

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

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: ІЗОЛЮВАННЯ ВОРТІОКСЕТИНУ З БІОЛОГІЧНОГО
МАТЕРІАЛУ ГІДРОФІЛЬНИМИ РОЗЧИННИКАМИ

Виконала: здобувачка вищої освіти групи

Фм20(4,6з)мед-01а

спеціальності: 226 Фармація, промислова фармація
освітньої програми Фармація

Софія КРИНИЦЬКА

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

Сергій БАІЮРКА

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

Сергій КОЛІСНИК

Харків – 2025 рік

АНОТАЦІЯ

Метою дослідження є розробка умов ізолювання препарату антидепресивної дії вортіоксетину з біологічного матеріалу загальноприйнятими в судовій токсикології методами шляхом настоювання досліджуваних об'єктів з гідрофільними розчинниками – підкисленою водою та підкисленим етиловим спиртом, а також розроблення методів ідентифікації та кількісного визначення зазначеного антидепресивного засобу в отриманих витягах з біологічного матеріалу з використанням кольорових експрес-тестів, методу тонкошарової хроматографії (ТШХ) та спектрофотометрії в УФ- та видимій ділянках спектру. Робота загальним об'ємом 50 сторінок, вона включає 3 розділи, висновки, 11 таблиць, 3 рисунки, 39 джерел літератури.

Ключові слова: вортіоксетин, біологічний матеріал, ізолювання, тонкошарова хроматографія, УФ-спектроскопія, екстракційна спектрофотометрія.

ANNOTATION

The aim of the study is to develop the conditions for isolation of the antidepressant medicine Vortioxetine from the biological material using generally accepted methods in forensic toxicology by infusion of the examined samples with hydrophilic solvents such as acidified water and acidified ethyl alcohol, as well as developing methods for identifying and quantifying the specified antidepressant in the extracts obtained from the biological material using color express tests, of thin-layer chromatography method (TLC) and spectrophotometry in UV and visible region of spectrum. The work has a total volume of 50 pages, it includes 3 sections, conclusions, 11 tables, 3 figures, 39 sources of literature.

Keywords: Vortioxetine, biological material, isolation, thin-layer chromatography, UV spectrophotometry, extraction spectrophotometry.

З М І С Т

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ТОКСИКОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА ТОКСИКОЛОГІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ВОРТІОКСЕТИНУ. БІОАНАЛІТИЧНІ МЕТОДИ ЙОГО ДОСЛІДЖЕННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	11
1.1 Застосування вортіоксетину в терапії депресивних порушень.....	12
1.2. Методи виявлення вортіоксетину в біологічних об'єктах.....	13
1.3. Основні фізико-хімічні властивості вортіоксетину.....	17
Висновки до розділу 1.....	18
РОЗДІЛ 2. РОЗРОБКА МЕТОДІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВОРТІОКСЕТИНУ.....	19
2.1. Матеріали та методи.....	19
2.2. Виявлення вортіоксетину за допомогою кольорових експрес реактивів.....	21
2.3. Виявлення вортіоксетину методом хроматографії в тонких шарах сорбенту.....	23
2.4. Ідентифікація вортіоксетину методом абсорбційної УФ- спектрофотометрії.....	25
2.5. Кількісне визначення вортіоксетину УФ-спектрофотометричним методом.....	27
2.6. Кількісне визначення вортіоксетину методом екстракційної- спектрофотометрії.....	30
Висновки до розділу 2.....	35
РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА ОПТИМАЛЬНИХ УМОВ ВИДІЛЕННЯ ВОРТІОКСЕТИНУ З СЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ.....	37
3.1. Дослідження умов екстракції вортіоксетину з водних розчинів органічними екстрагентами.....	37

3.2. Ізолювання вортіоксетину з біологічного матеріалу водою, підкисленою кислотою оксалатною (за А. О. Васильєвою).....	41
3.3. Ізолювання вортіоксетину з біологічного матеріалу етиловим спиртом, підкисленим кислотою оксалатною (за Стасом-Отто).....	42
3.4. Ідентифікація вортіоксетину в витягах з біологічного матеріалу методами хроматографії в тонких шарах сорбенту та кольоровими реакціями.....	46
3.5. Використання методу УФ-спектрофотометрії для виявлення та кількісного визначення вортіоксетину в витягах з біоматеріалу.....	48
Висновки до розділу 3.....	49
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ.....	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	51
ДОДАТКИ.....	56

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

LC-DAD	– Liquid Chromatography-Diode Array Detector
DL	– Detection Limit
QL	– Quantitation Limit
TIAFT	– The International Association of Forensic Toxicologists (Міжнародна асоціація судових токсикологів)
UNODC	– United Nations Office on Drugs and Crime
ВООЗ	– Всесвітня організація охорони здоров'я
PX-МС/МС	– рідинна хроматографія з тандемним мас-спектрометричним детектуванням
ТФЕ	– твердофазна екстракція
ТЦА	– трициклічні антидепресанти
ТШХ	– тонкошарова хроматографія

ВСТУП

Актуальність теми. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), депресія є основною причиною інвалідності та втрати працездатності у світі, а також найбільш поширеним психічним розладом. Протягом усього життя від депресії страждають 20% дорослого населення. За даними епідеміологічних досліджень ця хвороба вражає жінок удвічі частіше. Кожен десятий пацієнт, який приходить до лікаря з приводу інших захворювань, має депресією із усіма її проявами, і стільки ж людей мають окремі депресивні симптоми. Більше половини цих випадків залишаються невиявленими, а серед діагностованих пацієнтів лише половина отримує адекватне лікування. Депресія – це група специфічних розладів діяльності головного мозку, яка характеризується різноманітними симптомами, що відображають значні зміни психомоторних, когнітивних і емоційних процесів. Депресія являє собою один з найбільших серйозних психічних розладів.

За даними ряду міжнародних організацій, що мають відношення до охорони здоров'я, у теперішній час захворюваннями на депресією страждають близько 350 мільйонів людей у світі. Згідно даних показників Disability-adjusted life years, яка оцінює процеси глобального розповсюдження депресій, до 2030 р. ці хвороби посядуть перше місце серед основних причин непрацездатності та втрати продуктивної діяльності людини протягом життя.

Протягом останніх років Україна опинилась серед групи країн із підвищеним ризиком суїцидальної поведінки (більше двадцяти випадків самогубств на сто тисяч населення). Депресивні розлади є головною причиною близько 70 % самогубств, а суїцид, причиною якого є депресивні розлади, становить третю за поширеністю причину смертності людей віком від 10 до 24 років.

Важливе токсикологічне значення лікарських препаратів антидепресивної дії, насамперед, пов'язане з високим рівнем психічних та емоційних навантажень, які призводять до значного погіршення психічного здоров'я населення у всьому світі, і в тому числі, серйозними наслідками від прояву побічної дії сучасних антидепресантів, які досить часто супроводжують фармакотерапію зазначеними препаратами. До теперішнього часу систематичні хіміко-токсикологічні дослідження з методів визначення препаратів антидепресивної дії в біологічних об'єктах (секційний матеріал) та біорідинах, розроблені не повністю, а методи визначення тимолептиків, наведені в наукових публікаціях, здебільше рекомендовані для виконання досліджень з вивчення біотрансформації та особливостей екскреції лікарських речовин, заснованих на опрацюванні методик визначення методами газової та рідинної хроматографії з різними типами детектування. Ці методи передбачають використання коштовного інструментального обладнання та високовартісних матеріалів.

Вортіоксетин – новітній антидепресивний препарат, що належить до оригінальної групи психотропів, структурно відмінних від усіх існуючих тимолептиків – бісарилсульфаніламінів. Вортіоксетин застосовується для терапії депресивного синдрому дорослих.

У світі зареєстровано багаточисельні випадки індивідуальних та комбінованих інтоксикацій вортіоксетином. Препарат є важливим у токсикологічному відношенні, але методи його визначення в біологічних об'єктах практично не розроблені.

Мета дослідження. Метою даного дослідження є встановлення ефективності виділення вортіоксетину з біологічного матеріалу настоюванням шляхом настоювання біологічного об'єкту з гідрофільними розчинниками – підкисленим етиловим спиртом та підкисленою водою, з наступною розробкою та опрацюванням умов його детектування та кількісного визначення в біологічних екстрактах хімічним методом

(кольорові експрес-реакції), методами тонкошарової хроматографії та екстракційної спектрофотометрії в видимій ділянці спектру.

Завдання дослідження. Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити такі завдання:

1. провести літературний пошук та узагальнити дані стосовно токсикологічного значення вортіоксетину, проаналізувати випадки отруєнь вказаним антидепресантом та методів його визначення в об'єктах біологічного походження;
2. дослідити взаємодію вортіоксетину з хромогенними реактивами, що використовуються при виконанні систематичного скринінгу на основі методу тонкошарової хроматографії для основних груп психоактивних та сильнодіючих речовин;
3. розробити чутливі методики ідентифікації та кількісного визначення вортіоксетину методами спектрофотометрії в УФ-ділянці спектру та екстракційної спектрофотометрії, дослідити умови їх використання для дослідження екстрактів з біологічних матриць на вміст зазначеного антидепресанту;
4. вивчити умови використання рідинно-рідинної екстракції для очистки витягів з біологічного матеріалу, що містять вортіоксетин, на основі дослідження відповідних умов екстрагування зазначеного антидепресанту з водних розчинів при різних значеннях рН середовища;
5. встановити ефективну розрізняючу спроможність загальноприйнятих в аналітичній токсикології методів ізолювання лікарських речовин з секційного матеріалу за допомогою екстракції гідрофільними розчинниками – підкисленим етиловим спиртом (за методом Стаса-Отто) та підкисленою водою (за методом Васильєвої) по відношенню до вортіоксетину.

Об'єкт дослідження. Систематичний хіміко-токсикологічний аналіз нового лікарського препарату антидепресивної дії вортіоксетину.

Предмет дослідження: розробка етапів пробопідготовки секційного матеріалу при проведенні спрямованого хіміко-токсикологічного дослідження на вміст в ньому вортіоксетину.

Методи дослідження. Метод хімічних реакцій з кольоровими реактивами, метод тонкошарової хроматографії, метод УФ-спектроскопії, екстракційно-фотометричний метод у видимій ділянці.

Практичне значення отриманих результатів. В роботі запропоновано умови проведення пробопідготовки модельних біологічних об'єктів для проведення їх хіміко-токсикологічного дослідження на вміст вортіоксетину, досліджено умови виявлення та кількісного визначення зазначеного препарату в отриманих екстрактах з секційного матеріалу за допомогою чутливих та доступних методів аналізу. Отримані результати можуть бути використані при проведенні судово-токсикологічних досліджень об'єктів біологічного походження на вміст вортіоксетину.

Елементи наукових досліджень. Вперше розроблено методи хіміко-токсикологічного дослідження нового антидепресивного лікарського препарату вортіоксетину з використанням ТШХ та кольорових експрес-тестів у рухомих фазах, рекомендованих міжнародною асоціацією судових токсикологів для систематичного скринінгу сильнодіючих препаратів. Розроблено методи кількісного визначення вортіоксетину методами УФ-спектрофотометрії та екстракційної фотометрії у видимій ділянці на основні реакції з метиловим оранжевим. Вперше встановлено ступінь ізолювання вортіоксетину з водних розчинів деякими органічними розчинниками в залежності від рН середовища. На основі цих даних розроблено ефективні методики ізолювання вортіоксетину з біологічних рідин; розроблено оптимальні умови очистки біологічних екстрактів від співекстрактивних речовин з використанням методу рідинної екстракції.

