

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
факультет фармацевтичних технологій та менеджменту
кафедра фармацевтичної хімії

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: **ВИДІЛЕННЯ ТІАНЕПТИНУ З БІОЛОГІЧНИХ РІДИН**

Виконала: здобувачка вищої освіти групи

Фм20(4,6з) мед-01а

спеціальності: 226 Фармація, промислова фармація
освітньої програми Фармація

Надія БЕНДЮГ

Керівник: професор закладу вищої освіти кафедри
фармацевтичної хімії, д.фарм.н., професор

Сергій БАЮРКА

Рецензент: завідувач кафедри загальної хімії,
д.фарм.н., професор

Сергій КОЛІСНИК

АНОТАЦІЯ

Метою роботи є встановлення оптимальних умов виділення сучасного антидепресанта тіанептину з біологічних рідин (кров, сеча) з використанням рідинно-рідинної екстракції з наступною розробкою умов виявлення вказаного препарата в отриманих екстрактах за допомогою хімічного методу, тонкошарової хроматографії, УФ-спектрофотометрії. Отримані результати мають практичний інтерес та можуть бути використані при проведенні судово-токсикологічних досліджень об'єктів біологічного походження на присутність тіанептину. Робота загальним об'ємом 54 сторінки, вона включає 3 розділи, висновки, 8 таблиць, 2 рисунки, 34 джерела літератури.

Ключові слова: тіанептин, біологічні рідини, ізолювання, УФ-спектрофотометрія.

ANNOTATION

The aim of this work is to determine the optimal conditions for the isolation of the modern antidepressant Tianeptine from the biological fluids (blood, urine) using liquid-liquid extraction followed by development of the conditions for detection of the drug being studied in the obtained extracts using the chemical method, thin-layer chromatography, UV spectrophotometry. The results obtained are of practical interest and can be used in the forensic toxicological studies of the samples of biological origin for the presence of Tianeptine. The work has a total volume of 54 pages, it includes 3 sections, conclusions, 6 tables, 2 figures, 34 sources of literature.

Key words: Tianeptine, biological fluids, isolation, UV spectrophotometry.

З М І С Т

ВВЕДЕННЯ.....	6
РОЗДІЛ 1 ТОКСИКОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТІАНЕПТИНУ ТА БІОАНАЛІТИЧНІ МЕТОДИ ЙОГО ВИЗНАЧЕННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	9
1.1 Особливості застосування тіанептину в сучасній медичній практиці. Фармакологія та токсикологія тіанептину	10
1.2. Гострі та летальні отруєння тіанептином.....	12
1.3. Фізико-хімічні властивості тіанептину.....	16
1.4. Фармакокінетичні та токсикокінетичні характеристики тіанептину.....	17
1.5. Методи визначення тіанептину в об'єктах біологічного походження.....	18
Висновки до розділу 1.....	22
РОЗДІЛ 2. РОЗРОБКА МЕТОДІВ ВИЯВЛЕННЯ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ТІАНЕПТИНУ.....	23
2.1. Матеріали та методи.....	23
2.2. Виявлення тіанептину за допомогою хромогенних реактивів.....	26
2.3. Виявлення тіанептину методом тонкошарової хроматографії.....	28
2.4. УФ-спектрофотометричний метод виявлення тіанептину.....	32
2.5. Кількісне визначення тіанептину УФ-спектрофотометричним методом.....	34
Висновки до розділу 2.....	40
РОЗДІЛ 3. ІЗОЛЮВАННЯ ТІАНЕПТИНУ З БІОЛОГІЧНИХ РІДИН.....	42
3.1. Розробка умов очистки екстрактів, що містять тіанептин, від співекстрактивних речовин.....	42
3.2. Виділення тіанептину з крові.....	45
3.3. Виділення тіанептину з сечі.....	48

3.4. Виявлення тіанептину в витяжках з крові та сечі за допомогою методу тонкошарової хроматографії.....	49
3.5. Виявлення та кількісне визначення тіанептину в екстрактах з біологічних рідин методом УФ-спектрофотометрії	50
Висновки до розділу 3.....	51
Загальні висновки	53
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	55
ДОДАТКИ.....	59

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

Liquid Chromatography	LC
Limit of detection (межа виявлення)	LOD
Limit of quantitation (межа кількісного визначення)	LOQ
Relative Standart Deviation	RSD
United Nations Office on Drugs and Crime	UNODC
Рідинна хроматографія з подвійним мас-спектрометричним детектором	PX-MC/MC
Стандартний розчин	CP
Робочий стандартний розчин	PCP

ВСТУП

Актуальність теми. Протягом останніх років кількість отруєнь лікарськими засобами антидепресивної дії у світі значно збільшилась через суттєве розповсюдження депресивних захворювань, затяжний характер їх протікання та схильність до хроніфікації цієї хвороби. Згідно з останніми статистичними даними, епідеміологія отруєнь лікарськими препаратами психотропного ряду різних фармакологічних груп, в тому числі й антидепресантами, має тенденцію до значного поширення та складає у теперішній час близько 15% серед усіх груп сильнодіючих лікарських засобів. Розробка методів аналітичної діагностики отруєнь лікарськими препаратами має важливе значення для профілактики інтоксикацій ними. За оприлюдненими даними Європейського моніторингового Центру з наркотиків та наркоманій, на кожні вісім тисяч фатальних отруєнь лікарськими препаратами, що кожного року реєструються в країнах Східної Європи протягом останніх років, більше 85% з них були діагностовані за результатами хіміко-токсикологічних досліджень.

Тіанептин – це сучасний трициклічний антидепресант, що має широке використання в сучасній медичній практиці для фармакокорекції та лікування патологічних станів та захворювань, пов'язаних з розвитком депресії. Отруєння трициклічними антидепресантами протікають вкрай важко та є небезпечними, вони мають в декілька разів вищу кількість летальних висходів, ніж антидепресантами з групи селективних інгібіторів зворотнього захвату серотоніну. Розробка аналітичних методів визначення тіанептину в об'єктах біологічного походження є важливим завданням аналітичної токсикології.

Мета дослідження. Метою дослідження було розроблення ефективних методів виділення антидепресанту тіанептину з біологічних рідин – крові та сечі методами рідинно-рідинної екстракції, а також розробка оптимальних умов ідентифікації та кількісного визначення зазначеного антидепресанту в

екстрактах з біологічних рідин за допомогою хімічного методу (кольорові експрес-тести), тонкошарової хроматографії та методу УФ-спектрофотометрії.

Завдання дослідження. Для реалізації поставленої мети дослідження було визначено вирішити наступні завдання:

1. розробити оптимальні умови виявлення антидепресанту тіанептину в екстрактах з біологічних рідин (кров, сеча) за допомогою кольорових реакцій та методу хроматографії в тонкому шарі сорбенту, придатні для проведення токсикологічного скринінгу сильнодіючих лікарських речовин;
2. вивчити умови використання методу спектроскопії в УФ-області для виявлення тіанептину в екстрактах з біологічних рідин;
3. розробити чутливу методику кількісного визначення тіанептину методом абсорбційної УФ-спектрофотометрії;
4. дослідити умови екстрагування тіанептину з водних розчинів органічними екстрагентами в залежності від рН середовища, визначити органічні розчинники, найбільш придатні для екстракції вказаного антидепресанту з біологічних рідин та для очистки екстрактів від ендогенних домішок з крові та сечі.
5. встановити умови очистки екстрактів з біологічних рідин, що містять тіанептин, від співекстрактивних речовин за допомогою сполучення екстракційного методу та тонкошарової хроматографії.

Об'єкт дослідження. Методи хіміко-токсикологічного аналізу сучасного лікарського препарату антидепресивної (тимолептичної) дії тіанептину.

Предмет дослідження. Методи пробопідготовки біологічних рідин при проведенні судово-токсикологічного дослідження на наявність антидепресивного засобу тіанептину.

Методи дослідження. Хімічний метод: реакції з кольоровими експрес-тестами, метод тонкошарової хроматографії, УФ-спектроскопічний метод.

Практичне значення отриманих результатів. Опрацьовані ефективні методи пробопідготовки біологічних рідин, методи виявлення, наступної ідентифікації та кількісного визначення антидепресивного засобу тіанептину, які можуть бути рекомендовані для практичного використання при проведенні спеціальних токсикологічних досліджень в рамках судово-медичної експертизи на вміст тіанептину.

Апробація результатів дослідження і публікації. Отримані за темою дослідження результати були представлені у вигляді тез: Бендюг Н. О., Баюрка С. В. Розробка методу ізолювання тіанептину з крові. *Modern chemistry of medicines*: матеріали Міжнар. Internet-конф., м. Харків, 25 верес. 2024 р. Харків: НФаУ. С. 140.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи. Кваліфікаційна робота складається із вступної частини, огляду даних наукової та патентної літератури, двох експериментальних розділів, загальних висновків, переліку використаних джерел літератури. Роботу викладено на 54 сторінках, вона включає 6 таблиць, 2 рисунки та містить 34 літературні джерела.

РОЗДІЛ 1

ТОКСИКОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТІАНЕПТИНУ ТА БІОАНАЛІТИЧНІ МЕТОДИ ЙОГО ВИЗНАЧЕННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Препарати антидепресивної мають важливе хіміко-токсикологічне значення через їх здатність в певних умовах використання в медичній практиці викликати серйозні побічні ефекти і призводити до гострих та летальних отруєнь. До теперішнього часу аналітичні аспекти їх токсикології опрацьовані недостатньо. Значна кількість існуючих біоаналітичних методик визначення препаратів антидепресивної дії рекомендована для проведення терапевтичного лікарського моніторингу, а також для спеціальних досліджень стосовно з'ясування окремих питань метаболізму та біотрансформації антидепресантів. Зазначені методи аналізу переважно базуються на застосуванні хроматографічних методів, які часто передбачають наявність спеціального високовартісного обладнання та здебільшого є недоступними для вітчизняних аналітичних експертних установ. Крім того, процес пробопідготовки об'єктів до аналізу потребує практично повної відсутності в біоекстрактах, що містять досліджувані аналіти, ендогенних біогенних компонентів біологічного зразка. З цією метою для видалення високомолекулярних домішок застосовуються методи капілярної ультрамікроекстракції та ряд інших, але використання вказаних методик обмежено через практично повну відсутність відповідного устаткування, що відображує реальний стан експертної токсикологічної служби в нашій країні. Використання найбільш поширеного методу рідинної екстракції при проведенні пробопідготовки біологічних об'єктів при хіміко-токсикологічних дослідженнях на антидепресанти, особливо нових генерацій, значно обмежено через відсутність експериментальних даних з умов їх екстракції з водних розчинів у залежності від ряду різних факторів. Важливе практичне значення має опрацювання умов виділення антидепресивних засобів з біологічних рідин,

адже для багатьох новітніх препаратів цієї фармакологічної групи такі дослідження не проводились.

Таким чином, важливим завданням аналітичної токсикології є проведення систематичного хіміко-токсикологічного дослідження препаратів антидепресивної дії (тимолептиків) з урахуванням їх індивідуальних фізико-хімічних властивостей та особливостей фармако- і токсикокінетики з використанням усього комплексу сучасних методів дослідження та ретельно проведеної пробопідготовки, які впроваджено до вітчизняної практики біоаналітичних токсикологічних досліджень.

1.1 Особливості застосування тіанептину в сучасній медичній практиці. Фармакологія та токсикологія тіанептину

Антидепресивний засіб тіанептин було рекомендовано до впровадження в медичну практику у шестидесятих роках минулого століття французьким товариством з проведення медичних та клінічних досліджень в якості ефективного антидепресанту, що за механізмом фармакологічної дії здатний вибірково індукувати зворотній захват серотоніну, а також наявністю в його дії анксиолітичних властивостей. За хімічною будовою тіанептин являє собою трициклічний антидепресант, що поєднує високу протитривожну та тимолептичну дію [1]. Стосовно механізму фармакологічної дії тіанептину, то він, на відміну від класичних трициклічних антидепресантів (амітриптилін, докsepін та ін.), активує нейрональний захват моноаміну серотоніну [2–4].

Тіанептин також проявляє високу афінність до опіюїдних рецепторів центральної нервової системи. Препарат є повним агоністом до μ - та δ -опіюїдних рецепторів, але тіанептин абсолютно неактивний по відношенню до κ -опіюїдного рецептора. Саме цим пояснюється те, що тіанептин демонструє виражений анксиолітичний та антидепресивний фармакологічний ефект і порівняно невисоку седативу дію [4–5].

