

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

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему: РОЗРОБКА МЕТОДІВ ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНОГО
АНАЛІЗУ ДОКСЕПІНУ В БІОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ**

Виконала: здобувачка вищої освіти групи

Фм20(4,6з) мед-01а

спеціальності: 226 Фармація, промислова фармація

освітньої програми Фармація

Ганна ЯРОШКО

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

Сергій БАЮРКА

Рецензент: професор закладу вищої освіти кафедри
клінічної фармакології ІПКСФ, д.фарм.н., професор

Ілля ПОДОЛЬСЬКИЙ

АНОТАЦІЯ

Метою роботи є розробка методів хіміко-токсикологічного аналізу лікарського препарату антидепресивної дії докsepіну в біологічних рідинах та біологічному матеріалі шляхом розробки оптимальних умов пробопідготовки біологічних об'єктів та методик виявлення, ідентифікації та кількісного визначення аналіту методами тонкошарової хроматографії, хімічних реакцій та абсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій ділянці спектру. Робота загальним об'ємом 47 сторінок, вона включає 5 розділів, висновки, 6 таблиць, 2 рисунки, 33 джерела літератури.

Ключові слова: докsepін, біологічні рідини, біологічний матеріал, виділення, спектрофотометрія.

ANNOTATION

The aim of the work is to develop methods for the chemical and toxicological analysis of the antidepressant drug Doxepin in biological fluids and biological material by developing the optimal conditions for sample preparation of the biological samples and methods for detection, identification and quantitative determination of the analyte using thin-layer chromatography, chemical reactions and absorption spectrophotometry in the ultraviolet region of the spectrum. The work consists of 47 pages, 5 chapters, conclusions, 6 tables, 2 figures, 33 sources.

Key words: Doxepin, biological fluids, biological material, secretions, spectrophotometry.

З М І С Т

ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ І. ФАРМАКОЛОГІЯ ТА ТОКСИКОЛОГІЯ ДОКСЕПІНУ. МЕТОДИ АНАЛІТИЧНОГО КОНТРОЛЮ ДОКСЕПІНУ В ОБ'ЄКТАХ БІОЛОГІЧНОГО ПОХОДЖЕННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	10
1.1. Доксепін. Основні фізико-хімічні властивості.....	10
1.2. Фармакодинаміка доксепіну.....	11
1.3. Токсичні властивості доксепіну.....	12
1.4. Методи виявлення та ідентифікації доксепіну.....	14
Висновки до розділу І.....	19
РОЗДІЛ ІІ. ОБГРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ОБ'ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МЕТОДІВ АНАЛІЗУ.....	21
2.1. Об'єкт дослідження.....	21
2.2. Матеріали та методи.....	21
РОЗДІЛ ІІІ. РОЗРОБКА МЕТОДІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ДОКСЕПІНУ.....	23
3.1. Виявлення доксепіну за допомогою кольорових експрес реакцій.....	23
3.2. Виявлення доксепіну методом хроматографії в тонких шарах сорбенту.....	25
3.3. Ідентифікація доксепіну УФ-спектрофотометричним методом.....	27
Висновки до розділу ІІІ.....	28
РОЗДІЛ ІV. РОЗРОБКА МЕТОДУ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДОКСЕПІНУ.....	30
4.1. Розробка методу кількісного визначення доксепіну УФ- спектрофотометричним методом.....	30
Висновки до розділу ІV.....	35

РОЗДІЛ V. ВИВЧЕННЯ УМОВ ІЗОЛЮВАННЯ ДОКСЕПІНУ З	
БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ТА БІОЛОГІЧНИХ	
РІДИН.....	36
5.1. Екстракція доксепіну з водних розчинів.....	36
5.2. Розробка методу виділення доксепіну з модельної	
крові.....	38
5.3. Ізолювання доксепіну з печінки підкисленою водою та	
підкисленим спиртом етиловим.....	41
Висновки до розділу V.....	44
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ.....	46
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	48
ДОДАТКИ.....	52

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

Трициклічні антидепресанти	ТЦА
N-метил-D-аспартат	NMDA
Cytochrome P450 family 2 subfamily D member 6 (білок, що кодується однойменним геном 22 хромосоми людини)	CYP2D6
Тонкошарова хроматографія	ТШХ
Ультрафіолетовий спектр	УФ-спектр
Робочий стандартний розчин	РСР
Стандартний розчин	СР
Ультрависокоєфективна рідинна хроматографія з подвійним мас-спектрометричним детектуванням	УВЕРХ-МС/МС
Газо-рідинна хроматографія з подвійним мас-спектрометричним детектуванням	ГРХ-МС/МС
Limit of detection (межа виявлення)	LOD
Limit of quantitation (межа кількісного визначення)	LOQ