Апробація результатів дослідження і публікації. Результати, що отримані при виконанні досліджень, було представлено в збірнику тез: Криницька С. О., Баюрка С. В. Хіміко-токсикологічний аналіз

вортіоксетину в біологічному матеріалі. *Modern chemistry of medicines: матеріали Міжнар. Internet-конф.*, м. Харків, 25 верес. 2024 р. Харків: НФаУ. С. 141.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи. Кваліфікаційна магістерська робота складається зі вступної частини, огляду даних літературних джерел, двох розділів з даними експериментальних досліджень, загальних висновків, переліку використаних літературних джерел. Роботу викладено на 50 сторінках, вона включає 11 таблиць, 3 рисунки та містить 39 літературних джерел.

РОЗДІЛ 1
ТОКСИКОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА ТОКСИКОЛОГІЧНЕ
ЗНАЧЕННЯ ВОРТІОКСЕТИНУ. БІОАНАЛІТИЧНІ МЕТОДИ ЙОГО
ДОСЛІДЖЕННЯ
(ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Сучасні антидепресанти є важливою у хіміко-токсикологічне відношенні групою лікарських засобів, що обумовлено їх широким використанням в медицині при погіршенні психічного здоров'я людей та негативними наслідками від прояву в певних умовах побічних ефектів від застосування тимолептиків [1–2]. Серед основних причин інтоксикацій антидепресантами є передозування через резистентність захворювань на депресію, випадки самолікування, неадекватне вживання антидепресантів на фоні інших психотропів та алкоголю. Методи аналітичної діагностики отруєнь антидепресантами розроблені недостатньо. Існуючі біоаналітичні методи їх визначення в плазмі крові, біосередовищах організму та біологічному матеріалі здебільшою мірою рекомендовані для проведення досліджень з токсикокінетики та процесів біотрансформації антидепресантів в умовах живого організму. Описані в літературі методики визначення антидепресантів засновані на використанні інструментальних хроматографічних методів з різноманітними типами детектування, які відрізняються високою чутливістю та селективністю аналізу, але вони являються малодоступними для вітчизняних фахівців з судово-токсикологічних досліджень. Прикладне значення також має дослідження ефективності виділення препаратів антидепресивної дії з секційного матеріалу гідрофільними розчинниками у відповідності до загальноприйнятих методів їх ізолювання та з урахуванням індивідуальних ліпофільних властивостей вказаних речовин. Для цілого ряду антидепресантів нових генерацій дослідження зі встановлення ступеню їх

ізолювання загальноприйнятими в аналітичній токсикології методами, заснованими на використанні гідрофільних розчинників, не проводились.

1.1 Застосування вортіоксетину в терапії депресивних порушень

На початку нинішнього століття датської фармацевтична компанія Lundbeck розпочала спрямований пошук нових речовин, які проявляють здатність одночасно інгібувати зворотній нейрональний захват серотоніну та впливати на 5HT_{2C}-рецепторні структури. Результатом проведених скринінгових досліджень арилпіперазинів було отримання сполуки, що володіла оптимальним співвідношенням високої нейрональної хімічної активності по відношенню до переносника (білка) серотоніну, та рецепторів 5HT_{1A}- і 5HT₃. Цю сполуку пізніше було названо вортіоксетін.

Вортіоксетину гідробромід це новий мультимодальний лікарський препарат для фармакокорекції депресивних розладів та депресивних станів [1–2]. Зважаючи на значний вплив вортіоксетину на ряд інших медіаторних систем організму, його було охарактеризовано як «мультимодальний нейротрансмітерний посилювач» [3–4]. Головним симптомом депресивних захворювань є когнітивні порушення, пов'язані зі втратою концентрації пацієнтами уваги, значним уповільненням мисленням, складністю у відтворенні набутої інформації. Останніми роками когнітивному аспекту депресивних порушень приділяють важливе значення. Доведено, що фармакокорекція когнітивних порушень набуває першочергової ролі для стабілізації звичайного функціонування осіб за умов досягнення ремісії хвороби, зокрема для стабільного відновлення порушеної захворюванням працездатності [5]. За результатами досліджень, проведених останнім часом, було визначено ефективні підходи стосовно лікування одночасно когнітивних функцій та емоційних розладів. При цьому, як свідчить практика, найбільшу ефективність для лікування хворих з депресивними патологіями та когнітивними порушеннями мають препарати антидепресивної дії саме з мультимодальними механізмами фармакологічної дії [3, 6–7]. Зважаючи на зазначене, серйозні сподівання

щодо практичного застосування сьогодні пов'язані з використанням препарату нової генерації антидепресантів з вираженою мультимодальною дією «Брінтеллікс»[8].

Повною мірою механізм фармакологічної дії вортіоксетину не з'ясований. Встановлено, що вортіоксетин значно модулює серотонінергічну активність центральної нервової системи через процес блокування зворотного захвату серотоніну [9–11]. Механізм дії вортіоксетину реалізується за п'ятьма модальностями: 1) процес інгібування зворотнього захоплення медіатору серотоніну, 2) активне блокування іонних каналів рецептора 5-HT₃, 3) виражений антагонізм до 5-HT_{1A} рецепторів, 4) супутній частковий агонізм до 5-HT_{1B} рецептора, 5) виражений антагонізм до рецепторів 5-HT₇ та 5-HT_{1D} [2, 4, 5, 12–14]. Експериментально доведено, що процес захвату транспортера серотоніну за допомогою добових доз вортіоксетину складав 50 % для дози 5 мг, 65 % для дози 10 мг та понад 80 % для дози препарату 20 мг. Вортіоксетин клінічно достовірно довів високу антидепресивну активність при ступеню захоплення 5-HT транспортера на 50 % [12].

Встановлено, що вортіоксетин значною мірою усуває вплив факторів стресу на тривалу потенціацію гіпокампу, посилюючи проліферацію його клітин, він покращує короточасну пам'ять, через частковий антагонізм до рецептора 5-HT₃ [13–18]. Такі результати дають певні підстави вважати, що вортіоксетин має позитивний вплив на когнітивні функції хворих на депресію [7, 10, 12, 19–25].

1.2 Методи виявлення вортіоксетину в біологічних об'єктах

Огляд доступних джерел літератури показав, що для доказу присутності вортіоксетину в біологічних рідинах та в органах і тканинах людини та лабораторних тварин запропоновано використання високоселективних інструментальних методів газо-рідинної та вискоефективної рідинної хроматографії [26–32]. Авторами запропоновано та експресну, селективну та високочутливу методику

визначення вортіоксетину в плазмі лабораторних щурів методом ультрависокоєфективної рідинної хроматографії з подвійним мас-спектрометричним детектуванням [33]. Метод також був застосований для фармакокінетичних досліджень, пов'язаних з одночасним виявленням вортіоксетину та продуктів його біотрансформації в плазмі крові щурів. Пробопідготовку біологічної рідини проводили шляхом попереднього осадження білків плазми, для дослідження було використано лише 0,1 мл біорідини при відповідній високій чутливості визначення нативної речовини та метаболітів вортіоксетину.

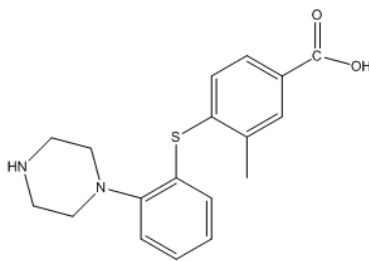
В іншій роботі наведено методику визначення вортіоксетину в зразках сироватки та в слині людини методом високоєфективної рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією. Попередньо проводили концентрування досліджуваного антидепресанту з плазми методом твердофазної екстракції (ТФЕ). З метою проведення кількісного аналізу вортіоксетину в слині або сироватці людини було запропоновано метод ультрависокоєфективної рідинної хроматографії з діодно-матричним та мас-спектрометричними типами детектування. Вказані методи відрізняються високою чутливістю визначення та селективністю по відношенню до ендогенних співекстрактивних речовин. Детермінацію вортіоксетину та його метаболітів виконували на хроматографічній колонці Synergi Polar (ізократичний режим), рухома фаза містила 70 % та 20 % метанолу, ацетатний буфер (pH 3,5), 10% води бідистильованої та 0,025 М діетиламіну.

Авторами опрацьовано чутливі та надійні біоаналітичні методи кількісного визначення антидепресанту вортіоксетину разом з його основним метаболітом в плазмі крові людини. Перший метод базується на ізократичній високоєфективній рідинній хроматографії з подвійним мас-спектрометричним детектуванням, а інший метод визначення вортіоксетину передбачає визначення у зворотньо-фазному варіанті ультрависокоєфективної рідинної хроматографії з тандемною мас-

спектрометрією у поєднанні з попереднім елюювання білкових домішок у зразках екстрактів [35].

Для виявлення домішок та напівпродуктів у субстанції вортіоксетину запропоновано методи високоефективної рідинної хроматографії (зворотньо-фазні варіанти) та метод ультрависокоефективної рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням (HILIC-MS) для детектування генотоксичних домішок під час синтезу зазначеного антидепресанту. В іншій роботі для стандартизації та кількісного визначення вортіоксетину в лікарських формах авторами розроблено метод рідинної хроматографії з діодно-матричним типом детектування (LC-DAD) та метод ультрависокоефективної рідинної хроматографії з МС/МС детектуванням [36]. Також в іншій роботі автором показано, що присутність в сечі людини вортіоксетину може стати причиною хибнопозитивних результатів стосовно наявності у вказаній біологічній рідині метадону [37]. Для визначення вортіоксетину авторами запропоновано стабільний та зелений наноккомпозит Au@g-C(3) N(4) як селективний електрохімічний сенсор для визначення вортіоксетину в об'єктах різного походження. Електрохімічну поведінку вортіоксетину на розробленому електроді досліджено методом циклічної вольтамперометрії [38].

В організмі людини вортіоксетин активно метаболізує в печінці здебільшого шляхом його окиснення системою Цитохрому Р 450 з подальшим утворенням кон'югатів з глюкуроновою кислотою. Авторами застосовано метод високоефективної рідинної хроматографії з діодно-матричним типом детектування для дослідження крові людини на вміст метаболітів вортіоксетину. При цьому було ідентифіковано декілька метаболітів зазначеного антидепресанту. Було ідентифіковано основний метаболіт вортіоксетину (похідне карбонової кислоти) – (3-метил-4-(2-піперазин-1-іл-фенілсульфаніл)-бензенова кислота). Вказаний метаболіт є неактивним у фармакологічному відношенні.



3-метил-4-(2-піперазин-1-іл-фенілсульфаніл)-бензенова кислота

Вортіоксетин останнім часом призначають для терапії великого депресивного розладу та з метою запобігання його рецидиву у дорослих пацієнтів [1, 10, 15, 18]. Для пацієнтів середньої вікової категорії рекомендована починати лікування з добової доз 10 мг. При цьому, зазначена доза може бути зміненою в залежності від індивідуальної чутливості до препарату, зазвичай в межах від 20 мг до 50 мг протягом доби. Проведені клінічні дослідження вортіоксетину показали його досить добру переносимість дорослими здоровими добровольцями та більшістю літніх пацієнтів з ознаками депресії. Побічні реакції, що спостерігались при цьому, були або легкого, або помірного ступеню важкості та, в основному, спостерігались на протязі перших тижнів лікування й не потребували відміни препарату. Чи не єдиною побічною реакцією, яку регулярно виявляли під час таких досліджень, була легкого або помірного ступеню важкості нудота, що досягала статистично значущих результатів.