Тіанептин під торговими назвами Stablon, Tatinol, Coaxil та рядом інших відпускається за рецептами у багатьох країнах Європи, Азії та Південної Америки [6]. Препарат не затверджено до офіційного медичного використання

в Сполучених Штатах Америки. У тих країнах, де тіанептин рекомендований для медичного застосування, його найчастіше призначають з метою лікування та фармакокорекції депресивного стану середнього ступеню важкості, а також депресивних розладів з проявами ажитації різної етіології [5–6]: реактивної та невротичної природи, при тривожно-депресивних порушеннях, в тому числі в комплексній терапії при різноманітних соматичних захворюваннях [5], при аутизмі, проявах важкого алкогольного абстинентного синдрому.

Зазвичай при терапії тіанептином препарат призначають з рекомендованим дозуванням у межах від 25 до 50 мг протягом доби, оптимальний терапевтичний ефект досягається при вживанні по 12,5 мг тричі на день перед вживанням їжі, пацієнтам похилого віку при проявах ниркової недостатності препарат призначається на два прийоми протягом доби.

Тіанептин добре переноситься хворими, в окремих випадках може спостерігатися диспепсія, сухість слизових ротової порожнини та стравоходу, запаморочення, головний біль, значне зниження швидкості реакцій, стійкі порушення сну, повторні запаморочення, астеничний синдром, пульсуючий або тягнучий біль у м'язах, порушення серцевого ритму, тремор верхніх кінцівок, посилення суїцидальних думок [7]. Тіанептин не рекомендовано призначати при терапії депресій сумісно з антидепресантами інших груп, особливо з інгібіторами моноамінооксидази, при порушенні функцій печінки, при вагітності, а також дітям. Під час вживання тіанептину не рекомендовано займатися діяльністю, що потребує підвищеної уваги та концентрації, а також швидкої психічної та фізичної реакції. Форма випуску тіанептину: таблетки по 12,5 мг (0,0125 г) по 30 шт. Зберігання за списком Б.

У деяких країнах Східної Європи медичні показання щодо призначення тіанептину з 2012 року були суттєво обмежені внаслідок чисельних випадків формування залежності та немедичного використання препарату, повідомлення про які неодноразово надходили з різних країн світу [8–10].

1.2 Гострі та летальні отруєння тіанептином

Антидепресивний препарат тіанептин відносно добре переноситься більшістю категорій хворих на ендогенну депресію. Головними чинниками, які призводили до гострих та летальних отруєнь, про що зазначено у відповідних фахових наукових виданнях з токсикології, було умисне передозування тіанептином особами з суїцидальним типом поведінки та мислення, випадкове перевищення терапевтичної дози препарату при самолікуванні, випадки немедичного застосування тіанептину з метою отримати бажані психотропні ефекти [11–12].

В науковій літературі повідомляється про випадок прояву гострої інтоксикації тіанептином через умисне внутрішньовенне введення препарату 36-річним чоловіком з метою отримати стан задоволення та ейфорії. З обставин справи відомо, що постраждалий раптово втратив свідомість, а випадковий свідок викликав швидку медичну допомогу. Клінічна картина отруєння характеризувалась надмірним звуженням зіниць, порушенням зовнішнього дихання, при цьому спостерігалось суттєве зниження частоти дихання до шести дихальних рухів на хвилину. Токсикологічний аналіз крові виявив надмірну концентрацію етилового алкоголю в сироватці постраждалого, яка складала 133 мг/мл. Протягом декількох діб хворий повністю одужав після антидотної терапії налоксоном, який успішно використовувався із вказаною метою [13].

В іншому випадку було зареєстровано летальне отруєння 26-річного психічно нестабільного чоловіка, якого було знайдено лежачим у ліжку з великою кількістю піни навколо рота. Поруч з тілом отруєного було знайдено порожні блістерні упаковки таблеток «Стаблон» та записку про свідоме самогубство. З метою попередньої пробопідготовки було проведено екстракцію рідкої рідини постраждалого сумішшю етилацетат–*n*-гексан та сумішшю *i*-пропанол–*n*-гексан з подальшим аналізом методом рідинної хроматографії з матрично-діодним та мас-спектрометричним типом детектування (LC–DAD–MS) при використанні способу іонізації

електроспресм. Межа виявлення вказаним методом складала 0,001 мкг/мл. Проведена аналітична діагностика зазначеного летального отруєння з використанням методу високоефективної рідинної хроматографії з діодно-матричним та мас-спектрометричним детектуванням виявила наступні летальні концентрації тіанептину в секційному матеріалі та в біологічних рідинах: 23 мкг/г в печінці, 22 мг у вмісті шлунку, 2,0 мкг/мл в сечі та 5,1 мкг/мл в крові. Відсутність будь-яких інших безпосередніх причин, що призвели до фатального отруєння, опрацьовані результати гістологічного та макроскопічного досліджень, а також позитивні результати стосовно виявлення тіанептину у секційному матеріалі, призвели патологоанатома до об'єктивного висновку, що смертельний висхід стався через отруєння, спричинене умисним суїцидальним вживанням тіанептину на фоні алкогольного сп'яніння.

В Сполучених Штатах Америки зареєстровано два смертельних випадки через інтоксикацію таблетками тіанептину, при цьому антидепресантний препарат використовували у надмірно високих дозах [14–17]. Перший випадок летального отруєння стосувався чоловіка віком 28 років, який був знайдений на підлозі біля свого будинку. Постраждалий мав тривалу історію зловживання психоактивними речовинами та наркотиками, але результати хіміко-токсикологічного дослідження біологічної рідини (кров) на момент летального отруєння не виявили присутності інших психотропних речовин. Другий фатальний випадок стосувався чоловіка віком тридцяти років, якого також було знайдено на підлозі біля свого помешкання. В обох випадках поруч з постраждалими було знайдено порожні упаковки з під таблеток тіанептину. Проведена біоаналітична діагностика цих двох випадків смертельного отруєння, що була виконана за допомогою методу рідинної хроматографії з тандемним мас-спектрометричним детектуванням (РХ–МС/МС), показала летальні кількості тіанептину в сироватці крові 2,0 мг/л та 8,4 мг/л відповідно.

В науковій літературі наведено дані про випадок фатального комбінованого отруєння жінки середнього віку з проявами психічних

порушень, тіанептином та трамадолом [18]. Вміст тіанептину в сечі становив 23 мг/л, в цільній крові – 12,5 мг/л; знайдені концентрації трамадолу в сечі та крові були 60 мг/л та 5,0 мг/л відповідно. Присутність трамадолу та тіанептину також було підтверджено у вмісті шлунку та в печінці.

У літературі наведено відомості про випадок комбінованого гострого отруєння жінки через навмисний надмірний прийом трициклічних антидепресантів тіанептину та амітриптиліну, про що було повідомлено до екстренної медичної служби, куди надійшов виклик про надання невідкладної медичної допомоги [18]. Через зупинку дихання постраждалу було інтубовано. Клінічним проявом отруєння був розвиток гіпотонії (близько 80/60 мм рт. ст.) та повна відсутність реакції на больові подразники та звукові сигнали з боку постраждалої. З метою виведення пацієнтки з важкої коми, жінці було внутрішньовенно введено суміш з 25 г 50 % декстрози, 100 мг тіаміну та 2 мг налоксону, крім того, виконували активну детоксикацію за допомогою активованого вугілля, призначали прискорений діурез з внутрішньовенним підлюговуванням крові гідрокарбонатом натрію. Відновити спонтанне дихання пацієнтки вдалось через 20 хв після початку проведення реанімаційних заходів.

Про чисельні випадки немедичного використання тіанептину з метою зловживань та наступний розвиток залежності від антидепресанту повідомлялось у багатьох європейських країнах [19]. При призначенні терапії препаратом лікарі-психіатри повинні враховувати можливі ризики, які пов'язані з наслідками важкого ефекту «відміни» тіанептину та можливими соматичними ураженнями [20–21]. Притаманні тіанептину фармакологічні властивості, зокрема, активність до ряду опіоїдних рецепторів, порівняно легкі побічні ефекти при передозуванні та його здатність викликати у високих дозах стан ейфорії, є головними причинами розвитку залежності та випадків зловживань антидепресантом. Також відмічені повідомлення чисельних користувачів про самотійне вживання до 3000 мг тіанептину на добу [21].

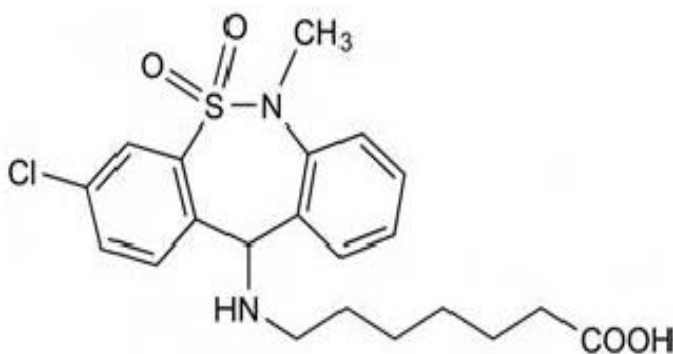
Проведені на базі центру з реєстрації отруєнь Toxicall (США) ретроспективні дослідження за звітний період з січня 2000 року по квітень 2017 року, показали наступні статистичні результати стосовно випадків негативного впливу тіанептину на потерпілих при вживанні препарату: із восьми чоловіків віком до 27 років, три повідомили про медичне використання тіанептину з терапевтичною метою, четверо – про свідоме зловживання; один випадок був пов'язаний з ненавмисним педіатричним прийомом вказаного антидепресанту в дозі 12,5 мг. Для двох з цих повідомлень, що стосувались навмисного зловживання тіанептину, вжиті пероральні дози становили 5 г та 10 г препарату на день відповідно. При цьому відмічено, що п'ятеро чоловіків скаржилися на побічні симптоми, які відповідають проявам опіоїдної абстиненції. Проведенні заходи з лікування для одного з двох пацієнтів призначенням налоксону призвели до поліпшення психічного стану хворого та до усунення порушень функцій дихання пацієнта. В літературних джерелах наводяться чисельні випадки, пов'язані з повідомленнями про негативний вплив препаратів антидепресивної дії, в тому числі, й тіанептину, на психоемоційний стан людини та продукування тимолептиками суїцидальних думок і поведінки [22–25]. Зокрема, серйозний вплив на створення напруженої токсикологічної ситуації навколо антидепресантів мають безрецептурні харчові добавки, що містять вказані препарати, і тіанептин, зокрема [26–28]. Для тіанептину характерним є розвиток сталого «синдрому відміни» [29].

В літературі повідомляється про зареєстрований випадок навмисного немедичного використання (зловживання) тіанептину жінки віком тридцяти років з метою отримати характерний психостимулюючий ефект. Пацієнтці лікарем за медичним показанням був призначений тіанептин у рекомендованій дозі 12,5 мг тричі на день для перорального прийому з метою фармакокорекції депресивного розладу середнього ступеню важкості. Жінка одразу самовільно збільшила дозу, та через два місяці довела вживання тіанептину до 150 таблеток на добу. Основними клінічними проявами інтоксикації антедепресантом були нудота, блювота, біль у животі, стійка анорексія з

наступним зниженням ваги тіла, порушення функцій шлунково-кишкового тракту. Пацієнтка зловживала антидепресивним засобом протягом семи місяців, після чого її було госпіталізовано до центру з лікування для проведення детоксикації організму. Припинення вживання тіанептину відбувалось достатньо поступово, на протязі чотирьох днів. При цьому виник синдром «відміни», що клінічно проявлявся відчуттям голоду та міалгією. Стан хворої вдавалось значно полегшити призначенням антипсихотичного засобу ціамемазину, що чинить помірний седативний ефект, а також призначенням анксиолітичного препарату тетразепаму (похідне 1,4-бензодіазепіну) як міорелаксуючого засобу.

1.3 Фізико-хімічні властивості тіанептину

Тіанептин – 7-[(3-хлор-6-метил-5,5-діоксо-11H-бензо[с][1,2]бензотіазепіну-11-іл)аміно] гептанової кислоти *S,S*-діоксид, або 7-(3-хлор-6-метил-6,11-дигідродібензо[с,ф] [1,2]тіазепіну-11-іламіно) гептанової кислоти *S,S*-діоксид. Тіанептин найбільш відомий під торговою маркою «Коаксил», застосовується як натрієва сіль.



$C_{21}H_{25}ClN_2O_4S$; М. м. 436,95 г/моль.

$C_{21}H_{25}ClN_2 NaO_4S$; М. м. 459,9 г/моль.

Температура плавлення тіанептину-кислоти знаходиться у межах 129–131 °С, натрієвої солі тіанептину близько 180 °С. Тіанептин-кислота – це білий кристалічний порошок, натрієва сіль тіанептину – це жовтуватий або білий порошок, гігроскопічний, легко розчиняється у воді. Тіанептин являє собою амфотерну речовину, $pK_a = 4,4$ (для кислотної форми), $pK_a = 6,86$ (для

основної форми). Препарат володіє невисоким рівнем ліпофільних властивостей, коефіцієнт ліпофільності становить LogP (октанол/вода рН 7,4) = 1,06. Тіанептин-натрій легко розчинюється у диметилсульфоксиді, етиловому спирті та диметилформаміді (30 мг/мл).