ВСТУП

Актуальність теми. Антидепресанти є одними із найчастіше вживаних груп лікарських препаратів. За даними ряду досліджень, застосування антидепресантів особливо швидко збільшується протягом останніх десятиліть. У деяких країнах світу протягом останніх кількох років використання цих засобів зросло більш ніж удвічі. Кожен десятий житель США віком від 12 років приймає антидепресанти, причому дві третини з них не мають симптомів депресії. Тривожні та стрес-зумовлені розлади, фобії та розлади харчової поведінки, функціональні розлади шлунково-кишкового тракту та сечовипускання, численні больові синдроми, зокрема, мігрень, нейропатичний та хронічний біль, алергічні прояви, порушення сну є далеко не повним переліком показань до призначення антидепресантів. Попри те, що ці лікарські засоби є третіми за частотою в списку призначень і посідають четверте місце серед найбільш вживаних, виникають питання щодо ефективності та клінічної значущості трициклічних антидепресантів (ТЦА) при лікуванні депресій та ряду соматичних захворювань.

Окрім зазначеного, антидепресанти мають ряд серйозних побічних ефектів та важких ускладнень як наслідків терапії лікарськими препаратами вказаної групи. Випадки зловживань антидепресантами, їх вживання на фоні алкоголю, наркотичних засобів, взаємодія з іншими психотропними препаратами часто ставали причиною важких гострих та летальних інтоксикацій тимолептиками. Зловживання ними при підвищеній чутливості організму можуть призвести до отруєнь різного ступеню тяжкості.

Аналіз епідеміології інтоксикацій препаратами психотропної дії показує, що вони становлять близько 42 % серед інтоксикацій лікарським засобами інших фармакологічних груп.

Серед трициклічних антидепресантів одним з найбільш токсикологічно значимих представників цієї групи лікарських засобів є докsepін. Тривалий та безконтрольний прийом вказаного препарату часто супроводжується

розвитком побічних реакцій у вигляді проявів кардіотоксичності, екстрапірамідних порушень, дезорієнтації, сплутаності свідомості.

Аналіз джерел літератури показує, що методи хіміко-токсикологічного аналізу докsepіну в об'єктах біологічного походження (тканини та органи труп, біологічні рідини) з метою їх використання при проведенні біоаналітичних досліджень розроблені не повною мірою. В свою чергу, проведення заходів лабораторної експрес-діагностики гострих інтоксикацій медикаментами дозволяє діагностувати отруєння та являє собою важливу складову у боротьбі з проявами немедичного використання лікарських засобів. Зважаючи на зазначене, розробка умов ізолювання докsepіну з об'єктів біологічного походження з наступним опрацюванням оптимальних умов ідентифікації та кількісного визначення докsepіну в біологічних екстрактах являє собою важливе завдання судової токсикології.

Мета дослідження. Розробка методів ізолювання сучасного антидепресанту докsepіну з біологічного матеріалу (модельна печінка) та з крові за допомогою загальних методів виділення лікарських речовин настоюванням, проведення очистки екстрактів від ендогенних домішок та дослідження зазначеного антидепресанту в біологічних витягах з використанням хімічного, хроматографічного та спектрального методів аналізу, призначених для використання при виконанні спрямованих хіміко-токсикологічних досліджень на вміст в об'єктах аналізу докsepіну.

Завдання дослідження. На етапі плануванні магістерської роботи нами були поставлені до опрацювання такі завдання:

1. узагальнити та систематизувати відповідні дані доступної нам наукової літератури щодо фізичних, хімічних та токсичних властивостей докsepіну, сучасних селективних та високочутливих методів його детектування в біологічних матрицях різного походження;
2. запропонувати чутливі та достатньо селективні методи ідентифікації докsepіну з використанням кольорових експрес-реактивів,

- хроматографії в тонких шарах сорбенту та методу абсорбційної спектрофотометрії в УФ-ділянці спектру;
3. розробити умови проведення кількісного визначення докsepіну в біологічних витягах з печінки та крові методом УФ-спектрофотометрії;
 4. дослідити умови рідинно-рідинної екстракції докsepіну з водних розчинів за допомогою найбільш вживаних при проведенні хіміко-токсикологічних досліджень органічних екстрагентів при різних значеннях рН середовища;
 5. запропонувати ефективні умови ізолювання докsepіну з модельних проб секційного матеріалу та крові, придатні для проведення токсикологічних експертних досліджень судової токсикології.