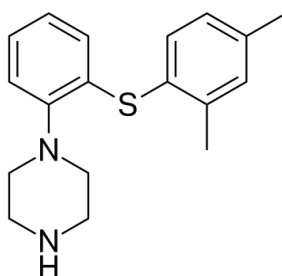
Вортіоксетин суттєво підвищує ризик виникнення «серотонінового синдрому», при цьому особливо небезпечними є його комбінації із звіробоєм та деякими іншими серотонінергічними препаратами, які чинять вплив на процеси обміну серотоніну. У випадку комбінацій вортіоксетину з бупропіоном та тимолептиками інших груп, з антипсихотичними препаратами (фенотіазини, бутирофенони) та трамалом можливе значне зниження порогів судомної активності хворого. Комбінації вортіоксетину з аспірином та іншими нестероїдними протизапальними засобами загрожують ризику розвитку шлункової кровотечі. У випадку

передозувань вортіоксетином препарат здатен викликати серйозну побічну дію. Відмічено, що одноразове вживання вказаного антидепресанту в дозі від 40 до 75 мг протягом доби викликає запаморочення, нудоту, свербіж шкірних покривів, сильну діарею, гіперемію шкіри та іноді сонливість.

Біодоступність вортіоксетину становить 75%, середнє значенням встановлення максимуму його концентрації в крові людини досягається за 7-8 год. Період напіввиведення препарату дорівнює близько 66 год. Вортіоксетин активно зв'язується з білками плазми (до 96–99 %).

1.3 Основні фізико-хімічні властивості вортіоксетину гідроброміду

Вортіоксетин (Брінтеллікс) – (1-[2-(2,4-диметилфенілсульфаніл)-феніл]піперазину).



В медичній практиці використовується вортіоксетину гідробромід. Молекулярна маса основи вортіоксетину складає 298,45 г/моль, для вортіоксетину гідроброміду 379,36 мг/моль. Гідробромід вортіоксетину це кристалічний порошок блідо-бежевого кольору, не є гігроскопічним. Вортіоксетин розчиняється в диметилсульфоксиді, метиловому та етиловому спирті, погано розчиняється у воді та у водних розчинах в межах величин рН від 2 до 8. Препарат проявляє основні властивості, величини рКа становлять 9,1 (основа) та 3,0 (сіль).

Зафіксовано випадок умисного вживання 250 мг вортіоксетину. Ретельне медичне спостереження за показниками життєдіяльності засвідчило, що вони знаходились в межах норми. В опублікованому дослідженні відображено дослідження зі встановлення токсичності разової

дози вортіоксетину по відношенню до лабораторних щурів та мишей. З'ясовано, що органами-мішенями для вказаного антидепресанту були жовчний міхур та печінка (миші, щури), а також нирки (щури, особливо чоловічої статі). Наочно доведено, що прояв токсичності вортіоксетину обумовлений процесом відкладанням кристалічних продуктів у жовчних протоках і ниркових каналцях, що викликало запалення тканин нирок. Зазначені кристалічні конгломерати були ідентифіковані як продукти метаболічних перетворень вортіоксетину (глюкуроніди).

Висновок до розділу 1

Вортіоксетин – препарат антидепресивної дії нової генерації, який дуже широко використовується для фармакологічної корекції багатьох депресивних порушень та захворювань. Препарат має серйозні побічні ефекти та за певних умов може викликати важкі інтоксикації, а значить, ставати об'єктом токсикологічних досліджень. Методи хіміко-токсикологічного аналізу вортіоксетину в біологічних об'єктах з використанням простих, доступних та чутливих методів аналізу, що застосовуються в сучасних реаліях стану біоаналітичних досліджень в нашій країні, до теперішнього часу практично не розроблені.

РОЗДІЛ 2

РОЗРОБКА МЕТОДІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВОРТІОКСЕТИНУ

При розробці методів виявлення та кількісного визначення вортіоксетину нами було використано тонкошарову хроматографію (ТШХ), реакції з кольоровими експрес-реактивами, метод УФ-спектрофотометрії та екстракційної спектрофотометрії в видимій ділянці спектру.

2.1 Матеріали та методи

При проведенні досліджень в роботі було використано субстанцію вортіоксетину гідроброміду, виділену з таблеток «Брінтеллікс» (14 шт. по 10 мг, виробництва «Лундбек», Данія).

Виділення вортіоксетину з таблеток. 14 таблеток «Брінтеллікс» переносили до скляного стакану та додавали 20 мл метилового спирту. Коли оболонки набухали, їх знімали скальпелем, очищені таблетки трохи підсушували та вносили до фарфорової ступки. Суміш ретельно розтирали з 50 мл 96 % етилового спирту, а після цього вміст ступки обережно фільтрували крізь паперовий складчастий фільтр («жовта смуга»), переносячи фільтрат до випаровувальної чашки. Вміст чашки повільно випаровували на водяній бані, не нагріваючи розчин вище за 40 °С, до повного видалення органічного розчинника. Отриманий після цього висушений залишок ретельно розтирали в цій же чашці при поступовому додаванні до нього 15 мл діетилового етеру. Суміш, яку отримано таким чином, профільтровували крізь паперовий складчастий фільтр, попередньо змочений етером. Етерний шар відкидали та не досліджували в подальшому, а вологий залишок на фільтрі висушували при кімнатній температурі та зважували на торсійних вагах ВТ-500 (маса субстанції становила близько 120 мг).

Усі використані нами в роботі органічні розчинники (Sigma-Aldrich, USA) відповідали кваліфікації не нижче «ЧДА»: хлороформ, метиловий спирт, ацетон, етиловий спирт 96%, *n*-бутанол, толуен, етиловий естер ацетатної кислоти, діетиламін, циклогексан, бензен, діетиламін, діоксан.

Реактиви кваліфікації «ЧДА»: розчин амоній гідроксид 25 %, амоній ванадат, натрій нітрит, амоній молібдат, кислота фосфатна (85 %), кислота нітратна (96-98 %), кислота хлоридна (37 %), кислота сульфатна (96,2 %), кислота перхлоратна (70 %), кислота ацетатна (98,5%).

Хроматографічні пластини:

Скляні пластини (Естонія) (КСКГ, фракція 5 мкм, шар 130 мкм, 10x10 см) (I);

Сорбфіл (СГ, ПЕТФ, фракція 8 мкм, шар 100 мкм, 10x10 см) (II);

Silufol (СКГ, фольга, з. р. крохмаль, 10x10 см) (III);

Армсорб (Вірменія) (СКГ, фракція 5 мкм, шар 100 мкм) (IV);

Merck (Німеччина) (Gel silica F₂₅₄, 10x20 см) (V).

Активування хроматографічних пластин. Нами попередньо проведено звільнення пластин від домішок, що сорбувались, та видалення зв'язаної води шляхом активації пластин. З цією метою кожену пластину двічі елюювали хлороформом, а після зазначеного їх активували шляхом нагрівання в сушильній шафі на протязі 30 хв при 130 °С (пластини з шаром силікагелю).

Ультрафіолетовий випромінювач 254/365 для детектування флюоресцуючих речовин на хроматографічних пластинах в УФ-світлі (довжини хвиль 254 та 365) нм.

Колби мірні місткістю 5,00; 10,00; 50,00 та 100,00 мл.

Спектрофотометр СФ-46 (робочий діапазон 190-1100 нм).

Хромогенні реактиви:

1. Реактив Драгендорфа. До 10 мл кислоти ацетатної концентрованої поступово додавали 0,85 г нітрату бісмуту основного та 40 мл дистильованої води. Отриману суміш речовин додавали до розчину, який

містив 8 г калій йодиду в 20 мл бідистильованої води. Перед обробкою хроматограм відбирали 1 мл вказаного розчину та змішували його з 2 мл кислоти ацетатної безводної та додавали до нього 10 мл води.

2. Реактив Манделіна. 0,02 г амоній ванадату розчиняли в 4 мл кислоти сульфатної концентрованої. Реактив повинно використовувати свіжоприготовленим.

3. Реактив Маркі. Змішували одну краплю формаліну з 1 мл кислоти сульфатної. Реактив повинно використовувати свіжоприготовленим.

4. Реактив Фреде. До дрібнорозтертого у фарфоровій ступці порошку амоній молібдату невеликими порціями додавали концентровану сульфатну кислоту та ретельно збовтували суміш. Насичену рідку фазу зливали. Реактив повинно використовувати свіжоприготовленим.

5. Реактив Ердмана. Змішували 1 мл концентрованої нітратної кислоти з 30 мл концентрованої сульфатної кислоти та ретельно перемішували.

8. Реактив Лібермана. До 10 мл концентрованої сульфатної кислоти додавали 1 г ретельно розтертого в фарфоровій ступці натрій нітриту, суміш перемішували. Реактив повинно використовувати свіжоприготовленим.

2.2 Виявлення вортіоксетину за допомогою кольорових експрес-реактивів

З метою проведення експрес-скрінінгу вортіоксетину ми дослідили взаємодію вказаного препарату з рядом хромогенних реактивів, що рекомендовані Комітетом з проведення систематичного токсикологічного аналізу при Міжнародній асоціації судових токсикологів для опрацювання загального скрінінгу з використанням тонкошарової хроматографії. Нами встановлено забарвлення продуктів взаємодії вортіоксетину із скрінінговими хромогенними реактивами для стандартного розчину антидепресанту в етиловому спирті (1 мг/мл препарату).

Методика виконання експрес-реакцій з хромогенними реактивами. По 10 мкл стандартного розчину вортіоксетину в етиловому спирті за допомогою попередньо прокаліброваного скляного капіляру наносили до однієї точки на хроматографічну пластину, а потім до них додавали відповідні хромогенні реактиви, відмічаючи появу забарвлення.

З метою встановлення чутливості хромогенних реактивів по відношенню до вортіоксетину проби робочого стандартного розчину препарату об'ємом 0,10-25 мкл наносили з використанням каліброваного капіляру на хроматографічні пластини (при цьому отримували плями з вмістом вортіоксетину від 1,0 до 25,0 мкг). Валідацію величини межі виявлення Detection Limit (DL) проводили у відповідності до рекомендацій United Nations Office on Drugs and Crimes (Управління Організації Об'єднаних Націй з наркотиків та злочинності). З цією метою ми досліджували по п'ять проб робочого стандартного розчину досліджуваного антидепресанту із вмістом від $1,25 \times DL$ до $2,0 \times DL$. Загальна кількість помилково-негативних результати становила не більше, ніж один з п'яти проведених дослідів (відносне стандартне відхилення $RSD \leq 20\%$). Результати виявлення вортіоксетину з хромогенними реактивами та їх DL (чутливість), мкг) наведені в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Результати виявлення вортіоксетину з хромогенними реактивами

Реактив	Забарвлення, (DL, мкг в пробі)
1	2
Кислота сульфатна концентрована	Оранжеве, змінюється на бурокоричневе (20,0)
Кислота хлоридна концентрована	—
Нітратна кислота концентрована	Жовте (5,0)
Кислота фосфатна концентрована	—

Продовж. табл. 2.1

1	2
Фреде	Жовте, змінюється на зелене, потім на синє (3,0)
Маркі	—
Манделіна	Зелене, що переходить на синє, потім на коричневе (2,0)
Ердмана	—
Лібермана	Коричневе, переходить на вишньове, потім на зелене (2,0)

З наведених у табл. 2.1 даних видно, що найбільш чутливими кольоровими експрес-реактивами для виявлення вортіоксетину є реактиви: Манделіна та Лібермана, чутливість становить 2,0 мкг препарату в пробі.

2.3 Виявлення вортіоксетину методом хроматографії в тонких шарах сорбенту

Виконання аналітичних досліджень при судово-хімічних аналізах пов'язано, серед іншого, із застосуванням методу тонкошарової хроматографії, яка є ефективним та експресним методом виявлення отруйних речовин в судовій токсикології. Метод тонкошарової хроматографії відноситься до варіанту площинної хроматографії, в якому розділення компонентів зумовлено процесом переносу рухомої фази (системи рухомих розчинників) вздовж шару нерухомої фази, закріпленого на інертному носії, з різною швидкістю у відповідності до коефіцієнтів розподілу досліджуваних компонентів поміж двома фазами.