1.4 Фармакокінетичні та токсикокінетичні характеристики тіанептину

Середня терапевтична доза тіанептину становить 12,5 мг тричі протягом доби; пацієнтам похилого віку на фоні ниркової недостатності препарат призначають двічі на добу.

Встановлено рівень терапевтичної концентрації тіанептину в плазмі крові при надходженні разової дози 12,5 мг добровольцям молодого віку, які становили: максимальна концентрація відповідала 322 мкг/л для осіб, які не вживали їжу, досягалась за 1,29 год; та становила 241,5 мкг/л через 1,77 год за умов прийому зазначеної дози антидепресанту після вживання їжі. Стосовно пацієнтів похилого віку (72–81 рік), які вживали разову терапевтичну дозу 12,5 мг тіанептину перорально двічі на добу протягом вісімнадцяти днів, максимальний рівень концентрації у плазмі крові складав 353 мкг/л через 1,80 год.

Середньотоксичні дози тіанептину для різних випадків передозувань становили близько 3000 мг на добу препарату перорально, 5 г та 10 г препарату на добу перорально та 150 таблеток на добу.

В іншому повідомленні про отруєння тіанептином його концентрації в крові становили 12,5 мг/л мкг/мл [30].

В літературі наведено дані про рівень летальних концентрацій тіанептину в сечі – 23 мкг/мл.

Автори повідомляють про присутність тіанептину в зразках секційного матеріалу: 22 мг у вмісті шлунку та 23 мкг/г в печінці.

Біодоступність тіанептину складає 99 %, для людей літнього віку вона становить 85 %. Об'єм розподілу препарату (V_d) знаходиться в межах 0,5–0,8 л/кг, для літніх людей він становить близько 0,41 л/кг, за даними інших

джерел літератури – 2,03 л/кг. Тіанептин активно зв'язується з білками плазми крові, величина (F_b) сягає 95 %. Час напіввиведення препарату ($T_{1/2}$) становить 2,5 год; за даними інших авторів величина $T_{1/2}$ становить 1,16 год для нативної форми тіанептину та 7,53 год для пентанової кислоти, основного його активного метаболіту. Плазмовий кліренс тіанептину складає 14,5 л/год, для категорії літніх людей цей показник є на 40 % нижчим.

Тіанептин досить швидко абсорбується, присутність їжі уповільнює процес всмоктування. Препарат повністю метаболізується ферментною системою печінки і не піддається процесам метаболізму першого проходження. Превалюючими метаболітами в сечі та плазмі крові людини є пентанова кислота (активний метаболіт) та пропанова кислота (фармакологічно неактивний метаболіт). Фармакокінетика тіанептину є лінійною до дозування. Менше 3% від дози, що надійшла до організму, екскретується з сечею в нативному стані. У випадку тривалої терапії тіанептином його концентрація в сироватці досягає сталого значення приблизно за місяць та підтримуються на цьому рівні протягом до трьох місяців.

1.5 Методи визначення тіанептину в об'єктах біологічного походження

Біоаналітичні методи ідентифікації та кількісного визначення тіанептину, які описані в сучасних наукових виданнях, стосуються наступних методів аналізу: високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) з мас-спектрометричним, УФ-спектрофотометричним та електрохімічним детектуванням.

З метою дослідження етапів фармакокінетики тіанептину та його основного активного метаболіту (пентанової кислоти), запропоновано та валідовано високоселективний метод ВЕРХ-МС/МС.

За даними, отриманими іншими авторами при проведенні аналітичної діагностики гострої інтоксикації тіанептином, була розроблена методика його аналізу методом ВЕРХ-МС/МС для проведення кількісного визначення

досліджуваного антидепресанту в сечі. При цьому робочий діапазон лінійності складав 1–100 нг/мл (коефіцієнт кореляції $r^2 = 0,9996$), межа кількісного визначення тіанептину знаходилась на рівні 1 нг/мл. Величина відносного стандартного відхилення RSD визначення в цьому випадку не перевищувала $\pm 20\%$ по відношенню до кожного аналітичного зразку.

За даними авторів, для детектування тіанептину в посмертних зразках секційного матеріалу (кров, сеча, печінка) було використано метод високоефективної рідинної хроматографії з матрично-діодним та мас-спектрометричним типами детектуванням (в умовах електроспрей-іонізації при режимі позитивних іонів). На етапі пробопідготовки попередньо було проведено екстракційне концентрування зразка сумішшю *n*-гексан–етилацетат та сумішшю *i*-пропанол–*n*-гексан. Межа виявлення тіанептину для вказаного методу складала 0,001 мкг/мл.

В іншій роботі для визначення тіанептину та його основного метаболіту – кислоти гептанової в плазмі крові людини запропоновано метод високоефективної рідинної хроматографії з діодно-матричним детектором. У вказаних умовах визначення УФ-спектроскопічне детектування виконували в інтервалі довжин хвиль від 200 до 400 нм. При проведенні кількісного визначення відповідних аналітів вимірювання оптичної густини здійснювали при 220 нм. Лінійність методики спостерігали в діапазоні від 5 до 500 мкг/л, межа кількісного визначення складала 5 мкг/л. Встановлений ступінь ізолювання для тіанептину та його основного метаболіту, становив 71 % і 74 % відповідно при визначеній концентрації антидепресанту в плазмі 20,0 мкг/мл.

Авторами досліджено та запропоновано умови ретельної пробопідготовки біологічного матеріалу з наступним проведенням кількісного визначення тіанептину для мети хіміко-токсикологічного дослідження методом УФ-спектрометрії з розрахунком молярних та питомних показників екстинкції; екстракційно-фотометричного методу на основі реакції утворення іонного асоціату препарату з метиленовим синім в слаболужному середовищі при рН 7,8; флуориметричного методу

(градувальний графік залишався лінійним в межах концентрацій визначеного аналіту 0,5–10 мкг/мл); методу високоефективної рідинної хроматографії (лінійність калібрувального графіку спостерігали в межах концентрацій тіанептину 0,2–15 мкг/мл). Для опрацьованого авторами методу УФ-спектрофотометрії для кількісного визначення досліджуваного антидепресанту не наведено рівняння градувальної прямої графіку та робочий діапазон лінійності методики.

В роботі досліджено хроматографічну поведінку тіанептину з використанням методу тонкошарової хроматографії та запропоновано ряд рухомих фаз для його визначення та відокремлення від деяких його фармакологічних аналогів при їх сумісній присутності (флуоксетин, трамадол, амітриптилін, меліпрамін). Авторами рекомендовано ряд рухомих фаз з високою розділюючою здатністю по відношенню до зазначених антидепресантів, зокрема: ацетон – етилацетат – кислота ацетатна (1 : 2 : 0,2), метанол – ацетон (1 : 1) та етанол – метиленхлорид – 25 % розчин аммоній гідроксиду (57,5 : 40 : 2,5). Як візуалізатор досліджуваних антидепресантів в тонкому шарі сорбенту рекомендовано реактив Драгендорфа за Мун'є. В межах опрацьованих авторами умов хроматографічного визначення ряду антидепресантів рухомі фази, рекомендовані Міжнародною організацією судових токсикологів (TIAFT) для проведення систематичного токсикологічного скринінгу лікарських речовин, не проводились. Авторами опрацьовано умови виявлення тіанептину з використанням методу мікрокристалоскопічних реакцій та встановлена їх чутливість (межа виявлення та граничне розведення) по відношенню до досліджуваного антидепресанту.

Авторами опрацьовано умови визначення тіанептину методами високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з УФ-спектрофотометричним мультихвильовим детектуванням та методом газо-рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектором. Методи

рекомендовано для використання при проведенні судово-токсикологічних досліджень біологічних об'єктів на вміст тіанептину.

Авторами проведено дослідження стосовно встановлення умов ізолювання тіанептину з біологічного матеріалу з використанням загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів виділення із застосуванням як екстрагентів підкисленого етилового спирту та підкисленої води та показано на їх невисоку ефективність по відношенню до досліджуваного антидепресанту. Дослідження зі встановлення ефективності ізолювання тіанептину з біологічного матеріалу з використанням амфіфільних розчинників не проводились.

Запропоновано експресну методику визначення тіанептину у фармацевтичній формі флюорометричним методом за рахунок його ефекту гасіння на вілазодон. Методика була лінійною у межах концентрацій від 10 до 100 нг/мл, значення LOD і LOQ становили, відповідно, 1,86 і 5,62 нг/мл [31].

Досліджено хімічну трансформацію тіанептину в очищеній та річковій воді під дією сонячного опромінювання. Було встановлено, що препарат повністю розкладався після 106 год експозиції. Як аналітичний метод використано спеціально розроблену і валідовану методику УВЕРХ-МС/МС [32].

Розроблено методику визначення тіанептину у плазмі крові за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) із флюорометричним детектуванням після пробопідготовки на основі твердофазної екстракції. Діапазон лінійності методики відповідав діапазону концентрацій 5–300 нг/мл; межа виявлення (LOD) становила 2 нг/мл [33].

Запропоновано провалідовану методику аналізу тіанептину та продуктів його фотодеградації у таблетках методами ВЕРХ з УФ-спектрометричним (при 254 нм) та флюорометричним (350 нм (ex) і 425 нм (em)). Лінійний діапазон вимірювання аналіту становив від 0,5 до 50 мкг у

пробі, що вводилась до інжектору, межі кількісного визначення та виявлення становили 30 та 8 нг у пробах відповідно [34].

Таким чином, біоаналітичні методи визначення тіанептину у біосубстратах людини, придатні для використання при судово-токсикологічних дослідженнях, розроблені недостатньо.

Висновки до розділу 1

1. Тіанептин – це сучасний препарат антидепресивної дії, який має широкий спектр фармакологічної активності та широко використовується в медичній практиці для лікування депресій різного походження та ступеню тяжкості. В певних умовах (самолікування, неправильне зберігання, індивідуальна непереносимість) тіанептин може чинити побічну дію та викликати отруєння різного ступеню тяжкості. Препарат є об'єктом зловживань та має немедичне використання певними категоріями осіб з метою отримання комплексу бажаних психотропних ефектів.

2. Запропоновано багаточисельні аналітичні методи виявлення та кількісного визначення тіанептину в об'єктах біологічного походження, що базуються на використанні інструментальних методів аналізу, зокрема, методу високоефективної рідинної хроматографії, газової хроматографії з різними типами детектування. Вказані методи потребують ретельної пробопідготовки та високоякісного обладнання, яке є малодоступним для реалій вітчизняного стану судово-хімічних досліджень.

3. Методи хіміко-токсикологічного аналізу тіанептину в біологічних рідинах до теперішнього часу розроблені недостатньо. Наведені в літературі біоаналітичні методики визначення тіанептину в біологічних рідинах не є систематичними та відрізняються низькою ефективністю по відношенню до вказаного антидепресанту.

РОЗДІЛ 2 РОЗРОБКА МЕТОДІВ ВИЯВЛЕННЯ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ТІАНЕПТИНУ

Для виявлення та кількісного визначення тіанептину в екстрактах з біологічних рідин (кров, сеча) ми використовували хімічний метод, тонкошарову хроматографію та метод УФ-спектрофотометрії. Зазначені методи є доступними, дозволяють виявляти токсичні та летальні кількості лікарських речовин в об'єктах біологічного походження та широко впровадженні у вітчизняну практику хіміко-токсикологічних досліджень.

2.1 Матеріали та методи

В роботі використовували субстанцію тіанептину, виділену з вкритих оболонкою таблеток «Коаксил» виробництва Les Laboratoires Servier, France (12,5 мг № 30), діюча речовина натрій тіанептин. Для виділення тіанептину відбирали 30 таблеток вказаного лікарського препарату, знімали за допомогою скальпеля оболонки та розтирали їх у фарфоровій ступці, поступово додаючи невеликими порціями 50 мл абсолютного етилового спирту. Отриману суміш фільтрували крізь паперовий фільтр у кварцову чашку для випарювання, а залишок на фільтрі додатково ретельно промивали 10 мл абсолютного етилового спирту. Вміст чашки переносили на водяну баню та випаровували при температурі, не вищій, ніж 40 °C до видалення органічного розчинника. Отриманий залишок висушували в сушильній шафі та зважували. Чистоту отриманої субстанції тіанептину контролювали методами тонкошарової хроматографії, УФ-спектрофотометрії та методом вискоефективної рідинної хроматографії з спектрофотометричним типом детектування.

В дослідженнях використовували воду (бідистилят) та органічні розчинники, які відповідали кваліфікації не нижче «ч.д.а» (Sigma-Aldrich, USA): метиловий спирт, 96% етиловий спирт, ацетон, метиленхлорид, *n*-бутанол, *i*-пропанол, хлороформ, *i*-пентанол, *n*-гексан, етилацетат, діоксан, діетиловий етер, толуен, циклогексан, діетиламін, бензен.

