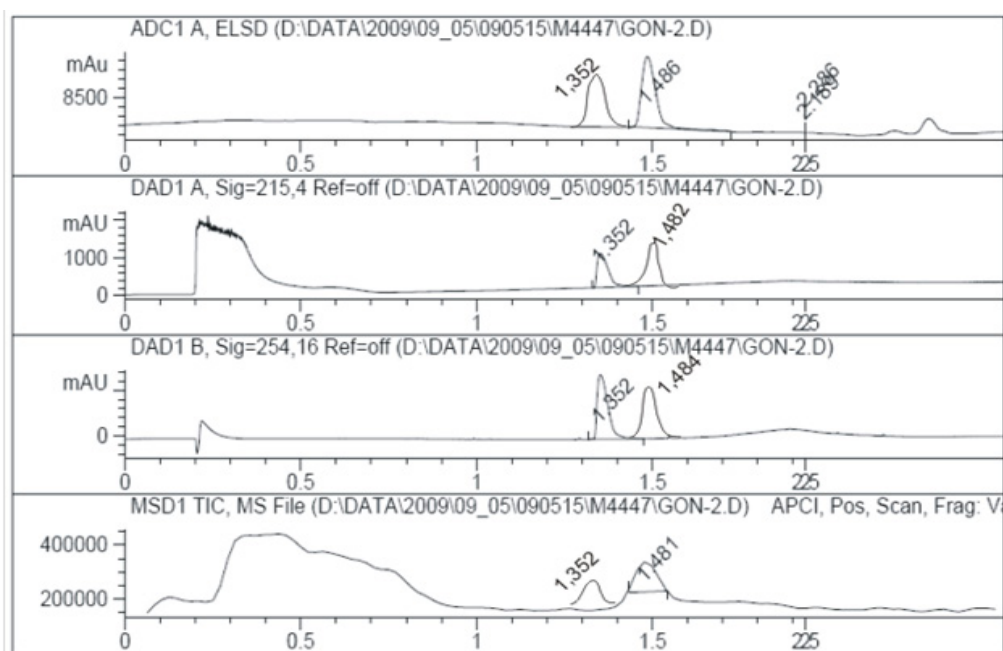


Рис. 1. ГХ-МС-хроматограма та мас-спектри міансерину і його метаболіту М-7, виділеного із сечі отруєних тварин.

Таблиця 2 – Параметри ідентифікації міансерину і його метаболіту М-7 (n=5)

Речовина	Час утримування, хв	Маса іонів (m/Z) на мас-детекторі
Міансерин	1,49	265,2
Метаболіт М-7	1,35	266,3

Таблиця 3 – Метрологічна характеристика міансерину і його метаболіту М-7 (n=5)

Речовина	Час утримування, хв				
	\bar{X}	SD	RSD	Δx	ε , %
Міансерин	1,49	0,02	0,09	0,03	0,11
Метаболіт М-7	1,35	0,01	0,07	0,14	0,09

1200", колонка Eclips C18 довжиною 150 мм, діаметром 4,6 мм, розмір частинок сорбенту – 5 мкм; сорбент ProntoSIL-120-5-C18; рухома фаза – А: [4М LiClO₄ – 0,1М HClO₄]:H₂O (5:95); Б: CH₃CN; швидкість потоку елюенту – 100 мкл/хв; режим елюювання – градієнтний; обсяг введеної проби – 4 мкл; температура колонки – 40 °С. Ідентифікацію міансерину і його метаболіту М-7 здійснювали за абсолютним часом утримування, спектральним співвідношенням та УФ-спектрами, записаними безпосередньо в режимі хроматографування.

ВЕРХ-хроматограму міансерину і його метаболіту М-7 наведено на рисунку 2, параметри ідентифікації речовин та їх метрологічну характеристику – в таблицях 4, 5.

Ізолювання міансерину і його метаболіту М-7 з модельних сумішей біологічної рідини (сечі) проводили методом рідинної екстракції. Як екстрагент ми обрали хлороформ. З огляду на показники іонізації (міансерин: рKa1 – 4,75, рKa2

– 7,45; метаболіт М-7: рKa1 – 8,0, рKa2 – 9,9), встановили, використовуючи 10 % розчин аміаку, що рН середовища повинно становити 8–9, оскільки при такому значенні рН середовища розчину можна ізолювати речовини за умов спільної присутності. Попередньо проводили кислотний гідроліз проб сечі за допомогою концентрованої хлористоводневої кислоти для імітації руйнування кон'югатів міансерину з глюкуроною кислотою.

ВИСНОВКИ. 1. Розроблено методику виявлення міансерину методом тонкошарової хроматографії на пластинках марки "Sorbfil ПТСХ". Оптимальна хроматографічна система – етанол 96 % – метиленхлорид – 25 % розчин аміаку (57,5:40:2,5); проявник – реактив Манделіна.