Нами досліджено хроматографічну рухливість вортіоксетину в рухомих фазах, що використовуються при проведенні систематичного токсикологічного скринінгу лікарських речовин та рекомендовані ТІАФТ, а також в деяких універсальних рухомих фазах, що використовуються у вітчизняній практиці проведення біоаналітичних досліджень.

Для виявлення вортіоксетину методом тонкошарової хроматографії на лінію старту пластини для хроматографії на відстані 1,5 см від кожного

краю за допомогою попередньо прокаліброваного (за об'ємом) скляного капіляру до однієї точки наносили по 5–20 мкл досліджуваного стандартного розчину вортиоксетину. Хроматографічні пластини різних типів з нанесеними пробами переносили до скляних хроматографічних камер об'ємом 1000 см³, до яких було додано по 30 мл відповідних рухомих фаз. Довжина шляху пробігу рухомих розчинників від ліній «старту» до ліній «фінішу» становила 8–10 см. Отримані після розвитку хроматограми висушували на повітрі, а потім детектували плями вортиоксетину за допомогою їх опромінення УФ-світлом. При використанні світлофільтру з 254 нм спостерігали інтенсивну фіолетову флюоресценцію. Після цього пластини також проявляли, обробляючи їх за реактивом Драгендорфа у модифікації Мун'є, відмічаючи появу оранжевих плям вортиоксетину на жовтому фоні пластини.

Результати, отримані в процесі дослідження хроматографічної рухливості вортиоксетину в обраних нами рухомих фазах представлені в табл. 2.2. Процес визначення значень величин R_f вортиоксетину для кожної з рухомих фаз та типів хроматографічних пластин було проведено з опрацюванням п'яти дослідів.

Таблиця 2.2

Значення величин R_f вортиоксетину в різних рухомих фазах

Значення R_f					
Системи рухомих розчинників (рекомендовані TIAFT)	Тип пластини*				
	I	II	III	IV	V
1	2	3	4	5	6
Хлороформ–ацетон (80:20)	0	0	0	0	0
Етилацетат	0	0	0	0	0
Хлороформ–метанол (90:10)	0,78	0,11	0,01	0,06	0
Етилацетат–метанол–25% розчин амоній гідроксиду (85:10:5)	0,85	0,64	0,40	0,49	0,35

Продовж. табл. 2.2

1	2	3	4	5	6
Метанол	0,41	0,22	0,17	0,31	0,16
Метанол– <i>n</i> -бутанол (3:2)	0,14	0,02	0,10	0,38	0,12
Метанол–25% розчин амоній гідроксиду (100:1,5)	0,71	0,50	0,48	0,54	0,42
Циклогексан–толуен–діетиламін (15:3:2)	0,18	0,20	0,25	0,20	0,16
Ацетон	0	0	0	0	0
Системи рухомих розчинників (застосовують у ТШХ-скринінгу в судовій токсикології)	Тип пластини*				
	I	II	III	IV	V
Толуен–ацетон–етанол–25% розчин амоній гідроксиду (45:45:7,5:2,5)	0,52	0,47	0,53	0,62	0,41
Хлороформ–гексан–етанол (1:1:1)	0,31	0,22	0,37	0,40	0,46
Етилацетат–ацетон–25% розчин амоній гідроксиду (50:45:5)	0,57	0,41	0,50	0,56	0,44

*Примітки: I – Скляні пластини ВЕТШХ; II – Пластини Сорбфіл; III – Пластини Силуфол; IV – Пластини Армсорб; V – Пластини Мерск.

З наведених у табл. 2.2 даних видно, що при дослідженні хроматографічної рухливості вортіоксетину в обраних нами рухомих фазах низьку кореляцію значень величин R_f мали системи: етилацетат–метанол–25 % розчин амоній гідроксиду (85:10:5) (з R_f 0,35–0,85) та метанол–25 % розчин амоній гідроксиду (100:1,5) (з R_f 0,45–0,71).

2.4. Ідентифікація вортіоксетину методом абсорбційної УФ-спектрофотометрії

Електронна абсорбційна спектроскопія включає спектрофотометрію в УФ- та видимій ділянках спектру та є широко впровадженою до практики судово-токсикологічних досліджень як метод виявлення та

кількісного визначення досліджуваних речовин та є одним з найбільш доступних методів детектування токсикантів.

В роботі ми використовували метод УФ-спектрофотометрії для виявлення вортіоксетину у витягах з біологічного матеріалу з біологічного матеріалу та для визначення кількісного вмісту вказаного антидепресанту в отриманих екстрактах.

Методика УФ-спектроскопічного визначення вортіоксетину в модельних стандартних розчинах. Для зняття спектру поглинання антидепресанту ми готували його робочий стандартний розчин в метиловому спирті з концентрацією 1×10^{-4} моль/л. Брали точну наважку вортіоксетину гідроброміду (0,00500 г) та переносили її до мірної колби об'ємом 100,00 мл і доводили до позначки вказаним розчинником. Спектр світлопоглинання досліджуваного розчину вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 (діапазон 190-380 нм) в кюветі з товщиною шару поглинання 10 мм (розчин порівняння метанол).

Спостерігали максимум світлопоглинання для досліджуваного розчину вортіоксетину в метанолі при довжині хвилі 232 нм ($A_1^{1\text{cm}}=289$, $\epsilon=9011$).

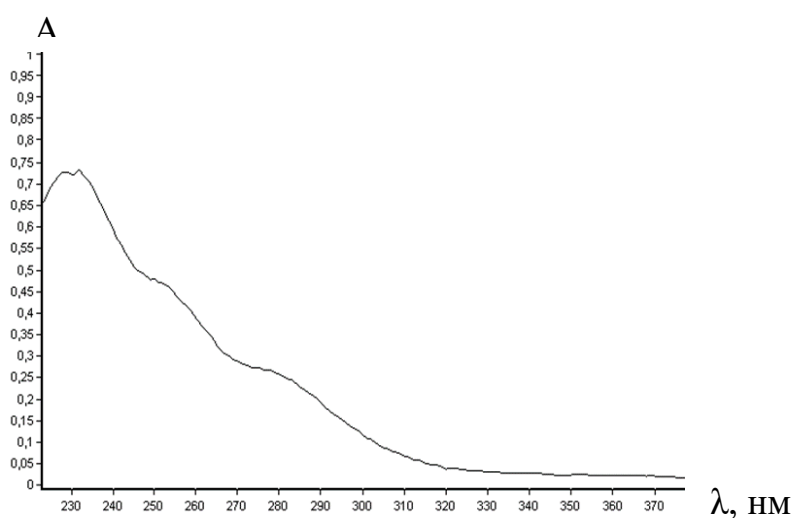


Рис. 2.1. УФ-спектр розчину вортіоксетину в метанолі ($C = 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л)

2.5 Кількісне визначення вортіоксетину УФ-спектрофотометричним методом

При проведенні УФ-спектрофотометричного визначення вортіоксетину в екстрактах з біологічного матеріалу їх піддавали додатковій ретельній очистці від ендогенних домішок методами екстракції та ТШХ. Кількісне визначення вортіоксетину в розчинах виконували за довжиною хвилі світлопоглинання λ_{max} 232 нм. Нами було розраховано наступні валідаційні параметри методики: лінійність, межа виявлення (Detection Limit (DL)), межа кількісного визначення (Quantification Limit (QL)), правильність на протязі одного дня (Intra day), прецизійність. Валідацію методики кількісного визначення виконували у відповідності до тих вимог, які пред'являються до методик з метою їх використання в галузі судової токсикології.

Побудова калібрувального графіку для кількісного визначення вортіоксетину в розчинах. Попередньо готували стандартний розчин (СР) вортіоксетину шляхом розчинення в метанолі 0,00500 г (точна наважка) субстанції препарату в мірній колбі об'ємом 100,00 мл (концентрація вортіоксетину 50 мкг/мл). Для отримання робочих стандартних розчинів вортіоксетину до мірних колб об'ємом 10,00 мл вносили, відповідно, по 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00 та 9,00 мл СР та доводили вміст колби до позначки вказаним розчинником (метанол). Отримували РСР 1–9 із концентрацією вортіоксетину 5,00; 10,00; 15,00; 20,00; 25,00; 30,00; 35,00; 40,00 та 45,00 мкг/мл) та вимірювали їх світлопоглинання при λ_{max} 232 нм. Кожен з наведених РСР готували тричі та вимірювали його оптичну густину.

Отримані значення величин світлопоглинання в УФ-ділянці спектру для 9 РСР досліджуваного антидепресанту ($m=9$; $n=3$) нами було оброблено за методом лінійної регресії, загальний вигляд якої відповідає рівнянню: $y = b \times x + a$. Після відповідної перевірки значущості параметру a в отриманому рівнянні за критерієм Фішера було зроблено висновок

щодо неможливості переходу до рівняння виду: $y = b' \times x$. Таким чином, отриманий калібрувальний графік описувався наступним рівнянням: $y = 0,0168 \times x + 0,027$ (рис. 2.2).

Метрологічні характеристики калібрувального графіку для кількісного визначення вортіоксетину УФ-спектрофотометричним методом наведено в табл. 2.3.

Лінійність (діапазон лінійності) методики. Розроблена методика кількісного визначення вортіоксетину методом УФ-спектрофотометрії лінійна в діапазоні концентрацій досліджуваного препарату від 5,0 до 50,0 мкг/мл.

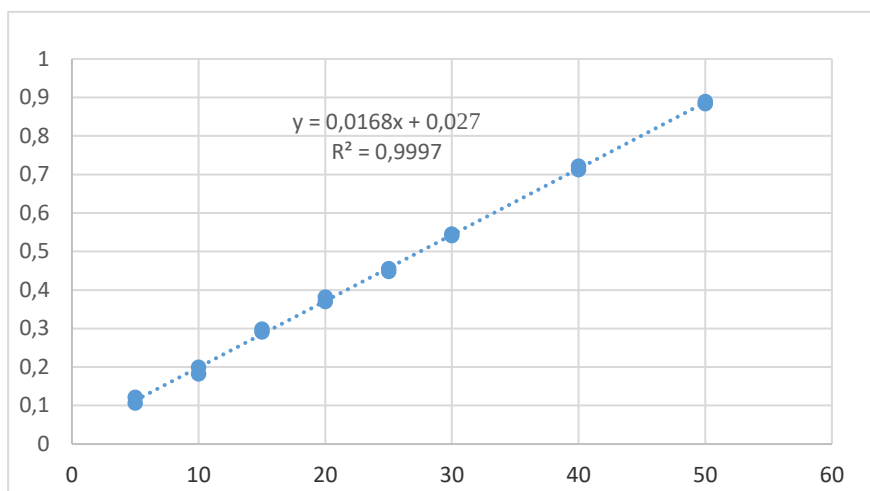


Рис. 2.2. Калібрувальний графік для кількісного визначення вортіоксетину методом УФ-спектрофотометрії

Таблиця 2.3

Метрологічні характеристики калібрувального графіку
($y = b \times x + a$) для кількісного визначення вортіоксетину методом
УФ-спектрофотометрії

Пара-метр	r	b	a	S^2	Δb	Δa	S_a	S_b
Зна-чення	0,999	0,0168	0,027	$5,769 \times 10^{-5}$	0,0004	0,009	0,0041	0,0002

Величини значень DL та QL нами було розраховано за величиною стандартного відхилення вільного члену в рівнянні калібрувального графіку (S_a) за відповідними формулами $DL = 3,3 \times S_a/b$ та $QL = 10 \times S_a/b$, де S_a – стандартне відхилення вільного члену в рівнянні калібрувального графіку; b – кутовий коефіцієнт у рівнянні калібрувального графіку. Розраховані DL та QL методу кількісного визначення становили 0,8 мкг/мл та 2,4 мкг/мл.

Значення правильності та прецизійності розробленої методики нами встановлено для усіх досліджуваних рівнів концентрацій на протязі одного дня (*intra day*) (табл. 2.4). Визначення кожного концентраційного рівня виконували по три рази.