Кваліфікації «ч.д.а» (СНЕМАРОЛ) використовували наступні реактиви: 25% розчин амоній гідроксиду, кислота сульфатна концентрована, кислота хлоридна концентрована, кислота перхлоратна концентрована, кислота нітратна концентрована, кислота ацетатна концентрована, кислота фосфатна концентрована, амоній ванадат, калій йодид, амоній молібдат натрій нітрит, натрій сульфат безводний.

При проведенні хроматографічних досліджень використовували два типи хроматографічних пластин: Merck (Silica gel 60 F 254, виробництва Німеччини); Сорбфіл (СТХ-1, підкладка ПЕТФ, сполучна речовина силіказоль, фракція – $8 \div 12$ мкм, товщина шару 80-100 мкм).

Перед використанням хроматографічних пластин їх попередньо активували наступним чином: спочатку сорбовані домішки елюювали хлороформом, а потім пластини, для видалення зв'язаної з шаром сорбенту води, нагрівали 30 хв при 140°C (пластини з силікагелем). Активовані пластини мали високу утримуючу властивість у відношенні розмивання плям досліджуваних речовин порівняно з неактивованими пластинами цього типу.

УФ-опромінювач пластин для тонкошарової хроматографії 254 / 365 нм.

Колби мірні місткістю 10,0, 25,0 та 50,0 мл, піпетки градуйовані, клас А (Чехія, Simax).

Баня водяна «Битом» LW-4 (Польща).

Спектрофотометр СФ-46 (діапазон вимірювань 190–1100 нм).

В дослідженнях використовували хромогенні реактиви, які рекомендовані для систематичного токсикологічного скринінгу отруйних речовин Міжнародною асоціацією судових токсикологів, та реактиви, запропоновані Всесвітньою організацією охорони здоров'я для виявлення основних груп психотропних та сильнодіючих речовин.

При виконанні кольорових експрес-тестів відповідні реактиви готували наступним чином:

1) Реактив Маркі. Додавали одну краплю формаліну до 1 мл концентрованої сульфатної кислоти та суміш охолоджували. Реактив використовується свіжоприготовленим.

2) Реактив Манделіна. До 2 мл концентрованої сульфатної кислоти 0,01 г ванадату амонію 0,01 г та суміш збовтували. Реактив використовується свіжоприготовленим.

3) Реактив Ермана. До 20 мл концентрованої сульфатної кислоти додавали 0,5 мл 15% розчину кислоти нітратної і збовтували. Реактив використовується свіжоприготовленим.

4) Реактив Лібермана. До 10 мл концентрованої сульфатної кислоти додавали 1 г нітриту натрію та суміш ретельно збовтували. Реактив використовується свіжоприготовленим.

5) Реактив Фреде. До попередньо розтертого у фарфоровій ступці в порошок 0,5 г молібдату амонію додавали концентровану сульфатну кислоту (близько 5 мл). Отриману суміш ретельно перемішували, а отриманий таким чином насичений розчин молібденової кислоти в концентрованій сульфатній кислоті обережно зливали з поверхні осаду. Реактив використовується свіжоприготовленим. В деяких випадках при зберіганні реактив може дещо змінювати власне забарвлення.

6) Розчин бромтимолового синього 0,1%. Для приготування реактиву 0,10 г бромтимолового синього переносили до мірної колби місткістю 100 мл та доводили об'єм до мітки дистильованою водою.

7) Реактив Драгендорфа, модифікований за Мун'є. До 0,85 г основного нітрату бісмуту додавали 10 мл кислоти концентрованої ацетатної, а потім додавали 40 мл дистильованої води. До отриманої суміші додавали розчин, який містив 8 г йодиду калію в 20 мл води. Перед застосуванням відбирали 1 мл приготовленого реактиву та додавали до нього 2 мл концентрованої ацетатної кислоти і 10 мл дистильованої води.

2.2 Виявлення тіанептину за допомогою хромогенних реактивів

Для вивчення умов виявлення тіанептину за допомогою хромогенних реактивів (кольорові експрес-тести) нами було досліджено взаємодію вказаного антидепресанту з рядом хромогенних реактивів, які були запропоновані Міжнародною асоціацією судових токсикологів як реактиви-візуалізатори для проведення попереднього етапу ТШХ-скринінгу, а також іншими реактивами, що рекомендовані Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ) для виявлення основних груп психотропних, наркотичних та сильнодіючих речовин. Забарвлення продуктів взаємодії тіанептину з низкою хромогенних реактивів встановлювали у присутності деяких його структурних та фармакологічних аналогів, які можуть призначатися сумісно з ним: мапротиліну, міртазапіну, венлафаксину та міансерину з використанням робочих стандартних розчинів зазначених антидепресантів у хлороформі з концентрацією 1 мг/мл.

Методика виконання реакцій з хромогенними реактивами. По 10–20 мкл робочих стандартних хлороформних розчинів зазначених антидепресантів по черзі наносили за допомогою скляного каліброваного капіляру в одну точку на скляні хроматографічні пластини. До отриманих проб сухих залишків додавали по одній краплі відповідного хромогенного реактиву і одразу спостерігали появу забарвлення продуктів взаємодії та їх можливу зміну протягом декількох хвилин.

З метою встановлення чутливості відповідних хромогенних реакцій для виявлення досліджуваного антидепресанту, за допомогою скляного каліброваного капіляру наносили на хроматографічні пластини по 0,5–20 мкл стандартних розчинів тіанептину, при цьому отримували проби вмістом препарату 0,5–20 мкг у пробі. При проведенні досліджень, після додавання хромогенного реактиву/, відмічали найменшу кількість тіанептину в пробі, яка ще утворювала забарвлення. При проведенні валідації зі встановлення значення межі виявлення (LOD) за результатами взаємодії з хромогенними реактивами керувались рекомендаціями та настановами Управління

Організації Об'єднаних Націй з контролю за наркотиками та злочинністю United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC): дослідженню піддавали по 10 відповідних проб стандартного розчину тіанептину із вмістом від $1,25 \cdot \text{LOD}$ до $2,0 \cdot \text{LOD}$ препарату. Загальна кількість отриманих помилково негативних результатів не повинна становити більше, ніж два з десяти дослідів ($\text{RSD} \leq 20\%$). Результати досліджуваних реакцій взаємодії тіанептину та його структурних та фармакологічних аналогів з хромогенними реактивами, а також відповідні значення LOD зазначених реакцій для тіанептину (мкг в досліджуваній пробі) наведені в табл. 2.1. Як видно з наведених в таблиці результатів, найбільш чутливими для детектування тіанептину є УФ-промені (λ 254 нм / 365 нм), реактив Драгендорфа та 0,5 % розчин бромтимолового синього.

Таблиця 2.1

Результати взаємодії тіанептину та його фармакологічних аналогів з рядом хромогенних реактивів та їх чутливість (мкг в пробі)

Реактив	Антидепресант				
	Тіанептин	Мапротин	Міртазапін	Венлафаксин	Міансерин
1	2	3	4	5	6
УФ-світло (λ 254 нм/365 нм)	зелена/жовта флюоресценція (0,5)	н.ф. ¹	червона/оранжева флюоресценція	н.ф.	н.ф.
Реактив Драгендорфа	коричневе (0,5)	коричневе	оранжеве	коричневе	коричневе
Розчин нінгідрину	н.з. ²	синє	н.з.	синє	н.з.
Реактив Манделіна	н.з.	зелене → синє	оранжеве	коричневе → червоне → синє → зелене	фіолетове
Реактив Маркі	н.з.	фіолетове	н.з.	коричневе	н.з.
Реактив Фреде	н.з.	коричневе → зелене	н.з.	зелене ¹	фіолетове

Продовж. табл. 2.1

1	2	3	4	5	6
Реактив Лібермана	н.з.	коричневе	оранжеве	коричневе→чорвоне	фіолетове
Реактив Ермана	н.з.	н.з.	н.з.	жовте	фіолетове
1	2	3	4	5	6
Реактив ФПН	н.з.	н.з.	н.з.	н.з.	н.з.
Ферум (III) хлорид 5 %	фіолетове (15)	н.з.	н.з.	н.з.	н.з.
Розчин калій перманганату (підкислений)	коричневе (2,0)	коричневе	буре	буре	коричневе
Бромтимоловий синій	синє (0,5)	фіолетове	фіолетове	синє	фіолетове
Пари йоду	коричневе (4,0)	коричневе	коричневе	коричневе	коричневе

Примітки:

1. Не має флюоресценції; 2. Не має забарвлення

Чутливість виявлення тіанептину з зазначеними реактивами складала 0,5 мкг антидепресанту в пробі. Показано, що з реактивами Ермана, Лібермана, Фреде, Маркі та Манделіна тіанептин забарвлених продуктів не утворює.

2.3 Виявлення тіанептину методом тонкошарової хроматографії

При проведенні неспрямованого хіміко-токсикологічного дослідження на його попередньому етапі виявлення отруйної речовини базується на використанні методів токсикологічного скринінгу з використанням хроматографії, тонкошарової хроматографії, рідинної та газової хроматографії. До найбільш поширеного підходу стосовно проведення скринінгу лікарських речовин є використання тонкошарової хроматографії на попередньому етапі дослідження екстрактів з біологічного матеріалу. Міжнародним комітетом із систематичного токсикологічного аналізу при цьому рекомендовано використання дев'яти стандартних скринінгових рухомих фаз для лікарських речовин кислого, нейтрального та основного характеру.

Таблиця 2.2

Значення величин R_f тіанептину та його фармакологічних аналогів у різних рухомих фазах та тонких шарах сорбенту

Речовина	*Тип пластин	Рухома фаза (№)										
		хлороформ – ацетон (8:2) (1)	етилацетат (2)	хлороформ – метанол (9:1) (3)	етилацетат – метанол – 25 % розчин амоній гідроксиду (85:10:5) (4)	метанол (5)	метанол – <i>n</i> -бутанол (3:2) (6)	метанол – 25 % розчин амонію гідроксиду (100:1,5) (7)	циклогексан – толуен – діетиламін (15:3:2) (8)	ацетон (9)	толуен – ацетон – етано л – 25 % розчин амоній гідроксиду (45:45:7,5:2,5) (10)	хлороформ – діоксан – а цетон – 25 % розчин амоній гідроксиду (47,5:45:5:2,5) (11)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Тіанептин	I	0,07	0	0,41	0,64	0,20	0,15	0,46	0,53	0,18	0,68	0,38
	II	0,04	0	0,45	0,58	0,25	0,11	0,41	0,56	0,14	0,71	0,35
Мапротилін	I	0	0	0,15	0,71	0,14	0,11	0,29	0,42	0,16	0,34	0,54
	II	0	0	0,13	0,58	0,11	0,09	0,26	0,27	0,12	0,32	0,52

Продовж. табл. 2.2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Міртазапін	I	0,06	0,06	0,79	0,96	0,53	0,55	0,54	0,87	0,86	0,79	0,82
	II	0,04	0,04	0,74	0,88	0,66	0,52	0,51	0,43	0,46	0,56	0,80
Венлафаксин	I	0,02	0	0,19	0,93	0,51	0,15	0,67	0,71	0,71	0,94	0,76
	II	0,01	0	0,27	0,85	0,54	0,23	0,65	0,58	0,59	0,73	0,80
Міансерин	I	0,32	0	0,88	0,91	0,56	0,47	0,72	0,79	0,77	0,83	0,94
	II	0,21	0	0,74	0,86	0,95	0,54	0,75	0,48	0,48	0,63	0,87

*Примітка. Тип пластини: I – Sorbfil, II – Merk

Довідники Міжнародної асоціації токсикологів містять базу даних з параметрів хроматографічної рухливості вже більш, ніж для понад 1600 речовин, що мають токсикологічне значення.

В доступних нам джерелах літератури ми не знайшли даних з величин хроматографічної рухливості тіанептину в скринінгових рухомих фазах, які рекомендовані Міжнародною асоціацією судових токсикологів для проведення загального ТШХ-скринінгу наркотичних та психотропних речовин.

В роботі нами опрацьовано умови виявлення тіанептину при проведенні систематичного ТШХ-скринінгу лікарських речовин у присутності деяких його структурних та фармакологічних аналогів та встановлено хроматографічну рухливість ряду антидепресантів в скринінгових рухомих фазах (рухомі фази 1–9), а також в деяких інших рухомих фазах, що використовуються у вітчизняній практиці хіміко-токсикологічних досліджень для виявлення лікарських речовин в екстрактах з біологічних об'єктів (рухомі фази 10–11), та які рекомендовані для попереднього етапу ідентифікації лікарських речовин методом ТШХ (табл. 2.2). В нашій роботі встановлення хроматографічної рухливості тіанептину та його структурних та фармакологічних аналогів проводили на хроматографічних пластинах Сорбфіл та Merk, які найчастіше використовуються при проведенні хіміко-токсикологічних досліджень у вітчизняній практиці.