2. Розроблено методику визначення міансерину і його метаболіту М-7 з використанням методу високоефективної рідинної хроматографії. Встановлено параметри ідентифікації

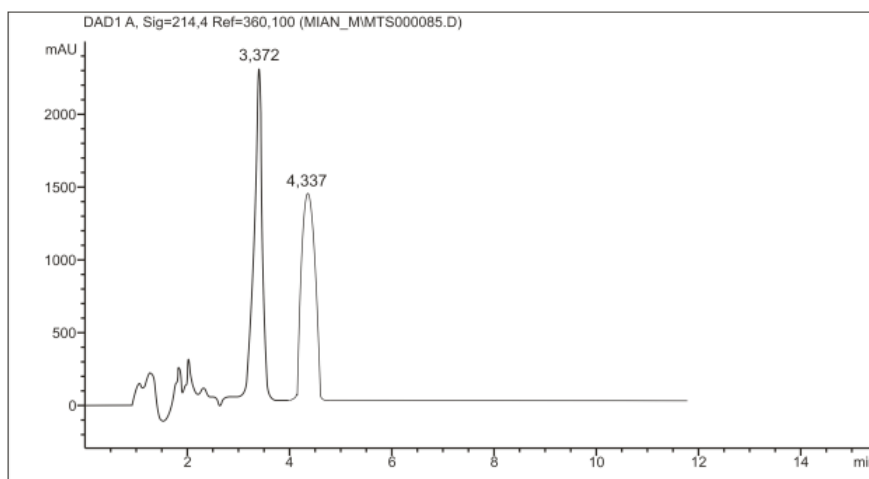


Рис. 2. ВЕРХ-хроматограма міансерину і його метаболіту М-7, виділеного із сечі отруєних тварин.

Таблиця 4 – Параметри ідентифікації міансерину і його метаболіту М-7 (n=5)

Речовина	Час утримування, хв	Спектральне співвідношення, $R=S_1/S_{210}$ нм					
		220	230	240	250	260	280
Міансерин	3,37	0,494	0,395	0,180	0,06	0,044	0,042
Метаболіт М-7	4,34	0,589	0,227	0,156	0,04	0,016	0,052

Таблиця 5 – Метрологічна характеристика міансерину і його метаболіту М-7 (n=5)

Речовина	Час утримування, хв				
	\bar{X}	SD	RSD	Δx	$\epsilon, \%$
Міансерин	3,37	0,08	0,38	0,10	0,47
Метаболіт М-7	4,34	0,09	0,40	0,11	1,74

речовин за даних умов: час утримування, спектральні співвідношення речовин, спектри поглинання в УФ-спектрах.

3. Розроблено методику ідентифікації міансерину і його метаболіту М-7 методом газорідної хроматографії з мас-спектрометрією. Встановлено параметри ідентифікації речовин за запропонованих умов: час утримування, основні характеристичні іони мас-спектра.

4. Визначено оптимальні умови ізолювання міансерину і його метаболіту М-7 при спільній

присутності з модельних сумішей біорідини (сечі). Умови екстракції: кислотний гідроліз сечі, рН середовища розчину – 8–9, екстрагент – хлороформ.

5. Розроблені методики визначення апробовано в досліді з модельними сумішами біологічних рідин (сечі). Встановлено, що запропоновані методики дозволяють визначити міансерин і його метаболіт М-7 при спільній присутності в біологічній рідині під час хіміко-токсикологічних досліджень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Schaper A. Suicide with mianserine / A. Schaper, E. Farber // *Toxicol. Clin. Toxicol.* – 2012. – No. 40. – P. 343–345.
- 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.* – 2015. – **119**, No. 6. – P. 344–348.
- Chin B. N. Effects of mianserine and of its metabolites on plasma concentrations / B. Chin, Y. Norio // *Therapeutic Dfug Monitoring.* – 2020. – No. 21. – P. 1661–1670.
- Laimer M. Effect of mianserine treatment on body composition and metabolism / M. Laimer, K. Kramer-Reinstadler, M. Rauchenzauner, T. Lechner-Schoner // *J. Clin Psychiatry.* – 2016. – **67**, No. 3. – P. 421–424.
- Kelvin A. S. Comparative acute toxicity of mianserine and other antidepressants / A. S. Kelvin, S. M. Hakansson // *Agta Psychiatrica Scandinavica.* – 2017. – **80**, No. 23. – P. 31–33.

6. Kirchherr H. Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: a multilevel, single – sample approach / H. Kirchherr, W. Kuhn-Velten // *J. Chromatogr B Analyt Technol.* – 2016. – **20**, No. 7. – P. 100–113.

7. Will S. Comparison of electron and chemical ionization modes by validation of a quantitative gas chromatographic – mass spectrometric assay of new generation antidepressants and their active metabolites in plasma / S. Will, H. Neels // *J. Chromatogr A.* – 2017. – **1176**, No. 1. – P. 236–242.

8. Novakova E. Detection of new antidepressive agents using thin – layer chromatography / E. Novakova // *Soud Lek.* – 2014. – No. 1 – P. 2–6.