Таблиця 2.4

**Правильність та прецизійність кількісного визначення вортіоксетину
УФ-спектрофотометричним методом (*intra day**)**

Взято вортіоксетину, мкг/мл	Знайдено вортіоксетину		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
5,0	5,1	102,0	$\bar{x} = 100,44$; $S = 2,3$; $RSD = 2,04\%$; $S\bar{x} = 0,8$; $\Delta\bar{x} = 2,0$; $\varepsilon = 2,0$; $\bar{x} \pm \Delta\bar{x} =$ $100,44 \pm 2,0$
10,0	9,8	98,0	
20,0	19,8	99,0	
25,0	25,5	102,0	
30,0	30,6	102,0	
40,0	40,4	101,0	
45,0	44,6	99,1	

*Середнє з п'яти визначень: $P=0,95$; $t\alpha=2,132$

Нами встановлено, що правильність та прецизійність «*intra day*» методики для широкого діапазону концентрацій (від низької та середньої, до високої) становили 100,44% ($RSD = 2,04\%$)

2.6. Кількісне визначення вортіоксетину методом екстракційної фотометрії

Метод екстракційної фотометрії знайшов широке застосування при виконанні хіміко-токсикологічних досліджень, що пов'язано з його досить високою чутливістю та доступністю, а також можливістю його використовувати для визначення отруйних речовин в біоекстрактах у присутності невеликої кількості співекстрактивних речовин з біологічного матеріалу. В якості реагента для екстракційно-фотометричного методу кількісного визначення вортіоксетину ми використовували метиловий оранжевий – натрієву сіль 4-диметиламіноазобензен-4'-сульфокислоти. При значенні рН 4,4 водного розчину індикатор забарвлений на жовтий колір, у більш кислому середовищі (рН 4,3–3,1) на червоний, що пов'язано з утворенням хінондиїмінної будови. Інтервал переходу метилового оранжевого з червоного на жовтий колір знаходиться в межах рН 3,1 – 4,4.

Іонні асоціати вортіоксетину з індикатором метиловим оранжевим в слабкокислому середовищі при рН 4,6 добре екстрагуються хлороформом та забарвлюють шар органічного розчинника у жовтий колір. Світлопоглинання таких розчинів відрізнялось низькою інтенсивністю, тому ми для збільшення чутливості методики іонний асоціат розкладали шляхом додавання до хлороформного розчину іонного асоціату 1 % розчину кислоти сульфатної в абсолютному етиловому спирті. При цьому спостерігається вивільнення азобарвника з асоціату, що й надає розчину інтенсивного яскравого червоного забарвлення, при цьому кількість барвника, що вивільняється, є еквівалентною до кількості вортіоксетину в іонних асоціатах. Нами при опрацюванні оптимальних умов для екстракційно-фотометричного методу кількісного визначення вортіоксетину досліджено вплив величини рН водного розчину на процеси утворення та наступну екстракцію іонних асоціатів досліджуваного антидепресанту з азобарвником, а також вивчено вплив доданої кількості

азобарвника на вказаний процес, проведено підбір світлофільтру та робочої довжини кювети для вимірювань.

Створення необхідних значень рН водних розчинів проводили за допомогою універсального буферу Бріттона-Робінсона, а величину рН буферів контролювали рН-метром.

Оптимальний світлофільтр підбирали способом, який наведеним в керівництвах з фотометричних методів аналізу. Для цього вимірювали оптичну щільність приготованих розчинів з різними концентраціями, використовуючи усі наявні до приладу світлофільтри. Нами обрано світлофільтр, для якого оптичні щільності досліджуваних розчинів або різниця вимірюваних оптичних щільностей для розчинів з різними концентраціями були найбільшою. Одержані при цьому нами результати вимірювань засвідчили, що оптимальними для наших умов фотометричного визначення є результати, отримані при використанні світлофільтра з $\lambda_{\text{ef}} 540 \pm 10$ нм. Для підтвердження правильності вибору світлофільтру ми додатково виміряли оптичну щільність вказаного розчину на спектрофотометрі, при цьому спектр поглинання розчинів мав максимум при 530 нм, значення якої є найближчим до ефективної (540 нм) довжини хвилі світлофільтру обраного фотоелектроколориметру. Нами при вимірюваннях оптичної щільності використано кювети з товщиною шару поглинаючої рідини в 5, 10 та 20 мм. Отримані результати вимірювань засвідчили, що кювета з товщиною шару досліджуваної рідини 20 мм є оптимальною для вимірювань при кількісному визначенні вортіоксетину, яка була нами використана при усіх подальших вимірюваннях світлопоглинання.

Оптимальний об'єм реактиву для визначення, зазвичай, розраховують теоретичним шляхом або визначають за максимальним світлопоглинанням розчинів. З цією метою готували розчини з постійним вмістом досліджуваної речовини (вортіоксетину), та з різним, кожного разу збільшеним, об'ємом реактиву. Вимірювали оптичні щільності

розчинів та спостерігали отримані залежності оптичних густин (A) від об'єму доданого реактиву та встановлювали кількість реактиву, за якою зупинялось збільшення оптичної щільності розчину. Така кількість вважається оптимальною для проведення вимірювань. До декількох ділительних лійок, закріплених у лабораторних штативах, вносили по 15 мл хлороформу, додавали 5 мл ацетатної буферної суміші з pH 4,6, 1 мл водного розчину вортіоксетину (вмістом 80 мкг препарату), та від 1,0 до 7,0 мл 0,05 % розчину метилового оранжевого. Далі визначення проводили так, як наведено в методиці побудови калібрувального графіку. Отримані нами результати визначень показали, що 5 мл 0,05 % розчину метилового оранжевого є оптимальним для процесу утворення іонних асоціатів азобарвника з вортіоксетином.

При встановленні діапазону значень pH середовища, при якому мав місце максимальний рівень екстрагування іонного асоціату, ми до ряду ділительних лійок вміщували по чергові по 5 мл ацетатного буферу (діапазон значень pH становив 3,8–5,6, 5 мл 0,05% приготовленого розчину азобарвника, 1 мл водного розчину вортіоксетину, що містив 80 мкг досліджуваного антидепресанту, а також 15 мл хлороформу. Подальше визначення виконували, як вказано в розділі при побудові калібрувального графіку. Встановлено, що отримані іонні асоціати досліджуваного антидепресанту і азобарвника найбільш повно екстрагуються хлороформом при pH 4,5–4,7, саме через це ми при подальших вимірюваннях використовували ацетатний буфер з pH 4,6.

Методика побудови калібрувального графіку. Попередньо готували робочий стандартний розчин вортіоксетину у воді. Для цього 0,01715 г (точна наважка субстанції препарату) вортіоксетину (кількість у перерахунку відповідає 0,01500 г основи антидепресанту) переносили до мірної колби місткістю 100 мл та розчиняли у дистильованій воді і доводили об'єм до позначки (отримано розчин із вмістом вортіоксетину 150 мкг/мл). До декількох ділительних лійок, закріплених у штативі, вносили

по 5 мл ацетатного буферу (рН 4,6), потім 5,0 мл 0,05 % водного розчину азобарвника (метилового оранжевого) та по 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,70; 0,80 мл стандартного водного розчину вортіоксетину та по 15 мл перегнаного хлороформу. Для дотримання постійного співвідношення фаз, ми додавали певні відповідні об'єми дистильованої води (0,95–0,20 мл). До отриманої суміші додавали 15,0 мл хлороформу. Суміші у ділительних лійках струшували на протязі 15 хв на механічному струшувачі рідин та залишали на 15 хв для розділення водної та органічної фази. Після цього обережно відокремлювали з лійки 14 мл хлороформної фази та додавали до неї піпеткою 2 мл 1 % розчину кислоти сульфатної в абсолютному спирті етиловому. Вимірювали оптичну щільність забарвлених на червоний колір розчинів на фотоелектроколориметрі КФК-2 (зелений світлофільтр з λ_{ef} 540 $\pm$ 10 нм та кюветою з шаром рідини 20 мм, розчин порівняння—«холостий» дослід.

Отримані значення показників світлопоглинання нами оброблено за методом лінійної регресії. Після відповідної перевірки значущості параметру a в рівнянні, яке було отримано за критерієм Фішера [14], зроблено висновок щодо неможливості переходу до рівняння вигляду: $y = b' \times x$, а калібрувальний графік для кількісного визначення описувався рівнянням: $y = 0,00811 \times x + 0,008$.

Лінійність методики кількісного визначення спостерігали в межах концентрацій від 7,5 до 120 мкг/мл вортіоксетину. Розраховані нами метрологічні характеристики побудованого калібрувального графіку для екстракційно-фотометричного визначення вортіоксетину наведені в табл. 2.5.

Значення межі виявлення та межі кількісного визначення були нами розраховані за стандартним відхиленням вільного члену та відповідного кутового коефіцієнту в рівнянні калібрувального графіку. Зазначені показники Detection Limit (DL) становив 1,3 мкг/мл, Quantification Limit (QL) 3,9 мкг/мл.

Таблиця 2.5

**Метрологічні характеристики калібрувального графіку для
кількісного визначення вортіоксетину екстракційно-фотометричним
методом**

Пара- метр	r	b	a	S^2	Δb	Δa	S_a	S_b
Значення	0,999	0,00811	0,008	$3,9677 \times 10^{-5}$	8×10^{-5}	0,004	0,0032	$3,854 \times 10^{-5}$

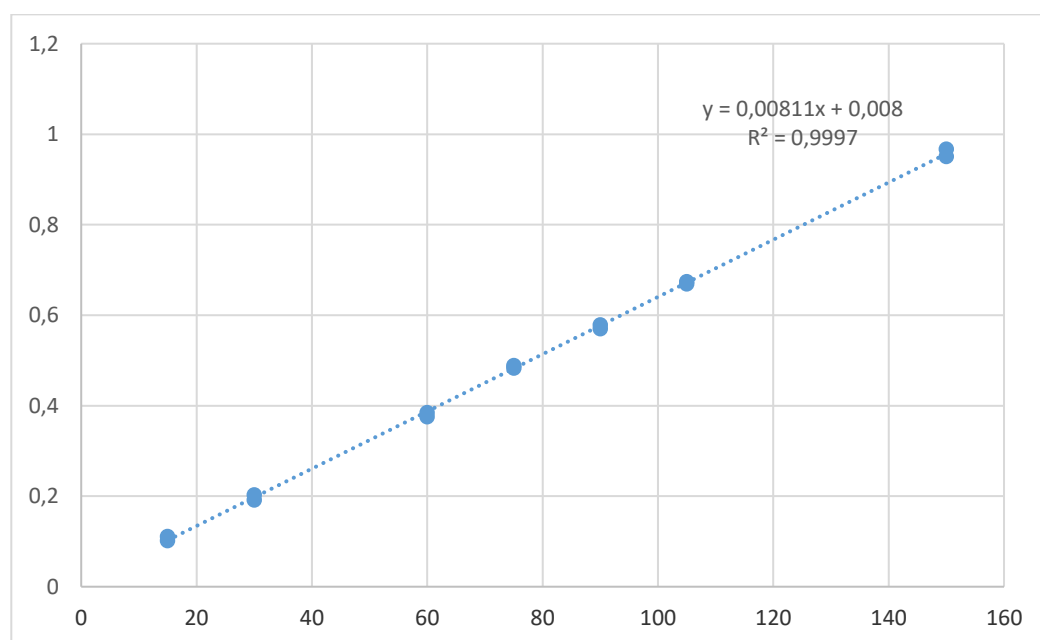


Рис. 2.3. Калібрувальний графік для кількісного визначення
вортіоксетину екстракційно-фотометричним методом за реакцією з
метиловим оранжевим

Визначено правильність та прецизійність розробленої методики екстракційно-фотометричного визначення вортіоксетину за допомогою серії робочих стандартних розчинів протягом дня. Отримані нами результати з наведено в табл. 2.6.