Дослідження антидепресантів методом тонкошарової хроматографії. На лінію старту хроматографічних пластин Merk та Сорбфіл за допомогою скляного каліброваного капіляру в одну точку наносили по 10–20 мкл робочих стандартних хлороформних (або спиртових) розчинів (концентрація 1 мг/мл) досліджуваних антидепресантів. Після цього відповідні хроматографічні пластини з нанесеними на лінію старту пробами антидепресантів вміщували в до хроматографічних камер об'ємом 1000 см³, які містили по 50 мл відповідних рухомих фаз та були попередньо насичені парою суміші органічних розчинників протягом 10 хв. При цьому довжина шляху пробігу

рухомої фази становила 8 см для пластин Сорбфіл та 10 см при використанні пластин Merk. Після досягнення рухомою фазою лінії фінішу на хроматографічній пластині, хроматограми висушували на повітрі та виявляли досліджувані антидепресанти спочатку за наявністю флуоресценції в УФ-світлі, а потім реактивом Драгендорфа, модифікованого за Мун'є.

Отримані результати зі встановлення хроматографічної рухливості тіанептину та деяких його структурних та фармакологічних аналогів у різних рухомих фазах на двох типах хроматографічних пластин представлені в табл. 2.2. Кількість експериментів зі встановлення середнього значення величини R_f антидепресантів для кожної обраної рухомої фази та типу пластини становило п'ять дослідів.

Проведення систематичного скринінгу з використанням методу ТШХ передбачає використання, зазвичай, двох-трьох хроматографічних систем з низькою кореляцією величини R_f (згідно до рекомендацій Міжнародної асоціації судових токсикологів). Серед досліджених рухомих фаз на двох типах хроматографічних пластин оптимальні значення R_f (інтервал 0,2–0,7) для тіанептину мали місце в рухомих фазах: 3, 4, 7, 8, 10.

Оптимальними рухомими фазами для виявлення тіанептину методом ТШХ є системи з низькою кореляцією їх величин R_f , які доцільно використовувати в наступних комбінаціях рухомих фаз: 6 та 7; 6 та 8; 8 та 9; 11 та 12 і інші з використанням обох обраних типів хроматографічних пластин.

2.4 УФ-спектрофотометричний метод виявлення тіанептину

Для визначення тіанептину в екстрактах з біологічного матеріалу нами було розроблено УФ-спектрофотометричний метод його визначення. З даних джерел літератури відомо, що положення максимумів світлопоглинання та їх інтенсивність для тіанептину залежать від природи розчинника. Так, УФ-спектр поглинання тіанептину в етанолі, в розчині кислоти хлоридної та в розчині натрій гідроксиду мають дві смуги світлопоглинання.

Метод УФ-спектрофотометрії є простим та доступним методом, рекомендованим Міжнародною асоціацією судових токсикологів (TIAFT) для

використання при проведенні підтверджуючого етапу ідентифікації токсичної речовини, а у випадку ретельної пробопідготовки зразка та звільнення його від ендогенних домішок метод придатний і для кількісного визначення токсиканта.

В дослідженні нами вивчено світлопоглинання тіанептину в УФ-ділянці спектру.

Методика спектроскопічного визначення. Світлопоглинання досліджуваних розчинів тіанептину в УФ-області вимірювали за допомогою спектрофотометра СФ-46 (діапазон вимірювань спектру 190–1100 нм) в діапазоні довжин хвиль 210–380 нм, кювета з товщиною поглинаючого шару рідини 10 мм. Готували робочий стандартний розчин тіанептину в хлороформі із вмістом $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л досліджуваного препарату. Точну наважку натрій тіанептину 0,00460 г (в перерахунку відповідає 0,00435 г кислотної форми тіанептину) переносили до мірної колби місткістю 100,00 мл, розчиняли у невеликій кількості хлороформу, а потім доводили до мітки вказаним розчинником. Після цього 2,00 мл робочого стандартного розчину переносили до мірної колби іншої мірної колби місткістю 10,00 мл та доводили об'єм розчину хлороформом до мітки. Отримана концентрація розчину тіанептину складала $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л. При виконанні вимірювань як компенсаційний розчин (розчин порівняння) використовували хлороформ.

Отриманий УФ-спектр світлопоглинання тіанептину представлено на рис. 2.1. Максимум світлопоглинання розчину тіанептину в хлороформі спостерігали при довжині хвилі $\lambda_{\max} 275 \pm 2$ нм (значення питомого та молярного показників світлопоглинання становили $362,7 \pm 3,4$ та $15583,2 \pm 51,2$ відповідно).

2.5. Кількісне визначення тіанептину УФ-спектрофотометричним методом

Для визначення вмісту аналіту в розчинах за результатами вимірювання оптичної густини використовують різні методи.

Метод градуювального графіку. Для побудови градуювального графіку готують серію розчинів, які містять різну кількість аналізованого компонента та однакову кількість усіх реагентів, а потім вимірюють оптичну густину A при обраній λ , нм у випадку спектрофотометричного визначення. Результати вказаного спектрофотометричного визначення досліджуваної речовини залежать від правильного вибору робочих довжин хвиль та товщини шару рідини, що поглинає. За робочу довжину хвилі зазвичай обирають ту, для якої поглинання забарвленого продукту реакції буде максимальним. Але у випадку, коли при такій довжині хвилі поглинає сам реагент або домішк, що присутні в досліджуваному розчині, як робочу обирають таку довжину хвилі, для якої різниця у поглинанні продукту реакції та реактиву є найбільшою. Усі вимірювання виконують на фоні розчину порівняння, в якості якого використовують розчин, який містить усі компоненти, окрім того, що визначається. На основі результатів вимірювань будується залежність $A=f(C)$, де C – вміст аналіту (моль/л). За отриманою графічною залежністю встановлюють концентрацію досліджуваного аналіту та перераховують на його вміст в аналізованому зразку.

Метод добавок часто використовують для встановлення вмісту досліджуваного аналіту в зразках тоді, коли приготувати ряд стандартних розчинів, близьких за своїм складом до аналізованого розчину неможливо. В такому випадку фотометрують два розчини. До однієї мірної колби вносять аліквоту досліджуваного розчину, а до іншої вносять аліквоту досліджуваного розчину і добавку стандартного розчину компонента, що визначається. До цих розчинів додають усі реагенти та вимірюють

світлопоглинання, а концентрацію визначуваного компонента можна розрахувати зі значень оптичних густин обох розчинів.

При розробці методу кількісного визначення тіанептину УФ-спектрофотометричним методом ми використовували метод побудови калібрувального графіку. Валідацію опрацьованої методики проводили у відповідності до вимог, які пред'являються до методик аналізу в галузі в судової токсикології. Нами розраховано наступні валідаційні характеристики методики: лінійність, LOD (межа виявлення), LOQ (межа кількісного визначення), правильність (intra day) протягом дня та правильність (inter day) протягом трьох днів, прецизійність.

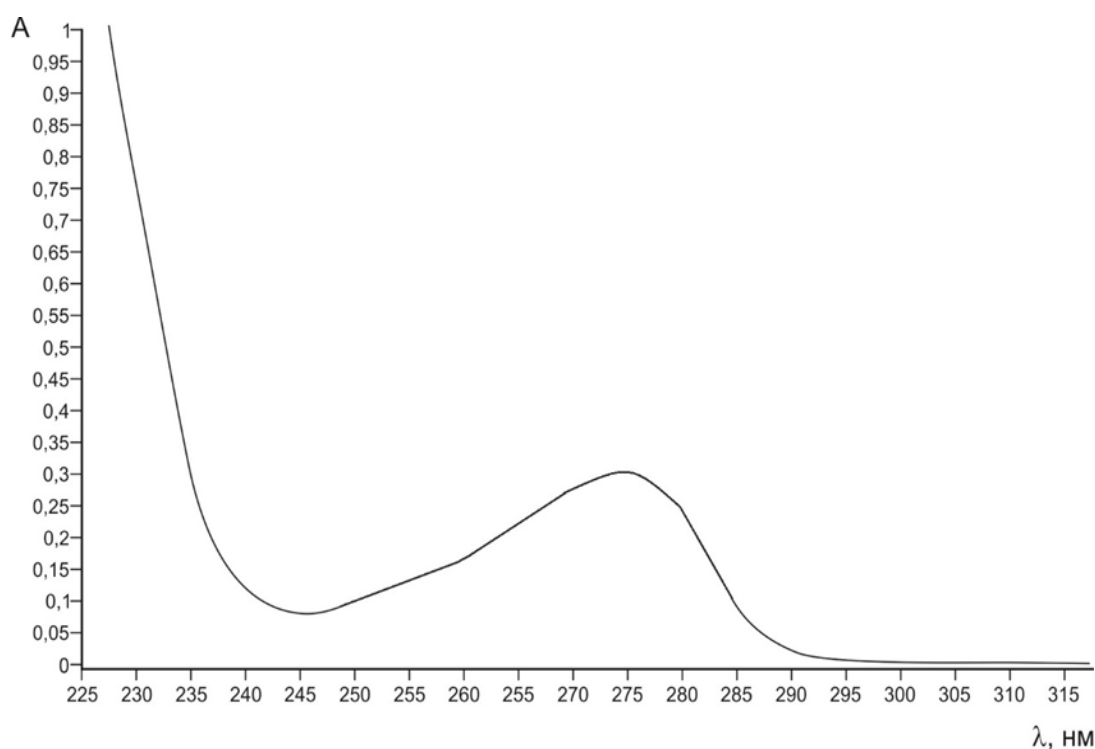


Рис. 2.1. УФ-спектр розчину тіанептину в хлороформі
($C_M = 2 \cdot 10^{-5}$ моль /л)

Побудова калібрувального графіку. З метою побудови калібрувального графіку попередньо готували стандартний розчин (СР) тіанептину, а шляхом його наступного розведення отримували відповідні робочі стандартні розчини

(РСР) препарату в хлороформі з різним вмістом в них досліджуваного антидепресанта. Для цього 0,00315 г натрій тіанептину (точна наважка) (в перерахунку величина наважки відповідала 0,00300 г кислотної форми тіанептину) переносили до мірної місткістю 100,00 мл (отриманий таким чином СР містить 30,0 мкг/мл тіанептину-кислоти). Після цього послідовно відбирали по 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00 та 9,00 мл висхідного СР та переносили аліквоти до мірної колби місткістю 10,00 мл і доводили об'єми відповідних дев'яти розчинів до позначки хлороформом. Таким чином отримували РСР тіанептину з вмістом діючої речовини, відповідно, 3,00; 6,00; 9,00; 12,00; 15,00; 18,00; 21,00; 24,00 та 27,00 мкг/мл. Світлопоглинання отриманих стандартних розчинів та робочих стандартних розчинів вимірювали при λ_{max} 275 нм. Для кожного з робочих стандартних розчинів, які готували три рази, вимірювали світлопоглинання.

Значення світлопоглинання для стандартного розчину та для дев'яти робочих стандартних розчинів були оброблені методом лінійної регресії, яка описується наступним рівнянням: $y = bx + a$. Після перевірки значущості параметру a в отриманому нами рівнянні за критерієм Фішера було зроблено висновок щодо можливості переходу до рівняння виду: $y = b'x$. Виходячи з цього, калібрувальний графік для кількісного визначення описувався рівнянням: $y = (0,0351 \pm 0,0004)x$. Лінійність зберігалась в діапазоні концентрацій тіанептину 3,0–30,0 мкг/мл (рис. 2.2).

Метрологічні характеристики отриманого калібрувального графіку для кількісного визначення тіанептину УФ-спектрофотометричним методом наведені в табл. 2.3.