Об'єкт дослідження. Спрямоване хіміко-токсикологічне дослідження трициклічного антидепресанту докsepіну.

Предмет дослідження. Встановлення можливості застосування методу хромогенних реакцій, ТШХ, УФ-спектрофотометрії для токсикологічного дослідження біологічних об'єктів на вміст антидепресанту докsepіну.

Методи дослідження. Хіміко-токсикологічний аналіз об'єктів біологічного походження на присутність докsepіну з використанням хімічного методу, хроматографії в тонкому шарі сорбенту та абсорбційна УФ-спектрофотометрія.

Практичне значення отриманих результатів. Запропоновано системний підхід до проведення хіміко-токсикологічного дослідження біоматеріалу на вміст докsepіну.

Елементи наукових досліджень. Вперше досліджено взаємодію докsepіну з хромогенними реактивами, що використовуються на етапі скринінгових досліджень та встановлено їх чутливість. Вперше вивчено хроматографічну рухливість докsepіну в умовах проведення систематичного скринінгу сильнодіючих, основних груп психотропних та наркотичних лікарських речовин. Вперше вивчено екстрагуючу спроможність ряду органічних екстрагентів по відношенню до докsepіну та встановлено ступінь

екстракції вказаного тимолептичного засобу при різних значеннях рН досліджуваного середовища.

Апробація результатів дослідження і публікації. Результати досліджень висвітлено в тезах: Ярошко Г. С., Баюрка С. В. Виділення докsepіну з біологічного матеріалу. *Modern chemistry of medicines*: матеріали Міжнар. Internet-конф., м. Харків, 25 верес. 2024 р. Харків: НФаУ. С. 143.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи. Кваліфікаційна магістерська робота включає вступну частину, огляду даних наукової фахової літератури, вибір об'єктів та методів дослідження, трьох розділів експериментальних досліджень, загальних висновків, списку використаних наукових джерел літератури. Магістерську роботу викладено на 47 сторінках, яка включає 6 таблиць, 2 рисунки та містить 33 літературні джерела.

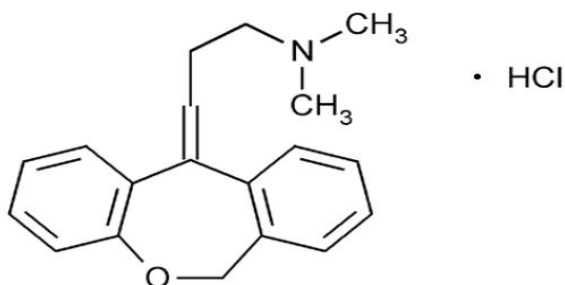
РОЗДІЛ 1

ФАРМАКОЛОГІЯ ТА ТОКСИКОЛОГІЯ ДОКСЕПІНУ. МЕТОДИ АНАЛІТИЧНОГО КОНТРОЛЮ ДОКСЕПІНУ В ОБ'ЄКТАХ БІОЛОГІЧНОГО ПОХОДЖЕННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Доксепін було отримано в 1963 р. німецьким науковцем Стахом. З цього ж року препарат використовувався як антидепресант у деяких німецьких психіатричних лікарнях, а згодом лікарський засіб було зареєстровано в Німеччині та деяких інших європейських країнах як ефективний препарат для фармакокорекції депресій. За хімічною будовою доксепін є трициклічним антидепресантом, що використовується у всьому світі для терапії депресивних порушень, які супроводжується ажитацією та тривожністю. Доксепін посідає третє місце за кількістю призначень серед групи трициклічних антидепресантів при лікуванні захворювань на депресію середнього та важкого ступеню тяжкості [1–4]. До теперішнього часу фармакологічні властивості та токсикологія доксепіну є об'єктами уваги медиків і науковців у багатьох країнах світу.