Таблиця 2.6

**Правильність та прецизійність кількісного визначення вортіоксетину
(*intra day*) екстракційно-фотометричним методом**

Взято вортіоксетину, мкг	Знайдено вортіоксетину		Метрологічні характеристики*
	мкг	%	
15,0	14,8	98,7	$\bar{x} = 99,6;$ $S = 2,0;$ $RSD = 2,11\%;$ $S\bar{x} = 0,6;$ $\Delta\bar{x} = 2,7;$ $\varepsilon = 2,7;$ $\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 99,6 \pm 2,7$
30,0	29,8	99,3	
45,0	44,5	98,9	
60,0	60,9	101,5	
75,0	74,4	99,2	
90,0	89,2	99,1	
105,0	105,8	100,8	
120,0	119,1	99,3	

*Середнє значення (п'ять визначень): $P=0,95$; $t\alpha=2,132$

Правильність та прецизійність опрацьованої методики нами було встановлено для широкого діапазону концентрацій – від низького до високого на протязі одного дня (*intra day*), тричі по відношенню до кожного концентраційного рівня.

Висновки до розділу 2

1. Досліджено умови виявлення тимолептику нової генерації вортіоксетину методом хроматографії в тонких шарах сорбенту в умовах проведення систематичного токсикологічного скринінгу та з застосуванням спеціальних рухомих фаз, які рекомендовані Міжнародною асоціацією судових токсикологів для детектування лікарських речовин в екстрактах з біологічних об'єктів, а також із використанням ряду інших рухомих фаз, що використовуються у вітчизняній практиці біоаналітичних досліджень на попередньому етапі

скринінгу сильнодіючих та психотропних лікарських речовин основного характеру. Хроматографічні дослідження опрацьовано для п'ятих типів хроматографічних пластин.

2. Виявлено ряд хроматографічних систем з низькою кореляцією значень R_f вортіоксетину, що дозволяє суттєво підвищити надійність попередньої ідентифікації досліджуваного антидепресанту методом хроматографії в тонких шарах сорбенту.
3. Досліджено характер забарвлень продуктів реакцій взаємодії вортіоксетину з рядом хромогенних реактивів, що рекомендовані в якості візуалізаторів при скринінгових дослідженнях лікарських речовин методом тонкошарової хроматографії, встановлено чутливість хромогенних реактивів по відношенню до зазначеного антидепресанту.
4. Досліджено характер світлопоглинання вортіоксетину в УФ-області спектру та показано присутність специфічного світлопоглинання, що дозволяє застосовувати УФ-спектрофотометричний метод для детектування вказаного антидепресанту при дослідженні біологічних екстрактів на вміст вортіоксетину.
5. Запропоновано умови кількісного визначення вортіоксетину УФ-спектрофотометричним та екстракційно-фотометричним методами з метою їх використання при дослідженні екстрактів з біологічного матеріалу на наявність досліджуваного антидепресанту. Опрацьовані методики валідовано та встановлено їх валідаційні параметри: діапазон лінійності, правильність та прецизійності. Показано, що запропоновані методики відповідають вимогам до біоаналітичних методів судової токсикології.

РОЗДІЛ 3

РОЗРОБКА ОПТИМАЛЬНИХ УМОВ ВИДІЛЕННЯ ВОРТІОКСЕТИНУ З СЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ

При проведенні біоаналітичних досліджень, пов'язаних з пробопідготовкою та ізолюванням лікарських речовин з секційного біологічного матеріалу, з метою звільнення біоекстрактів від небажаних співекстрактивних домішок, в тому числі і для концентрування досліджуваних речовин із розбавлених розчинів, використовуються методи рідинно-рідинної екстракції. При цьому, оптимізація методики екстракційної очистки полягає у встановленні оптимального органічного екстрагенту та значення рН водної фази.

3.1. Дослідження умов екстракції вортіоксетину з водних розчинів органічними екстрагентами

Ступінь вивільнення лікарської речовини від кон'югатів з пептидами та білковими молекулами біологічної матриці, та, відповідно, ефективне ізолювання отруйної речовини з таких об'єктів залежить від властивостей органічного розчинника, ступеню розчинності лікарської речовини в органічному екстрагенті, від походження, стану та структури біологічного матеріалу, здатності певного органічного екстрагенту проникати крізь клітинні мембрани, рН середовища та температури.

Проведені чисельні дослідження в галузі практичної судової токсикології показали, що послідовне сполучення поєднання методів екстракційної та очистки витягів методом тонкошарової хроматографії є достатньо ефективним.

Попередньо нами, з метою з'ясування найбільш оптимальних умов допоміжного екстракційного очищення біологічних екстрактів було досліджено умови екстрагування вортіоксетину за допомогою найбільш універсальних органічних екстрагентів з водних розчинів у залежності від природи розчинника та рН водного середовища. З метою створення

відповідних значень рН нами було використано універсальний буфер Бріттона-Робінсона (робочий інтервал рН 2,0-11,98), розчин кислоти хлоридної 0,1 М (з рН 1,1) та розчин натрій гідроксиду (з рН 13).

При вивченні умов екстрагування вортіоксетину застосовували наступні перегнані розчинники: етилацетат, гексан, хлороформ, бензен та толуен.

Методика проведення екстракції вортіоксетину. До ряду ділільних ліжок, закріплених у лабораторних штативах, додавали по 9,00 мл буферного розчину з певним значенням рН, водний розчин (1 мл) вортіоксетину (вміст препарату 50,0 мкг/мл) та 10,00 мл одного з органічних екстрагентів. Суміші у лійках збовтували на протязі 10 хв, а потім залишали на 10 хв для розділення фаз. Органічний розчинник відокремлювали, переносили до фарфорової чашки та екстрагент обережно випаровували на водяній бані. Залишки в чашці розчиняли в 0,1 М розчині кислоти хлоридної (1 мл) та кількісно визначали вортіоксетин в отриманих розчинах екстракційно-фотометричним та УФ-спектрофотометричним методом (розд. 2.5).

Результати зі встановлення ступеню екстракції засвідчили, що кращим органічним розчинником для екстракції вортіоксетину, серед досліджених нами, є хлороформ при рН 8–9. Використання гексану при рН 1–2 є оптимальним для екстрагування ендогенних співекстрактивних речовин з біологічного матеріалу (табл. 3.1).

Методика додаткової очистки екстрактів, які містили вортіоксетин. Біологічні витяги з печінки, отримані так, як зазначено в розд. 3.2 та 3.3, випаровували в фарфоровій чашці до видалення екстрагенту. До отриманих сухих залишків додавали 0,1 М розчин хлоридної кислоти (1 мл), вміст обережно перемішували та кількісно переносили до ділільних ліжок. Суміші тричі збовтували з 10 мл гексану, екстрагент відділяли та відкидали, не досліджуючи.

Таблиця 3.1

Залежність ступеню екстракції вортіоксетину органічними розчинниками з водних розчинів при різних значеннях рН

Екстрагент	рН середовища												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	Ступінь екстракції, R%												
Хлороформ	5	11	17	25	31	42	49	61	64	62	51	46	37
Гексан	1	1	2	5	6	7	9	14	15	14	13	9	6
Етилацетат	3	5	6	7	10	18	25	37	44	39	31	25	18
Бензен	2	6	11	15	17	25	31	34	39	37	26	19	12
Толуен	1	4	7	11	19	27	30	41	44	40	34	24	14

Залишок в лійці підлугували 25 % розчином натрій гідроксиду до рН 9 та збовтували, тричі екстрагуючи вортіоксетин хлороформом по 10 мл кожного разу. Органічні витяги профільтровували крізь паперовий складчастий фільтр з 0,2 г натрій сульфату безводного до мірної колби місткістю 50 мл, доводячи об'єм витягу до позначки (V_1).

Біологічні екстракти з «холостих» витягів після додаткового екстракційного очищення від ендогенних компонентів біологічного матеріалу все ще містили їх певну кількість. Так, при вимірюванні оптичної щільності «холостих» витягів при λ_{max} 232 нм (спектрофотометричний метод) її показники становили 0,085-0,11, що перешкоджало використанню спектральних методів для дослідження екстрактів з біоматеріалу на наявність вортіоксетину. Через це відповідні витяги піддавали додатковій очистці від ендогенних домішок з використанням методу тонкошарової хроматографії.

Додаткове очищення екстрактів методом ТШХ. Певний об'єм витяжки (V_2), отриманої після попереднього додаткового видалення домішок екстракційним методом, випаровували до, приблизно, до 0,05 мл та за допомогою капіляру ретельно наносили вузькою смугою на стартову лінію хроматографічної пластини Сорбфіл. Поруч також наносили 5,0 мкл хлороформного (стандартного) розчину вортіоксетину («свідок») з концентрацією 1,0 мг/мл. Також поруч, смугою, наносили 5,0 мл попередньо випареної до 0,05 мл «холостої» витяжки.

Хроматограми з нанесеними частинами загального об'єму витягів спочатку розвивали у рухомій фазі хлороформ, висушували, та повторно розвивали в рухомій фазі: метанол–25 % розчин амоній гідроксиду (100:1,50). Далі виявляли вортіоксетин на пластинах так, як наведено в розд. 2.3. Значення величин R_f забарвлених у оранжевий колір плям вортіоксетину (екстракт з біоматеріалу) та розчину вортіоксетину-«свідку» повністю співпадали та становили 0,50. «Холості» досліди не давали плям із значенням R_f , вказаним вище.

Далі ми елюювали вортіоксетин з отриманих хроматограм 5 мл метанолу на тому рівні, що відповідає знаходженню плями «свідка» досліджуваного антидепресанту. Для цього скальпелем зрізали тонкий шар сорбенту розміром близько 3 мм на 10 мм і переносили до мікропробірки, збовтуючи двічі з 4 мл метанолу. Суспензію фільтрували крізь складчастий фільтр до пікнометру об'ємом 5,00 мл і доводили до позначки (V_3) метиловим спиртом (попередньо нами встановлений ступінь елюювання вортіоксетину метанолом з обраного типу шару сорбенту становив 98,9 %).

3.2. Ізолювання вортіоксетину з біологічного матеріалу водою, підкисленою кислотою оксалатною (за А. О. Васильєвою)

До 20 г подрібненої печінки додавали 1 мл водного розчину вортіоксетину, що містив 2000 мкг зазначеного препарату та залишали на добу. Паралельно ставили «контрольні» досліди з такою ж наважкою біоматеріалу.

За добу після цього до секційного матеріалу додавали воду до покриття твердих частинок біологічного матеріалу, а потім суміш підкислювали насиченим розчином кислоти оксалатної до рН 2-3 (контроль рН середовища здійснювали з використанням універсального індикаторного паперу). Досліджувані суміші настоювали протягом двох годин при перемішуванні та перевірці рН. Отриманий водний витяг зливали з об'єкту, проціджуючи його крізь марлю. Біологічний матеріал, який залишився, повторно настоювали з підкисленою водою, як вказано раніше, протягом однієї години, а потім проціджували.

Кислі витяги об'єднували та центрифугували на протязі 15 хвилин при швидкості 4000 об/хв. Очищену рідку фазу обережно відокремлювали та переносили до скляної ділильної лійки об'ємом 100 мл, а потім проводили трьохкратне екстрагування попередньо перегнаним хлороформом по 25 мл кожного разу. Після розділення фаз хлороформний шар відкидали (не досліджуючи у подальшому), а кислий водний витяг, який залишився, підлюговували додаванням до нього по краплях

концентрованого розчину амоній гідроксиду до рН 9 та проводили трьохкратне екстрагування основи вортіоксетину хлороформом. Отримані хлороформні витяги фільтрували крізь паперовий складчастий фільтр (попередньо змочений хлороформом) з 0,3 г натрій сульфату (безводного) і кількісно переносили у мірну колбу місткістю 25 мл, доводячи об'єм вмісту до позначки перегнаним хлороформом.