Таблиця 2.3

Метрологічні характеристики калібрувального графіку для УФ-спектрофотометричного методу кількісного визначення тіанептину

Параметр	r	b	S^2	Δb	S_a	S_b
Значення	0,999	0,0351	$8,1 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-4}$	0,0052	$2,1 \cdot 10^{-4}$

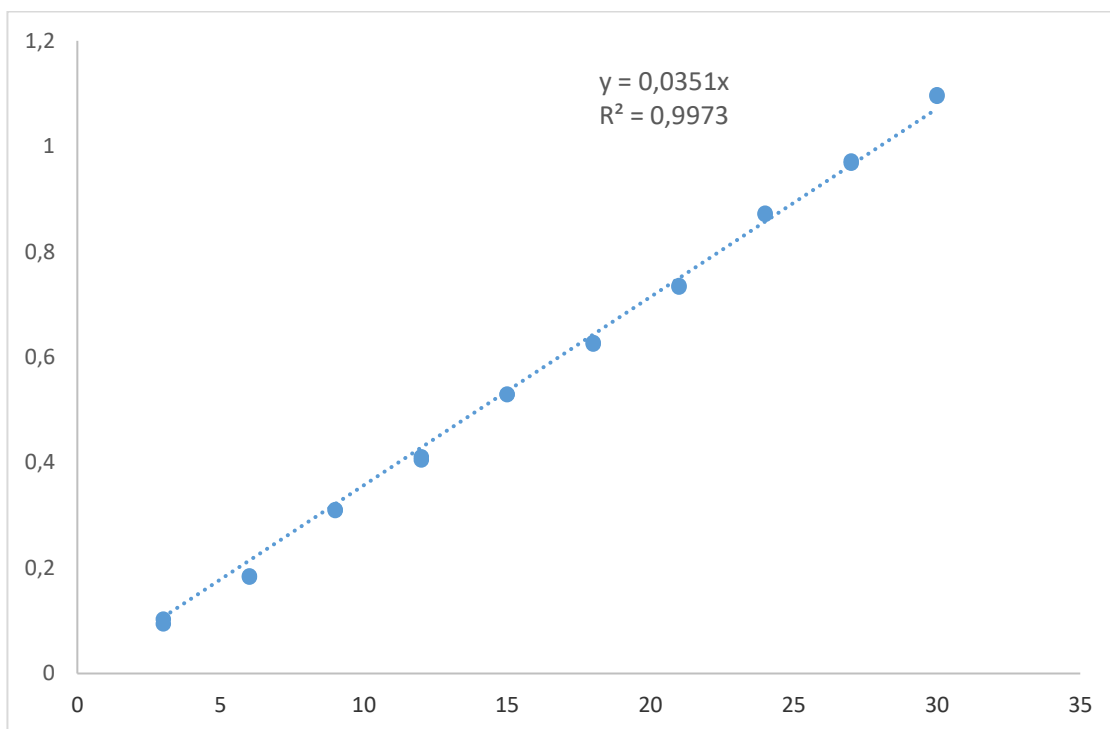


Рис. 2.2 Калібрувальний графік для кількісного визначення тіанептину методом УФ-спектрофотометрії

Для встановлення значень межі виявлення (LOD) та межі кількісного визначення (LOQ) тіанептину використовували параметри калібрувального графіку, зокрема, стандартне відхилення вільного члену (S_a) та кутовий коефіцієнт (b) у рівнянні калібрувального графіку згідно до наведених нижче рівнянь:

$$LOD = 3,3 \times S_a / b$$

$$LOQ = 10 \times S_a / b$$

Обчислені нами значення межі виявлення (LOD) та межі кількісного визначення (LOQ) методики кількісного визначення тіанептину становили, відповідно 0,5 мкг/мл та 1,5 мкг/мл.

Правильність та прецизійність опрацьованого УФ-спектрофотометричного методу визначення досліджуваного антидепресанту ми встановлювали на трьох рівнях концентрацій протягом одного дня (*intra*

day) (табл. 2.4) та протягом наступних трьох днів (*inter day*) (див. табл. 2.5). Для обчислення правильності та прецизійності методики ми зі стандартного розчину готували наступні модельні розчини тіанептину «*quality control samples*» з концентрацією 3,0 мкг/мл; 15,0 мкг/мл та 30,0 мкг/мл. Вимірювання оптичної густини (світлопоглинання) отриманих розчинів проводили тричі для кожного з них.

Таблиця 2.4

**Правильність та прецизійність кількісного визначення тіанептину
методом УФ-спектрофотометрії (*intra day*)**

Додано, мкг	A	Знайдено тіанептину, мкг	Знайдено/ додано, %	Середнє значення, %	SD	RSD, %	ε, %
3	0,100	2,83	94,33	99,21	3,33	3,71	4,32
	0,109	3,08	102,66				
	0,106	3,02	100,66				
15	0,533	14,95	99,66	100,02	1,23	1,25	2,21
	0,529	14,81	98,73				
	0,543	15,25	101,66				
30	1,077	30,20	100,66	99,58	2,87	1,43	3,03
	1,055	29,47	98,23				
	1,072	29,98	99,93				

Як видно з даних, наведених у табл. 2.4, правильність та прецизійність «*intra day*» на низькому концентраційному рівні становила 99,21 % (RSD = 3,71 %), на середньому концентраційному рівні 100,02 % (RSD = 1,25 %) та на високому концентраційному рівні 99,58 % (RSD = 1,43 %) тіанептину.

В табл. 2.5, наведено дані з розрахунку правильності та прецизійності «*inter day*», які, відповідно, дорівнювали 99,98 % (RSD = 4,87 %) на низькому, 98,82 % (RSD = 2,10 %) на середньому та 99,73 % (RSD = 2,59 %) на високому концентраційному рівні тіанептину.

Таблиця 2.5

**Правильність та прецизійність кількісного визначення тіанептину УФ-
спектрофотометричним методом (*inter day*)**

Додано, мкг	День	A	Знайдено, мкг	Знайдено/ додано, %	Середнє значення, %	SD	RSD, %	ε, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9
3,0	I	0,105	3,04	101,33	99,98	1,96	1,96	4,87
		0,109	3,07	102,33				
		0,103	3,02	100,66				
		(x̄=101,44)						
	II	0,096	2,80	93,33				
		0,107	3,06	102,00				
		0,111	3,14	104,66				
	(x̄=99,99)							
	III	0,102	2,95	98,33				
0,105		3,04	101,33					
0,101		2,88	96,00					
(x̄=98,55)								
15,0	I	0,531	14,88	99,20	98,82	0,84	0,85	2,10
		0,527	14,75	98,33				
		0,522	14,69	97,93				
		(x̄=98,48)						
	II	0,530	14,87	99,13				
		0,532	14,91	99,40				
		0,521	14,67	97,80				
(x̄=98,77)								
III	0,527	14,75	98,33					
	0,524	14,72	98,13					
	0,541	15,18	101,20					
	(x̄=99,22)							
30,0	I	1,073	30,04	100,13	99,73	1,04	1,03	2,59
		1,062	29,51	98,36				
		1,068	29,82	99,40				
		(x̄=99,29)						

Продовж. табл. 2.5

1	2	3	4	5	6	7	8	9
	II	1,080	30,27	100,90				
		1,077	30,11	100,36				
		1,092	30,31	101,03				
	III	1,061	29,48	98,26				
		1,075	30,08	100,26				
		1,066	29,79	98,89				
				($\bar{x}=100,76$)				
				($\bar{x}=99,30$)				

Як видно з наведених у табл. 2.5 даних, запропонована методика кількісного визначення тіанептину УФ-спектрофотометричним методом відповідає рекомендаціям міжнародних документів стосовно валідації біоаналітичних методик, які використовуються в галузі судової токсикології.

Висновки до розділу 2

1. Опрацьовано умови виявлення тіанептину в умовах проведення загального ТШХ-скринінгу лікарських речовин в присутності ряду його фармакологічних аналогів. З цією метою встановлено параметри хроматографічної рухливості досліджуваних антидепресантів з використанням рухомих фаз, рекомендованих Комітетом з проведення систематичного токсикологічного аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів стосовно проведення загального скринінгу сильнодіючих лікарських речовин методом ТШХ. Хроматографічні дослідження виконували на хроматографічних пластинах Сорбфіл та Merk, які є найбільш поширеними у практиці вітчизняних судово-токсикологічних досліджень.

2. Встановлено пари скринінгових рухомих фаз з низькою кореляцією величин хроматографічної рухливості тіанептину, сумісне використання яких дозволяє підвищити надійність виявлення досліджуваного антидепресанту методом хроматографії в тонких шарах сорбенту.

3. Досліджено реакції взаємодії тіанептину та його фармакологічних аналогів з рядом хромогенних реактивів, які використовуються як

візуалізатори при проведенні загального ТШХ-скринінгу лікарських речовин та встановлена їх чутливість по відношенню до тіанептину.

4. Досліджено світлопоглинання хлороформного розчину тіанептину в УФ-області спектру та встановлено наявність специфічного світлопоглинання досліджуваного антидепресанту, що дає можливість використовувати метод УФ-спектроскопії для ідентифікації тіанептину при виконанні хіміко-токсикологічних досліджень.

5. Опрацьовано умови кількісного визначення тіанептину методом УФ-спектрофотометрії. Коректність розробленої методики підтверджено рядом валідаційних параметрів: межа виявлення та кількісного визначення, діапазон лінійності, правильність і прецизійність. Розроблена методика кількісного визначення тіанептину відповідає вимогам міжнародних документів з валідації біоаналітичних методів, що використовуються в галузі судової токсикології.

РОЗДІЛ 3 ІЗОЛЮВАННЯ ТІАНЕПТИНУ З БІОЛОГІЧНИХ РІДИН

Пробопідготовка зразка об'єкта біологічного походження до проведення хіміко-токсикологічного дослідження включає екстракцію токсичної речовини з біологічної матриці, видалення співекстрактивних домішок, концентрування аналіту та проводиться на попередньому етапі токсикологічного дослідження, що суттєво впливає на результати визначення токсичної речовини. При підборі умов екстракції лікарської речовини слід враховувати ступінь ліпофільності речовини, її величину pK_a , леткість, полярність, здатність змішуватись з водою. При виконанні пробопідготовки слід враховувати можливі процеси утворення міцних комплексів між лікарськими речовинами та пептидами, характер яких значною мірою залежить від величини pH середовища. Таким чином, процес екстракції токсикантів з біологічних рідин, насамперед з крові, передбачає проведення попереднього руйнування асоціатів лікарських речовин з ендogenous компонентами біологічного зразка.

3.1. Розробка умов очистки екстрактів, що містять тіанептин, від співекстрактивних речовин

В процесі ізолювання лікарської речовини з біологічної рідини існує необхідність очистки отриманих екстрактів від співекстрактивних компонентів біологічної матриці, які часто унеможливають подальший процес визначення токсиканта.

Серед ефективних методів видалення ендogenous домішок з біологічних екстрактів найбільш поширеними є рідинна екстракція та твердофазна екстракція з використанням картриджів, що містять спеціальні сорбенти. Зазвичай рідинна екстракція не забезпечує високого ступеню очистки та видалення супутніх домішок, при цьому етап очистки завжди пов'язаний з певною втратою досліджуваного токсиканта. Перевагою методу рідинної екстракції є його доступність та значно менша трудомісткість у порівнянні з твердофазною екстракцією. В практиці проведення хіміко-токсикологічних

досліджень при видаленні біогенних домішок з біологічних екстрактів найчастіше використовується поєднання методу екстракції та тонкошарової хроматографії.

При опрацюванні умов виділення тіанептину з біологічних рідин попередньо нами було досліджено оптимальні умови екстракції препарату органічними розчинниками з водних розчинів у залежності від величини рН водної фази.

Відповідні значення величин рН водних розчинів в інтервалі значень рН від 2,0 до 11,9 створювали з використанням універсального буферного розчину Бріттона-Робінсона, 0,1 М розчину кислоти хлоридної (величина рН 1,1) та 0,1 М розчину натрій гідроксиду (величина рН 13). Як органічні екстрагенти використовували свіжоперегнані хлороформ, діетиловий етер, гексан та етилацетат.

Методика проведення екстракції тіанептину з водних розчинів органічними екстрагентами. До ділильної лійки вносили 9,00 мл універсального буферу з відповідною величиною рН, 1 мл водного розчину тіанептину із вмістом 15,0 мкг/мл досліджуваного антидепресанту та 10 мл органічного розчинника. Вміст ділільних лійок збовтували на механічному струшувачі протягом 10 хв, а потім залишали на 10 хв для розділення двох фаз. Після цього органічний розчинник відокремлювали та за необхідності фільтрували крізь паперовий фільтр, який містив 0,2 г безводного натрій сульфату. Органічний розчинник випаровували у фарфоровій чашці на водяній бані при температурі 40 °C (діетиловий етер видаляли при кімнатній температурі).

До отриманих залишків додавали по 5 мл хлороформу, суміші збовтували та кількісно переносили до мірних колб, доводили органічним розчинником до мітки та кількісно визначали тіанептин в екстрактах методом УФ-спектрофотометрії з використанням калібрувального графіку (див. розд. 2.5). Отримані результати зі встановлення ступеню екстракції тіанептину

органічними розчинниками з водних розчинів у залежності від рН водного середовища, наведені в табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Ступінь екстракції тіанептину з водних розчинів органічними розчинниками в залежності від рН середовища

рН середовища	Ступінь екстракції R, % (n = 5; P = 0,95)			
	Діетиловий етер	Хлороформ	Етилацетат	Гексан
1	2	3	4	5
1	29,4	62,7	27,6	0,8
2	31,3	67,2	30,3	1,0
3	38,1	83,2	44,5	1,9
4	58,3	85,0	58,7	2,4
5	67,5	87,1	65,2	2,4
6	71,8	91,3	70,8	2,1
7	53,5	84,6	61,2	1,6
8	42,7	56,2	55,7	1,8
9	16,3	33,5	22,3	1,3
10	8,2	14,1	10,5	1,4
11	6,6	10,3	7,7	1,7
12	5,7	7,4	5,2	1,6
13	4,7	5,2	3,9	1,4

Як видно з наведених у табл 3.1 даних, для екстракції тіанептину з водних розчинів кращим органічним розчинником є хлороформ при рН 5, ступінь екстракції при цьому складає 91 %. Для очистки екстрактів з біологічних об'єктів, які містять тіанептин, зручно використовувати гексан при рН 1–2 (ступінь екстракції становить 1 %).