9. Гончарук Н. В. Застосування методу хроматографії в тонкому шарі сорбенту для ідентифікації тіанептину / Н. В. Гончарук, І. Й. Галькевич // *Фармац. часоп.* – 2007. – № 3. – С. 37–38.

10. Горлачук Н. В. Хромато-мас-спектрометричний аналіз тіанептину в сечі / Н. В. Горлачук, Л. М. Мосула, Н. О. Зарівна // *Мед. та клініч. хімія.* – 2018. – **20**, № 4 (77). – С. 146–152.

REFERENCES

1. Schaper, A., Farber, E. (2012). Suicide with mianserine *Toxicol. Clin. Toxicol.*, 40, 343-345.

2. Koski, A., Vuori, E., Ojanpera, I. (2015). Relation of postmortem blood alcohol and drug concentrations in fatal poisoning involving propoxyphene, mianserine and promazine *Hum. Exp. Toxicol.*, 119 (6), 344-348.

3. Chin, B., Norio, N. (2020). Effects of mianserin and of its metabolites on plasma concentrations *Therapeutic Drug Monitoring*, 21, 1661-1670.

4. Laimer, M., Kramer-Reinstadler, K., Rauchenzauner, M., & Lechner-Schoner T. (2016). Effect of mianserin treatment on body composition and metabolism *J. Clin Psychiatry*, 67 (3), 421-424.

5. Kelvin, A.S., & Hakansson, S.M. (2017) Somnolent acute toxicity of mianserine and other antidepressants *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 80 (23), 31-33.

6. Kirchherr, H., Kuhn-Velten, W. (2016) Quantitative determination of forty-eight antidepressants and anti-

psychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: a multilevel, single – sample approach *J. Chromatogr B. Analyt. Technol.*, 20 (7), 100-113.

7. Will, S., & Neels, H. (2017). Comparison of electron and chemical ionization modes by validation of a quantitative gas chromatographic – mass spectrometric assay of new generation antidepressants and their active metabolites in plasma *J. Chromatogr A*, 1176 (1), 236-242.

8. Novakova, E. (2014). Detection of new antidepressive agents using thin – layer chromatography. *Soud Lek.*, 1, 2-6.

9. Goncharuk, N.V., & Halkevych, I.I. (2007). Application of the chromatography method in a thin layer of sorbent for the identification of tianeptine. *Pharmaceutical Journal*, 3, 37-38 [in Ukrainian].

10. Horlachuk, N.V., Mosula, L.M., Zarivna, N.O. (2018). Chromato-mass spectrometric analysis of tianeptine in urine. *Medical and Clinical Chemistry*, 4, 146-152 [in Ukrainian].

Отримано 20.07.2023

Адреса для листування: Н. В. Горлачук, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, майдан Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна, e-mail: horlachuk@tdmu.edu.ua.

N. V. Horlachuk, N. O. Zarivna

I. HORBACHEVSKY TERNOPIL NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

DETECTION OF MIANSERIN IN URINE BY CHROMATOGRAPHIC METHODS

Summary

Introduction. According to the literature, the greatest toxicological danger is formed by drugs that affect the central nervous system. According to toxicology services, about 800,000 fatal poisonings by psychotropic, hypnotic, sedative, antidepressant and other groups of drugs are registered annually in the world. In recent years, scientific interest in the study of antidepressants and narcotic substances in toxicological practice has grown significantly. However, every medicinal substance under certain conditions can become a poison, especially those that have a nature of long-term use, such as the tricyclic antidepressant mianserine.

The aim of the study – to develop methods for the identification of mianserine in biological fluids (urine) in the joint presence of thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC), gas-liquid chromatography with mass spectrometry (GL-MS).

Research Methods. The research used: chloroform solutions of mianserin and its metabolite desmethylmianserin M-7 isolated from the urine of poisoned animals; chromatographic systems: toluene-acetone-96 % ethyl alcohol-25 % ammonia solution (45: 45: 7,5: 2,5), chloroform-acetone (10:10), ethyl acetate-methanol-25 % ammonia solution (85: 10: 5), ethanol-methylene chloride- 25% ammonia solution (57.5: 40: 2.5); Marki and Dragendorf reagents; gas chromatograph Agilent 1200.

Results and Discussion. Identification of mianserine was performed by identification reactions, thin layer chromatography (TLC). The optimal chromatographic system is ethanol 96 %: methylene chloride: 25 % ammonia solution (57.5: 40: 2.5); developer – Mandeline reagent. The parameters of substance identification in these conditions are established: retention time, spectral ratios of substances, absorption spectra in UV spectra.

Conclusion. A method for detecting mianserine by TLC on Sorbfil PTSH plates has been developed. A method for the determination of mianserine using HPLC has been developed. A method for the identification of mianserine by gas-liquid chromatography with mass spectrometry (GL-MS) has been developed. The optimal conditions for the isolation of mianserine in the joint presence of model mixtures of bioliquid (urine).

KEY WORDS: antidepressants; mianserine; thin layer chromatography; high performance liquid chromatography; gas-liquid chromatography with mass spectrometry.