Після цього отримані таким чином з досліджуваного подрібненого біоматеріалу екстракти додатково очищували від співекстрактивних домішок послідовно методами екстракції та тонкошаровою хроматографією (розд. 3.1).

3.3. Ізолювання вортіоксетину з біологічного матеріалу етиловим спиртом, підкисленим кислотою оксалатною (за Стасом-Отто)

20 г гомогенізованої тканини печінки вміщували в хімічний стакан, додавали 1 мл водного розчину вортіоксетину, що містив 2000 мкг вказаного препарату. При цьому ми паралельно ставили «контрольні» досліди з такою ж наважкою гомогенізованого біоматеріалу. Досліджувані суміші залишали на одну добу.

Потім до секційного матеріалу додавали 96 % спирт етиловий до покриття біологічного об'єкту (утворення «дзеркала»), підкислювали 15 % розчином кислоти оксалатної в етанолі до рН 2–3 та ретельно перемішували скляною паличкою. Величину рН сумішей періодично перевіряли за допомогою універсального індикаторного паперу та за необхідності підкислювали спиртовим розчином кислоти оксалатної до необхідного значення (рН 2-3).

За 24 години кислий спиртовий витяг обережно зливали з біоматеріалу, а до біологічного об'єкт додавали нову порцію спирту етилового та підкислювали, як вказано вище, до рН 2-3. Процес настоювання гомогенізованого біоматеріалу з порціями підкисленого етилового спирту виконували три рази протягом однієї доби кожен раз. Кислі спиртові витяги, отримані таким чином, об'єднували і переносили до

фарфорової чашки, а біоматеріал ми переносили на паперовий фільтр та промивали етиловим спиртом, приєднуючи фільтрат до попередньо отриманих витягів. Об'єднані спиртові витяги обережно випаровували на водяній бані до сиропоподібної рідини, до якої після її охолодження добавляли по краплях спирт етиловий абсолютний при постійному перемішуванні за допомогою скляної палички (до припинення осадження біогенних домішок). Осад, який при цьому утворився, фільтрували крізь паперовий фільтр та промивали спиртом етиловим, а отриманий фільтрат повторно випаровували до сиропоподібного стану, як описано раніше, та співекстрактивні речовини повторно осаджували етиловим спиртом.

Процес випаровування кислих фільтратів з наступним осадженням білкових домішок етиловим спиртом із сиропоподібних розчинів виконували доти, поки пептиди та білки не припинять коагулювати від додавання 96 % спирту етилового. Після цього до сиропоподібних розчинів додавали 20 мл води та профільтровували їх у випадку випадіння осаду. Кислий водний спиртовий витяг вміщували у ділильну лійку та виконували трьохкратну екстракцію хлороформом по 10 мл кожен раз, шар органічного розчинника після розділення фаз відокремлювали і відкидали (не досліджуючи). До кислого водного витягу, який залишився, по краплях додавали концентрований розчин амоній гідроксиду до рН 10 та проводили трьохкратну екстракцію основи вортіоксетину хлороформом по 10 мл кожен раз. Отримані хлороформні витяги об'єднували, профільтровували крізь складчастий паперовий фільтр, який вміщував близько 0,3 г натрій сульфату (безводного) та заздалегідь був змочений вказаним розчинником, і кількісно переносили в мірну колбу місткістю 25 мл, доводячи об'єм до позначки хлороформом.

Витяги, отримані при ізолюванні за допомогою настоювання з підкисленим спиртом, містили відносно велику кількість ендогенних співекстрактивних речовин з біологічної матриці, які унеможлилювали подальше проведення виявлення та кількісне визначення в біоекстрактах

вортіоксетину, тому далі ми додатково видаляли домішки шляхом сполученням методів екстракції та хроматографії в тонкому шарі сорбенту (див. розд. 3.1).

Кількісне визначення вортіоксетину в біологічних витягах проводили методами УФ-спектрофотометрії (розд. 2.5) та екстракційної фотометрії у видимій області за реакцією утворення іонного асоціату досліджуваного антидепресанту з кислотним азобарвником – метиловим оранжевим (розд. 2.6). Розрахунок вмісту досліджуваного антидепресанту в одержаних екстрактах з біоматеріалу виконували, використовуючи калібрувальний графік (табл. 3.2–3.5).

Таблиця 3.2

Результати УФ-спектрофотометричного визначення вортіоксетину, виділеного з печінки настоюванням з водою, підкисленою кислотою оксалатною (середнє з п'яти визначень*)

Додано вортіоксетину до 20 г печінки, мкг	Виділено вортіоксетину		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
1000	32,6	326,0	$\bar{x} = 31,7;$ $S = 2,4;$ $RSD = 7,5\%;$ $S\bar{x} = 1,1;$ $\Delta\bar{x} = 2,4;$ $\varepsilon = 7,6\%;$ $\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 31,7 \pm 2,4$
1000	34,3	343,0	
1000	33,1	331,0	
1000	28,9	289,0	
1000	29,4	294,0	

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

Таблиця 3.3

Результати УФ-спектрофотометричного визначення вортіоксетину, виділеного з печінки настоюванням з етиловим спиртом, підкисленим кислотою оксалатною (середнє з п'яти визначень*)

Додано вортіоксетину до 20 г печінки, мкг	Виділено вортіоксетину		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
1000	36,1	361,0	$\bar{x} = 36,1;$ $S = 2,0;$ $RSD = 5,4\%;$ $S\bar{x} = 0,9;$ $\Delta\bar{x} = 1,9;$ $\varepsilon = 5,2;$ $\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 36,1 \pm 1,9$
1000	35,4	354,0	
1000	37,7	377,0	
1000	33,2	332,0	
1000	38,1	381,0	

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

Таблиця 3.4

Результати екстракційно-фотометричного визначення вортіоксетину, виділеного з печінки настоюванням з водою, підкисленою кислотою оксалатною (середнє з п'яти визначень*)

Додано вортіоксетину до 20 г печінки, мкг	Виділено вортіоксетину		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
1000	33,1	331,0	$\bar{x} = 31,5;$ $S = 2,6;$ $RSD = 8,1\%;$ $S\bar{x} = 1,1;$ $\Delta\bar{x} = 2,4;$ $\varepsilon = 7,7\%;$ $\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 31,5 \pm 2,4$
1000	30,2	302,0	
1000	35,2	352,0	
1000	29,1	291,0	
1000	30,0	300,0	

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

Таблиця 3.5

Результати екстракційно-фотометричного визначення вортіоксетину, виділеного з печінки настоюванням з етиловим спиртом, підкисленим кислотою оксалатною (середнє з п'яти визначень)

Додано вортіоксетину до 20 г печінки, мкг	Виділено вортіоксетину		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
1000	36,7	7,2	$\bar{x} = 36,0$; $S = 1,6$; $RSD = 4,5\%$; $S\bar{x} = 0,7$; $\Delta\bar{x} = 1,5$; $\varepsilon = 4,3\%$; $\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 36,0 \pm 1,5$
1000	34,7	8,2	
1000	37,2	7,7	
1000	33,9	7,1	
1000	37,6	7,9	

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

3.4 Ідентифікація вортіоксетину в витягах з біоматеріалу методом хроматографії в тонких шарах сорбенту та кольоровими реакціями

Дослідження витягів з біоматеріалу на наявність вортіоксетину з використанням методу тонкошарової хроматографії та кольоровими експрес-реактивами проводили лише за умови ретельної додаткової екстракційної очистки.

Методика проведення виявлення вортіоксетину в біологічних витягах за допомогою методу ТШХ. На лінію старту певного типу хроматографічної пластини (розд. 2.3) (біля 2,0 см від кожного з країв) скляним каліброваним капіляром наносили до однієї точки послідовно 10–20 мкл етанольного розчину (стандарт) вортіоксетину (концентрація 1 мг/мл). На відстані 5 мм вузькою смужкою наносили частину біологічного витягу з печінки об'ємом 5,0 мл (попередньо випареного до

об'єму близько 0,05 мл. Поруч таким же чином наносили 2,0 мл випареного до 0,05 мл біологічного екстракту з «контрольного» дослідження з біоматеріалом.

Хроматограми з нанесеними пробами розвивали в двох рухомих фазах послідовно: з метою відокремлення біогенних домішок з витягів пластини розвивали в хлороформі (перша рухома фаза), при цьому співекстрактивні речовини значною мірою рухались з рухомим розчинником ближче до лінії фінішу, а вортіоксетин перебував на місці нанесення на лінії старту пластини).

Після висушування хроматограм їх повторно розвивали в системі рухомих фаз етилацетат–метанол – 25 % розчин амоній гідроксиду (85:10:5) (величини R_f плям вортіоксетину на пластинах різного типу становили від 0,35 до 0,85) або метанол – 25 % розчин амоній гідроксиду (100:1,5) (діапазон величин R_f плям препарату складав від 0,26 до 0,71 для різних типів досліджуваних нами пластин).

Плями вортіоксетину на хроматограмах проявляли реактивом Драгендорфа, модифікованому за Мун'є. Значення визначених величин R_f плям вортіоксетину на хроматографічних пластинах у витягах з біоматеріалу та вказаного антидепресанту в розчині-«стандарті» співпадали в межах похибки. «Контрольні» витяги забарвлених плям на пластинах не утворювали.

Для виявлення вортіоксетину за допомогою кольорових експрес-реактивів хлороформні витяги переносили на хроматографічну пластину та випаровували до видалення органічного розчинника. До залишку додавали відповідні кольорові реактиви (див. табл. 2.2) та спостерігали утворення забарвлень та їх зміну протягом декількох хвилин.

Усі забарвлення плям досліджуваного антидепресанту в витягах з біоматеріалу та в стандартному розчині були ідентичні. Витяги з «контрольних» дослідів відповідних забарвлень не утворювали.

3.5 Використання методу УФ-спектрофотометрії для виявлення та кількісного визначення вортіоксетину в витягах з біоматеріалу

Ідентифікацію вортіоксетину в витягах з секційного матеріалу проводили лише після додаткового їх очищення методом хроматографії в тонких шарах сорбенту. Елюати витягів з хроматограм випаровували, сухі залишки розчиняли в 5 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної та знімали світлопоглинання вортіоксетину, так, як наведено раніше в розд. 2.3. Компенсаційним розчином було обрано елюат з контрольного дослідження. УФ-спектр елюату, виділеного з біоматеріалу, був аналогічним до УФ-спектру стандартного розчину антидепресанту в 0,1 М розчині кислоти хлоридної та мав максимум світлопоглинання при λ_{max} 232 нм.

Кількісно визначали вортіоксетин у витягах з секційного матеріалу методом УФ-спектрофотометрії (λ_{max} 232 нм). З цією метою 5 мл попередньо випареного метанольного елюату (5 мл, V_3) кількісно розчиняли в 0,1 М розчині кислоти хлоридної (в 5 мл) та вимірювали оптичну густину розчину при 232 нм (компенсаційний розчин – «контрольний» елюат з шару сорбенту). Розрахунок концентрації вортіоксетину проводили за калібрувальним графіком. Кількість вортіоксетину, виділеного з гомогенізованого біоматеріалу з розрахунком ступеню ізолювання проводили за методом виділено / внесено антидепресанту, %. Кількість вортіоксетину, що виділено з секційного біоматеріалу (G , мкг), обраховували за наступною формулою:

$$G = \frac{C \times V_1 \times V_3}{V_2}$$

де C – концентрація вортіоксетину в досліджуваному метанольному елюаті з хроматограм, мкг/мл;

V_1 – отриманий при ізолювання вортіоксетину об'єм екстракту з біоматеріалу після допоміжної екстракційного очищення, (мл);

V_2 – взятий для очищення методом тонкошарової хроматографії об'єм екстракту (мл), мл;

V_3 – отриманий після допоміжного очищення методом тонкошарової хроматографії об'єм елюату, (мл);

Результати кількісного визначення вортіоксетину в біологічних витягах з секційного матеріалу при ізолюванні вказаного антидепресанту підкисленою водою та підкисленим етиловим спиртом приведено в табл. 3.2–3.5. Ступінь ізолювання вортіоксетину вказаними загальними методами виділення лікарських речовин склала 31 % та 36 % відповідно.