3.2. Виділення тіанептину з крові

До проб модельної донорської крові (10 мл) додавали по 1 мл водного розчину тіанептину, що містив від 100,0 до 500,0 мкг зазначеного антидепресанту. Отримані суміші ретельно перемішували та залишали при кімнатній температурі на 24 год. Також паралельно ставили контрольні («сліпі», «холості») досліди з таким же об'ємом біологічної рідини. До отриманих модельних сумішей з кров'ю додавали по 10 мл 2 % розчину кислоти трихлорацетатної та перемішували проби. Через 15 хв досліджувані суміші центрифугували на протязі протязом 10 хв при 4000 об/хв. Отримані центрифугати обережно зливали з осадів формених елементів крові, переносили до ділительних лійок та тричі екстрагували співекстрактивні речовини з біологічної рідини гексаном по 10 мл кожного разу з кислого середовища (при рН 1). Фазу органічного розчинника (верхній шар) відокремлювали, відкидали та не досліджували в подальшому. Кислу фазу, що залишилася після видалення з неї біогенних домішок, за допомогою 10 % розчину амоній гідроксиду підлужували до рН 6 та додавали 5 мл насиченого розчину амоній сульфату. Отримані водні витяги переносили до ділительних лійок та тричі екстрагували тіанептин хлороформом по 10 мл кожного разу. У випадку, якщо утворювались стійкі емульсії, їх руйнували центрифугуванням при 3000 об/хв протязом 5 хв. Отримані екстракти з біологічної рідини об'єднували, кількісно переносили до мірної колби місткістю 50 мл та доводили органічним розчинником до позначки. Отримані екстракти з крові, що містили тіанептин, містили значну кількість домішок з біологічної рідини, які заважали подальшому виявленню та кількісному визначенню в них досліджуваного антидепресанту, тому ми їх додатково очищували від домішок сполученням екстракційного методу та методом тонкошарової хроматографії, як зазначено нижче. Методика додаткової екстракційної очистки витяжок, які містять тіанептин. Хлороформні екстракти, які отримані після ізолювання тіанептину з біологічних рідин, переносили до фарфорової чашки та випаровували на водяній бані до видалення органічного розчинника при

температурі близько 40 °С. До отриманого сухого залишку додавали 20 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної, ретельно перемішували та переносили вміст чашки до ділильної лійки. Кислий водний розчин двічі збовтували з гексаном по 10 мл кожного разу. Після розділення фаз шар органічного розчинника відокремлювали та відкидали, не досліджуючи в подальшому. Кислий водний залишок, що залишився, підлужували 25% розчином амоній гідроксиду до значення рН 5–6 (за універсальним індикатором), переносили до ділильної лійки та тричі екстрагували тіанептин хлороформом порціями по 10 мл кожного разу. Хлороформні екстракти об'єднували та фільтрували крізь складчастий паперовий фільтр, який містив 0,3 г безводного натрій сульфату, до мірної колби місткістю 50 мл та доводили об'єм розчину до позначки вказаним органічним розчинником. Органічні екстракти, отримані у «холостих» дослідках з біологічними рідинами, після проведеної екстракційної очистки містили значну кількість ендogenous співекстрактивних домішок, які заважали виявленню та кількісному визначенню в них тіанептину методом УФ-спектрофотометрії. Про вказане свідчили високі значення показників оптичної густини екстрактів з «холостих» дослідів, які знаходились в межах 0,09–0,12. Тому необхідним було провести додаткову очистку екстрактів з використанням тонкошарової хроматографії.

Умови проведення додаткової ТШХ-очистки екстрактів були визначені на основі попередньо проведених дослідженнях хроматографічної рухливості тіанептину з використанням двох типів хроматографічних пластин та в різних рухомих фазах (розд. 2.3). Методика проведення додаткової очистки екстрактів, що містять тіанептин, методом тонкошарової хроматографії. Аліквоту хлороформного екстракту об'ємом близько 5 мл (V_2), отриманого після екстракційного видалення ендogenous домішок, випаровували до мінімального об'єму (близько 0,05 мл) та кількісно наносили вузькою смугою на лінію старту хроматографічної пластини Сорбфіл. Окремо на лінію старту пластини, поряд з нанесеним екстрактом з біологічної рідини, на відстані близько 2 см від проби екстракту, в одну точку капіляром наносили 10 мкл

стандартного хлороформного розчину тіанептину. Поруч з нанесеними пробами також наносили смугою 5,0 мл екстракту, попередньо випареного до мінімального об'єму, отриманого в «холостому» досліді. Хроматограму послідовно спочатку розвивали у рухомій фазі хлороформ, а потім, після висушування, розвивали в рухомій фазі циклогексан–толуен–діетиламін (15:3:2). Далі чинили так, як зазначено в розд. 2.3. Значення величин R_f плям тіанептину, виділеного з модельних проб крові та сечі, а також розчину тіанептину-«свідка» співпадали та складали $0,53 \pm 0,01$. Після цього елюювали тіанептин з не проявленої зони хроматограми на тому рівні, що відповідав розташуванню плями стандартного розчину тіанептину-«свідка», знімаючи тонкий шар сорбенту розміром приблизно 4 мм $\times$ 15 мм. Після цього сорбент переносили до мікропробірки з притертою пробкою та двічі збовтували з сумішшю метанол-ацетон (1:1) по 2 мл кожного разу, а потім суспензію фільтрували через складчастий паперовий фільтр до мірної колби місткістю 5,00 мл та доводили до позначки (V_3). З використання стандартних розчинів тіанептину було встановлено, що ступінь елюювання антидепресанту сумішшю метанолу та ацетону (1:1) з шару сорбенту складає $99,4 \pm 0,5 \%$. Результати виділення тіанептину з плазми крові наведені табл. 3.2.

Таблиця 3.2

**Результати УФ-спектрофотометричного визначення тіанептину,
виділеного з плазми крові (середнє з п'яти визначень)**

Додано тіанептину до 10 мл крові, мкг	Виділено тіанептину		Метрологічні характеристики*
	мкг	%	
200	83,6	41,8	$\bar{x}=41,5$ $S^2=6,3$ $S=2,5$ $S\bar{x}=1,1$ $\Delta\bar{x}=3,1$ $\varepsilon=7,5$ $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}=41,5 \pm 3,1$
300	117,9	39,3	
500	193,5	38,7	
700	303,1	43,3	
1000	445,0	44,5	

*($P=0,95$; $t_{\alpha}=2,132$)

3.3 Виділення тіанептину з сечі

До 20 мл декількох модельних проб сечі людини додавали від 200,0 до 1000,0 мг тіанептину та суміші залишали при кімнатній температурі на 24 год. Одночасно паралельно ставили контрольні («сліпі», «холості») досліди з окремими пробами біологічної рідини.

Далі до усіх проб сечі додавали 10 % розчин кислоти хлоридної до значення рН 1–2, переносили їх до ділильної лійки, додавали 10 мл гексану та суміші збовтували 10 хв на механічному струшувачі. Після розділення двох фаз шар органічного розчинника відкидали та не досліджували в подальшому.

Операцію з відокремлення біогенних домішок з біологічної рідини шляхом їх екстракції гексаном з кислого середовища повторювали ще один раз. Після цього до біологічної рідини в ділильній лійці з метою створення іонної сили та збільшення ступеню ізолювання тіанептину з біологічної рідини добавляли 5 мл насиченого розчину амоній сульфату та підлугували суміші за допомогою 10 % розчину натрій гідроксиду до рН 6 та тричі екстрагували тіанептин хлороформом по 10 мл кожного разу.

У випадку, якщо в процесі екстракції утворювались стійкі емульсії, їх руйнували центрифугуванням на протязі 5 хв зі швидкістю 3000 об/хв. Отриманий центрифугат фільтрували через складчастий паперовий фільтр, який містив 0,2 безводного натрій сульфату та попередньо був змочений відповідним органічним екстрагентом.

Отриманий екстракт з біологічної рідини піддавали додатковій очистці шляхом сполучення методу екстракції та тонкошарової хроматографії (розд. 3.2).

Як видно з наведених в табл. 3.3 даних, за оптимізованою методикою рідинно-рідинної екстракції з сечі можливо виділити 94 % досліджуваного антидепресанту, що задовільняє вимогам до біоаналітичних методик у судовій токсикології.

Таблиця 3.3

**Результати УФ–спектрофотометричного визначення тіанептину,
виділеного з сечі (середнє з п'яти визначень)**

Додано тіанептину до 20 мл сечі, мкг	Виділено тіанептину		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
200	184,8	92,4	$\bar{x}=94,0$ $S^2=3,8$ $S=1,9$ $S\bar{x}=0,9$ $\Delta\bar{x}=2,5$ $\varepsilon=2,7$ $\bar{x}\pm\Delta\bar{x}=94,0\pm2,7$
400	376,8	94,2	
600	549,6	91,6	
800	768,8	96,1	
1000	955,0	95,5	

*(P=0,95; $t_{\alpha}=2,132$)

**3.4 Виявлення тіанептину в витяжках з крові та сечі за допомогою
методу тонкошарової хроматографії**

Безумовною перевагою методу тонкошарової хроматографії є можливість сполучати в межах однієї пластини очистку біологічних екстрактів від ендогенних домішок, а також виявлення токсиканту. У відповідності до рекомендацій Міжнародної асоціації судових токсикологів, для підвищення надійності детектування отруйної речовини при проведенні ТШХ-скринінгу слід використовувати 2–3 хроматографічні системи з низькою кореляцією відповідних величин R_f досліджуваного токсиканта. ТШХ-дослідження тіанептину в біологічних екстрактах проводили з аліквотами витяжок (0,1–0,5 мл), як наведено раніше (див. розд. 3.1), послідовно в досліджуваних нами рухомих фазах: спочатку в хлороформі (при цьому більшість домішок з фронтом рухомої фази мігрували до лінії фінішу (тіанептин залишався на лінії старту)), а потім у системі розчинників циклогексан–толуен–діетиламін (15:3:2), яка дозволяє надійно виявити тіанептин. та додатково відокремити його від співекстракційних домішок.

Отримані хроматограми висушували на повітрі та виявляли тіанептин на пластинах послідовно, спочатку в УФ-променях (зелена/жовта флюоресценція

в УФ-променях), а потім шляхом обробки хроматограми реактивом Драгендорфа в модифікації за Мун'є (спостерігали оранжеві плями тіанептину на жовтому фоні).

Значення величин R_f на пластинках для плям тіанептину, виділеного з біологічних рідин, та тіанептину-«свідка» співпадали в межах похибки експерименту. На хроматограмах «холостих» витяжок з крові та сечі плям тіанептину не виявляли.

3.5. Виявлення та кількісне визначення тіанептину в екстрактах з біологічних рідин методом УФ-спектрофотометрії

Для виявлення тіанептину в витяжках з крові та сечі методом УФ-спектрофотометрії використовували елюати з хроматограм, отримані після додаткової очистки екстрактів методом тонкошарової хроматографії (див. розд 3.1). Відповідні елюати випаровували до видалення суміші органічних розчинників (елюентів) на водяній бані при температурі 40 °С, отриманий залишок розчиняли в 4 мл хлороформу та знімали спектр поглинання в УФ-ділянці (див. розд. 2.4). Як розчини порівняння ми використовували елюати з хроматограм, отримані в «холостих» дослідках. При цьому отриманий УФ-спектр поглинання елюату з біологічних рідин (кров, сеча) співпадав з УФ-спектром стандартного хлороформного розчину тіанептину та мав максимум світлопоглинання при $\lambda_{\max}$ 275 нм.

Кількісно визначали тіанептин в екстрактах з сечі та крові методом УФ-спектрофотометрії при довжині хвилі, яка відповідала максимуму світлопоглинання досліджуваного антидепресанту. З цією метою отримані елюати випаровували до видалення органічних розчинників при температурі 40 °С, залишки розчиняли в 4,00 мл хлороформу (V_3) та вимірювали оптичну густину розчину при $\lambda_{\max}$ 275нм. Як розчини порівняння ми використовували попередньо випарені на водяній бані елюати з «холостих» дослідів з біологічними рідинами. Розраховували відповідні концентрації тіанептину за рівнянням калібрувального графіку (див. розд. 2.5).

Кількості тіанептину, виділеного з біологічних рідин (сеча, кров), або ступінь ізолювання тіанептину X визначали за співвідношенням: виділено тіанептину/внесено тіанептину (%) до біологічних рідин. Кількості тіанептину, виділеного з досліджуваних біологічних рідин (Y , мкг), розраховували за формулою:

$$Y = \frac{CV_1 V_3}{V_2}$$

де C – знайдена концентрація тіанептину в елюаті з хроматограм, мкг/мл;

V_1 – об'єм витяжки, отриманий при виділенні тіанептину з біологічної рідини після додаткової екстракційної очистки, мл;

V_2 – об'єм витяжки, що було взято для додаткової ТШХ-очистки, мл;

V_3 – об'єм елюату, отриманий після проведення додаткової ТШХ-очистки, мл;

Отримані нами результати ізолювання тіанептину з модельних проб крові та сечі наведені в табл. 3.2–3.3 (середнє з п'яти визначень). Як видно, ефективність ізолювання тіанептину з біологічних рідин – крові та сечі за допомогою розроблених нами методик становить, відповідно, $41,5 \pm 3,1\%$ та $94,0 \pm 2,7\%$, що задовільняє вимогам до біоаналітичних методів виявлення та визначення токсичних речовин в об'єктах біологічного походження.

Висновки до розділу 3

1. Вивчено умови екстрагування тіанептину з водних розчинів органічними розчинниками в залежності від рН середовища. Показано, що кращим екстрагентом тіанептину з водних розчинів при рН 5–6 є хлороформ, найменший ступінь екстракції вказаного антидепресанту спостерігається при використанні як екстрагента гексану, що зручно використовувати при очистки екстрактів з об'єктів біологічного походження від ендогенних компонентів біологічної матриці. Розроблено умови ефективної

додаткової очистки витяжок з біологічних рідин сполученням методів екстракції та ТШХ.

2. Розроблено ефективні методики ізолювання тіанептину з крові та сечі методом рідинно-рідинної екстракції з використанням методу висолювання за допомогою амоній сульфату. Показано, що ефективність ізолювання тіанептину з крові складає 41,5 %, а з сечі 94 %.

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

У магістерській роботі виконано систематичне хіміко-токсикологічне дослідження з розробки ефективних умов ізолювання тіанептину з біологічних рідин (кров, сеча) з використанням рідинно-рідинної екстракції, що включає розробку методів його виявлення за допомогою кольорових реакцій та тонкошарової хроматографії та розробку умов ідентифікації та кількісного визначення досліджуваного антидепресанту методом УФ-спектрофотометрії. Отримані результати придатні для використання при проведенні судово хімічних досліджень біологічних об'єктів на вміст тіанептину.

1. Вивчено умови виявлення тіанептину методом тонкошарової хроматографії з використанням рухомих фаз, що використовуються при проведенні загального токсикологічного скринінгу лікарських речовин. Для виявлення тіанептину запропоновано декілька рухомих фаз з низькою кореляцією величин R_f тіанептину, використання яких підвищує надійність виявлення тіанептину методом ТШХ.
2. Запропоновано ряд хромогенних реактивів для детектування тіанептину при проведенні хроматографічних досліджень в умовах проведення загального токсикологічного скринінгу з використанням методу ТШХ. Встановлено чутливість виявлення тіанептину за допомогою кольорових реакцій.
3. Вивчено умови екстракції тіанептину з водних розчинів органічними розчинниками в залежності від рН середовища. Показано, що кращим екстрагентом тіанептину з водних розчинів при рН 5–6 є хлороформ. Найменші кількості тіанептину екстрагуються гексаном при рН 1 водної фази. Опрацьовано умови додаткової очистки витяжок з крові та сечі шляхом сполученням методів екстракції та ТШХ.
4. Досліджено умови ідентифікації тіанептину методом спектрофотометрії в УФ-області спектру та показана наявність специфічного світлопоглинання розчину антидепресанту в УФ-області спектру при $\lambda_{\max}$ 275 нм, що дає

можливість використовувати метод УФ-спектрофотометрії для ідентифікації тіанептину при проведенні хіміко-токсикологічних досліджень.

5. Розроблено УФ-спектрофотометричний метод кількісного визначення тіанептину, придатний для використання при судово-токсикологічних дослідженнях біологічних об'єктів на вміст зазначеного антидепресанту. Встановлено низку валідаційних характеристик опрацьованої методики: діапазон лінійності, межа виявлення та межа кількісного визначення, правильність методики та її прецизійність на трьох концентраційних рівнях тіанептину. Розроблена методика кількісного визначення тіанептину задовільняє вимогам до методів, що використовуються в галузі судової токсикології.

6. Запропоновано ефективні методики виділення тіанептину з крові та сечі з використанням рідинно-рідинної екстракції у сполученні з висолюванням за допомогою амоній сульфату. Показано, що ефективність ізолювання тіанептину з крові складає 41,5 %, а з сечі 94 %, що задовільняє вимогам до біоаналітичних методів, що використовуються в судовій токсикології.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Tianeptine, an atypical pharmacological approach to depression / C. Alamo et al. *Rev. Psiquiatr. Salud. Ment.* 2019. Vol. 12(3). P. 170–186.
2. Nishio Y., Lindsley C. W., Bender A. M. Classics in Chemical Neuroscience: Tianeptine. *ACS Chem. Neurosci.* 2024. Vol. 15(21). P. 3863–3873.
3. Tianeptine abuse via novel, extended-release, star-shaped, drug delivery device / H. Galust et al. *Toxicol. Rep.* 2023. Vol. 11. P. 162–164.
4. The Behavioral Effects of the Antidepressant Tianeptine Require the Mu Opioid Receptor / B. A. Samuels et al. *Neuropsychopharmacol.* 2017. Vol. 42(10). P. 2052–2063.
5. Psychotropic Drugs for the Management of Chronic Pain and Itch / D. A. Belinskaia et al. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019. Vol. 12(2). P. 99.
6. Effectiveness of tianeptine in patients with major depressive disorder and substance use disorder / N. Szerman et al. *Actas Esp. Psiquiatr.* 2021. Vol. 49(4). P. 135–144.
7. Lopez-Castroman J., Jaussent I., Gorwood P., Courtet P. Activation syndrome induced by the antidepressant tianeptine and suicidal ideation: Evidence from a large depressed outpatient sample. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2020. Vol. 97. P. 109762.
8. Hargett J. L., Lowry P. F., Lee K. N. Nursing Implications for Tianeptine Use and Misuse. *J. Addict. Nurs.* 2023. Vol. 34(2). P. 158–161.
9. Springer J., Cabała W. J. Tianeptine Abuse and Dependence in Psychiatric Patients: A Review of 18 Case Reports in the Literature. *J. Psychoactive Drugs*. 2018. Vol. 50(3). P. 275–280.
10. Tianeptine, an Antidepressant with Opioid Agonist Effects: Pharmacology and Abuse Potential, a Narrative Review / A. N. Edinoff et al. *Pain Ther.* 2023. Vol. 12(5). P. 1121–1134.
11. Lauhan R., Hsu A., Alam A., Beizai K. Tianeptine Abuse and Dependence: Case Report and Literature Review. *Psychosomatics*. 2018. Vol. 59(6). P. 547–553.

12. Karim A., Ioannou C. Tianeptine Abuse Leading to an Episode of Psychosis: A Case Report and Literature Review. *J. Psychiatr. Pract.* 2020. Vol. 26(2). P. 146–148.
13. Velagapudi V., Calabrese J., Sethi R. Tianeptine as an opiate replacement in a patient on methadone treatment: A case report. *J Opioid Manag.* 2024. Vol. 20(1). P. 87–91.
14. Antidepressants for the treatment of adults with major depressive disorder in the maintenance phase: a systematic review and network meta-analysis / T. Kishi et al. *Mol. Psychiatry.* 2023. Vol. 28(1). P. 402–409.
15. Case Reports of Fatalities Involving Tianeptine in the United States / E. L. Bakota et al. *J. Anal. Toxicol.* 2018. Vol. 42(7). P. 503–509.
16. Agabio R., Trogu E., Pani P. P. Antidepressants for the treatment of people with co-occurring depression and alcohol dependence. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2018. Vol. 4(4). P. 8581.
17. Acute Toxicity From Intravenous Use of the Tricyclic Antidepressant Tianeptine / S. K. Dempsey et al. *J. Anal. Toxicol.* 2017. Vol. 41(6). P. 547–550.
18. Retrospective identification of new psychoactive substances in patient samples submitted for clinical drug analysis / M. A. B. Axelsson et al. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2022. Vol. 131(5). P. 420–434.
19. Adjunctive tianeptine treatment for bipolar disorder: A 24-week randomized, placebo-controlled, maintenance trial / M. Kauer-Sant'Anna et al. *J. Psychopharmacol.* 2019. Vol. 33(4). P. 502–510.
20. Adverse event profiles of drug-induced liver injury caused by antidepressant drugs: a disproportionality analysis / A. Jiang et al. *Ther. Adv. Drug Saf.* 2024. Vol. 15. P. 4585.
21. Boaden K., Tomlinson A., Cortese S., Cipriani A. Antidepressants in Children and Adolescents: Meta-Review of Efficacy, Tolerability and Suicidality in Acute Treatment. *A. Front Psychiatry.* 2020. Vol. 11. P. 717.

22. Tianeptine is associated with lower risk of suicidal ideation worsening during the first weeks of treatment onset compared with other antidepressants: A naturalistic study / B. Nobile et al. *J. Psychiatr. Res.* 2018. Vol. 96. P. 167–170.
23. Neurotrophin Genes and Antidepressant-Worsening Suicidal Ideation: A Prospective Case-Control Study / G. Voegeli et al. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2016. Vol. 19(11). P. 1059.
24. Polymorphisms of stress pathway genes and emergence of suicidal ideation at antidepressant treatment onset / B. Nobile et al. *Transl. Psychiatry.* 2020. Vol. 10(1). P. 320.
25. Park Y. M., Lee B. H. Treatment response in relation to subthreshold bipolarity in patients with major depressive disorder receiving antidepressant monotherapy: a post hoc data analysis (KOMDD study). *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2016. Vol. 12. P. 1221–1227.
26. Farsani A., Reyes C. Tianeptine's Obscured Withdrawal, Presentation, and Treatment. *Cureus.* 2024. Vol. 16(6). P. 62554.
27. Characteristics of tianeptine effects reported to a poison control center: a growing threat to public health / W. Rushton et al. *J. Clin. Toxicol. (Phila).* 2021. Vol. 59(2). P. 152–157.
28. Ikeri K., Anderson A., Eyal F., Whitehurst R. Neonatal Opioid Withdrawal Syndrome Following Prenatal Use of Supplements Containing Tianeptine. *Pediatrics.* 2024. Vol. 153(2). P. 2382.
29. Markovic M., Niwash D. Treatment of concurrent etizolam and tianeptine withdrawal following accidental overdose. *Ment. Health. Clin.* 2023. Vol. 12(6). P. 356–359.
30. Tianeptine-involved emergency department visits, fatal overdoses, and substance seizures in Tennessee, 2021-2023 / H. L. Hershey et. al. *Drug Alcohol. Depend. Rep.* 2024. Vol. 12. P. 100272.
31. Abdullatef O. A., Morshedy S., Khalifa Y. M., Talaat W. Spectrofluorimetric determination of tianeptine using its quenching effect on Vilazodone. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2021. Vol. 251. P. 119412.

32. Cruz Muñoz E., Termopoli V., Orlandi M., Gosetti F. Non-targeted identification of tianeptine photodegradation products in water samples by UHPLC-QTOF MS/MS. *Chemosphere*. 2024. Vol. 361. P. 142534.
33. Tatar Ulu S. Determination of tianeptine in human plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*. 2006. Vol. 834(1–2). P. 62–67.
34. Khedr A. High-Performance Liquid Chromatographic Stability Indicating Assay Method of Tianeptine Sodium with Simultaneous Fluorescence and UV Detection. *J. of Chromatogr. Sci.* 2007. Vol. 45(6). P. 305–310.

ДОДАТКИ

Міністерство охорони здоров'я України
Міністерство освіти і науки України
Національний фармацевтичний університет
Кафедра фармацевтичної хімії
Кафедра загальної хімії



СЕРТИФІКАТ №331

Цим засвідчується, що

Бендюг Н.

брав(-ла) участь у Міжнародній internet-конференції
'Modern chemistry of medicines'

25 вересня 2024 р., м. Харків, Україна

Посвідчення Державної наукової
установи «Український інститут
науково-технічної експертизи та
інформації» № 263 від 16.04.2024 р.

В. о. ректора НФаУ, проф.

Проректор з науково-педагогічної
роботи, проф.



[Handwritten signature]

Алла КОТВИЦЬКА

Інна ВЛАДИМИРОВА