Висновки до розділу 3

1. Встановлено оптимальні умови екстракції антидепресанту вортіоксетину з досліджуваних водних розчинів за допомогою найбільш поширених при виконанні біоаналітичних токсикологічних досліджень органічних екстрагентів у залежності від значення рН середовища. Нами встановлено, що найвищий ступінь екстракції зазначеного антидепресанту має місце при використанні як органічного екстрагенту хлороформу при рН 9. Для реекстракції співекстрактивних ендогенних домішок з біологічних витягів доцільно використовувати гексан при рН 2.

2. Встановлено ефективну розрізняючу здатність загальних методів виділення лікарських речовин шляхом настоювання біологічного матеріалу з полярними розчинниками – підкисленою водою та підкисленим етиловим спиртом відносно до нового антидепресивного лікарського препарату вортіоксетину, ступінь ізолювання якого зазначеними методами складав 31 % та 36 % відповідно, що задовільняє вимогам до ефективності біоаналітичних методів аналізу.

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

1. Досліджено взаємодію нового лікарського препарату антидепресивної дії вортіоксетину з рядом кольорових експрес-реактивів, що використовуються при проведенні попередніх скринінгових досліджень біологічних екстрактів на вміст сильнодіючих лікарських речовин, та встановлена їх чутливість.
2. Встановлено хроматографічну рухливість вортіоксетину в рухомих фазах, що рекомендовані Міжнародною асоціацією судових токсикологів для проведення систематичного хіміко-токсикологічного скринінгу сильнодіючих, наркотичних та психотропних препаратів на різних типах хроматографічних пластин.
3. Для кількісного визначення вортіоксетину в біоекстрактах з модельної печінки запропоновано методи абсорбційної УФ-спектрофотометрії та екстракційної фотометрії у видимій ділянці, заснованій на реакції утворення іонного асоціату досліджуваного антидепресанту з азобарвником метиловим оранжевим.
4. Встановлено ступінь ізолювання вортіоксетину з водних розчинів деякими найбільш поширеними органічними екстрагентами в залежності від рН середовища. Показано, що оптимальним органічним екстрагентом для вортіоксетину з водних розчинів є хлороформ при рН 9 (ступінь екстракції становив 64 %), найменший ступінь екстракції досліджуваного препарату спостерігався при використанні гексану при рН 1–2 та складав 1 %.
5. Встановлено ефективність ізолювання вортіоксетину з секційного біологічного матеріалу за допомогою загальноприйнятих методів виділення лікарських речовин шляхом настоювання об'єктів з підкисленою водою та підкисленим спиртом етиловим, яка становила 31% та 36% відповідно. Розроблено оптимальні умови очистки біологічних екстрактів від співекстрактивних речовин з використанням методу рідинної екстракції.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Vortioxetine in patients with major depressive disorder and high levels of anxiety symptoms: An updated analysis of efficacy and tolerability / M. Adair et al. *J. Affect. Disord.* 2023. Vol. 328. P. 345–354.
2. Vortioxetine for depression in adults / M. Koesters et al. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2017. Vol. 7(7). P. 11520.
3. Yee A., Ng C. G., Seng L. H. Vortioxetine Treatment for Anxiety Disorder: A Meta-Analysis Study. *Curr Drug Targets.* 2018. Vol. 19(12). P. 1412–1423.
4. Efficacy and Safety of Escitalopram, Desvenlafaxine, and Vortioxetine in the Acute Treatment of Anxious Depression: A Randomized Rater-blinded 6-week Clinical Trial / C. Shin et al. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2023. Vol. 21(1). P. 135–146.
5. The effectiveness of vortioxetine on neurobiochemical metabolites and cognitive of major depressive disorders patients: A 8-week follow-up study / Y. Zhang et al. *J. Affect. Disord.* 2024. Vol. 351. P. 799–807.
6. Emotional Blunting in Depression in the PREDDICT Clinical Trial: Inflammation-Stratified Augmentation of Vortioxetine With Celecoxib / E. Sampson et al. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2024. Vol. 27(3). P. 66.
7. Gastrointestinal side effects associated with antidepressant treatments in patients with major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis / V. Oliva et al. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2021. Vol. 109. P. 110266.
8. Antidepressants and movement disorders: a postmarketing study in the world pharmacovigilance database / A. Revet et. al. *BMC Psychiatry.* 2020. Vol. 20(1). P. 308.
9. Krupa A. J., Wojtasik-Bakalarz K., Siwek M. Vortioxetine — pharmacological properties and use in mood disorders. The current state of knowledge. *M. Psychiatr. Pol.* 2023. Vol. 57(6). P. 1109–1126.

10. Effectiveness and Safety of Vortioxetine for the Treatment of Major Depressive Disorder in the Real World: A Systematic Review and Meta-Analysis / Z. Li et al. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2023. Vol. 26(6). P. 373–384.
11. Vortioxetine for depression in adults: A systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials / X. Yang et al. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2024. Vol. 78(9). P. 536–545.
12. Clinical benefits of vortioxetine 20 mg/day in patients with major depressive disorder / M. C. Christensen et al. *CNS Spectr.* 2023. Vol. 28(6). P. 693–701.
13. Huang I. C., Chang T. S., Chen C., Sung J. Y. Effect of Vortioxetine on Cognitive Impairment in Patients With Major Depressive Disorder: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2022. Vol. 25(12). P. 969–978.
14. Inhibitory mechanism of vortioxetine on CYP450 enzymes in human and rat liver microsomes / Y. Zhan et al. *J. Front Pharmacol.* 2023. Vol. 14. P. 1199548.
15. de Bartolomeis A., Fagiolini A., Maina G. Vortioxetine in the treatment of major depression. *Riv. Psichiatr.* 2016. Vol. 51(6). P. 215–230.
16. Gao S., Xie X., Fan L., Zhang D. Efficacy and safety of vortioxetine (Lu AA21004) in the treatment of adult patients with major depressive disorder: A systematic review and a meta-analysis of randomized controlled trials. *Exp. Ther. Med.* 2023. Vol. 26(5). P. 515.
17. Vortioxetine as adjunctive therapy in the treatment of schizophrenia / S. Redaelli et al. *Ther. Adv. Psychopharmacol.* 2022. Vol. 12. P. 1-9.
18. The dose-response relationship of vortioxetine on major depressive disorder: an umbrella review / P. Wang et al. *Psychiatry Res.* 2024. Vol. 340. P. 116118.
19. Meza N., Leyton F. Vortioxetine for generalised anxiety disorder in adults. *Medwave.* 2021. Vol. 21(3). P. 8172.

20. Structural determinants for activity of the antidepressant vortioxetine at human and rodent 5-HT(3) receptors / U. López-Sánchez et al. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2024. Vol. 31(8). P. 1232–1242.
21. Xue L., Bocharova M., Young A. H., Aarsland D. Cognitive improvement in late-life depression treated with vortioxetine and duloxetine in an eight-week randomized controlled trial: The role of age at first onset and change in depressive symptoms. *J. Affect Disord.* 2024. Vol. 361. P. 74–81.
22. Vortioxetine Treatment for Depression in Alzheimer's Disease: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study / H. W. Jeong et al. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* 2022. Vol. 20(2). P. 311–319.
23. Vortioxetine versus reuptake inhibitors in adults with major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials / E. S. Barbosa et al. *Asian J. Psychiatr.* 2024. Vol. 101. P. 104222.
24. Almeida S. S., Christensen M. C., Simonsen K., Adair M. Effectiveness of vortioxetine in patients with major depressive disorder and co-morbid generalized anxiety disorder in routine clinical practice: A subgroup analysis of the RELIEVE study. *J. Psychopharmacol.* 2023. Vol. 37(3). P. 279–288.
25. Development of the Validated Stability-Indicating Method for the Determination of Vortioxetine in Bulk and Pharmaceutical Formulation by HPLC-DAD, Stress Degradation Kinetics Studies and Detection of Degradation Products by LC-ESI-QTOF-MS / K. Wróblewski et al. *Molecules.* 2022. Vol. 27(6). P. 1883.
26. Douša M., Doubský J., Srbek J. J. Utilization of Photochemically Induced Fluorescence Detection for HPLC Determination of Genotoxic Impurities in the Vortioxetine Manufacturing Process. *J. Chromatogr. Sci.* 2016. Vol. 54(9). P. 1625–1630.
27. Determination of vortioxetine and its degradation product in bulk and tablets, by LC-DAD and MS/MS methods / M. de Diego et al. *Biomed. Chromatogr.* 2018. Vol. 32(11). P. 4340.

28. Simultaneous quantification of vortioxetine, fluoxetine and their metabolites in rat plasma by UPLC-MS/MS / Q. Wang et al. *Biomed. Chromatogr.* 2020. Vol. 34(12). P. 4960.
29. Stability-indicating reversed-phase HPLC method development and characterization of impurities in vortioxetine utilizing LC-MS, IR and NMR / L. Liu et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016. Vol. 117. P. 325–32.
30. Simultaneous determination of deuterated vortioxetine and its major metabolite in human plasma by UPLC-MS/MS and application to a pharmacokinetic study in healthy volunteers / Y. Yi et al. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2020. Vol. 1138. P. 121955.
31. Simultaneous determination of fluoxetine, venlafaxine, vortioxetine and their active metabolites in human plasma by LC-MS/MS using one-step sample preparation procedure / M. Kertys et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2020. Vol. 181. P. 113098.
32. Simultaneous quantification of vortioxetine, carvedilol and its active metabolite 4-hydroxyphenyl carvedilol in rat plasma by UPLC-MS/MS: Application to their pharmacokinetic interaction study / Y. Huang et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016. Vol. 128. P. 184–190.
33. An UPLC-MS/MS method for the quantitation of vortioxetine in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study / E. M. Gu et al. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2015. Vol. 997. P. 70–74.
34. Whole blood and oral fluid microsampling for the monitoring of patients under treatment with antidepressant drugs / C. Marasca et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2020. Vol. 188. P. 113384.
35. HILIC-MS Determination of Genotoxic Impurity of 2-Chloro-N-(2-Chloroethyl)Ethanamine in the Vortioxetine Manufacturing Process / M. Douša et al. *J. Chromatogr. Sci.* 2016. Vol. 54(2). P. 119–124.
36. Comparison of Various Chromatographic Systems for Identification of Vortioxetine in Bulk Drug Substance, Human Serum, Saliva, and Urine

Samples by HPLC-DAD and LC-QTOF-MS / A. Petruczynik et al. *Molecules*. 2020. Vol. 25(11). P. 2483.

37. Uljon S., Kataria Y., Flood J. G. Vortioxetine use may cause false positive immunoassay results for urine methadone. *Clin. Chim. Acta*. 2019. Vol. 499. P. 1–3.
38. Green synthesis of Au@g-C(3)N(4) nanocomposite using Hyssopus officinalis extract and its sensing application for vortioxetine determination / Y. Khoshnavaz et al. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2023. Vol. 30(33). P. 80085–80093.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

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



СЕРТИФІКАТ №328

Цим засвідчується, що

Круницька С.

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.



Алла КОТВИЦЬКА

Інна ВЛАДИМИРОВА