1.1. Доксепін. Основні фізико-хімічні властивості

Доксепін – (3-Дибенз *[b, e]* оксепін-11 (6H)-іліден-*N, N*-диметил-1-пропанаміну гідрохлорид) являє собою класичний трициклічний антидепресант групи дибензоксепіну:



М. м. 315,84

Медичного використання набув гідрохлорид докsepіну, що являє собою суміш цис- та транс-ізомерів (у співвідношенні 15 до 85). Зазначене співвідношення обумовлене каталітичною рівновагою останнього етапу синтезу антидепресанту. Цис-ізомер докsepіну є фармакологічно більш активним.

Докsepін є білим кристалічним порошком, який добре розчиняється у воді, хлороформі та спирті. Властивості органічної основи докsepіну надає третинна аміногрупа аліфатичного ланцюгу.

Основним продуктом метаболічного перетворення докsepіну в організмі людини є дезметилдокsepін, що утворюється при взаємодії з системою Цитохрому 450 печінки та має антидепресивну активність.

1.2. Фармакодинаміка докsepіну

Докsepін володіє мультимодальним спектром фармакологічної дії, пов'язаним із взаємодією препарату з різними системами рецепторів організму [1-4]. Докsepін чинить потужну анксиолітичну та антидепресивну дію через невідбиркове інгібування процесу зворотнього захвату серотоніну та норадреналіну [5-7], володіє токсичністю [8-9], препарат є потужним антагоністом рецепторів H1 та H2 [10-12]. Докsepін володіє анальгетичною дією через інгібуючий вплив на рецептори спинного мозку системи N-метил-D-аспартат [10]. Побічним ефектом дії докsepіну є антихолінергічний ефект, симптомами якого є сухість у ротовій порожнині, затримка сечовиділення, подразнення шкіри та тахікардія [3-5, 9].

Докsepін є допінгом, що заборонений для використання у спорті, препарат підлягає допінг-контролю.

Основними показаннями для медичного вживання докsepіну є наступні види патологій: депресивні прояви з тривожністю та розвитком панічних нападів) [1-4]. Лікування починають з дозуванням 75 мг. Максимальна разова доза докsepіну становить 100 мг; у тому числі при дерматологічних запальних процесах у вигляді розвитку екзем, кропив'янки, та atopічних дерматитів. Вказаний препарат часто використовується як засіб у комплексній терапії

захворювань пацієнтів, що потерпають від больового синдрому (онкологічні захворювання, нейропатії та ін.) [1–2, 4]. Взагалі, фармакокінетика докsepіну часто має індивідуальну мінливість через відмінності в біотрансформації препарату в печінці людини.

1.3. Токсичні властивості докsepіну

Терапія трициклічними антидепресантами, в тому числі і докsepіном, може супроводжуватись побічною дією, що здатна іноді виникати при вживанні терапевтичних доз препарату [1–4]. Клінічними проявами таких станів є затримка сечовиділення, розвиток аритмій, судомні напади та порушення функцій травної системи [9]. Дуже часто отруєння докsepіном характеризуються гіпотензією, тахікардією, тяжкою формою ажитації та розвитком коматозного стану. Летальність при інтоксикаціях докsepіном є достатньо високою та пояснюється пригніченням діяльності серцево-судинної системи або зупинкою дихання. Кардіотоксичність препарату обумовлена тим, що докsepін впливає на інервацію міокарду за типом хінідину.

Рівень терапевтичної концентрації докsepіну в крові складає 0,025-0,18 мг/л, а прояв токсичної дії препарату має місце у випадку, коли вміст у вказаній біологічній рідині втричі більший від верхньої межі терапевтичного діапазону. Процес терапевтичного лікарського моніторингу вмісту докsepіну супроводжується вимірюванням і кількості його основного метаболіту дезметилдокsepіну (нордокsepіну), а співвідношення відповідних концентрацій докsepін/нордокsepін, яке перевищує 2, свідчить про гостре отруєння [10, 13].

Показано, що вміст докsepіну завжди вищий за вміст нордокsepіну, що пояснюється властивостями метаболіту: він є більш ліпофільним у порівнянні з нативним препаратом [6, 14].

Проведене Z. Wei дослідження випадку комбінованого летального отруєння сульпіридом та докsepіном показало вміст зазначених ксенобіотиків в зразках розтину та біологічних рідинах людини. Рівень докsepіну складав: жовч 15,6 мкг/мл, серцева кров 16,1 мкг/мл; кров, взята із підключичної вени

9,2 мкг/мл; серце 3,7 мкг/г; жовч 15,6 мкг/мл; печінка 74,9 мкг/г; тканина легенів 54,5 мкг/г; тканини нирок 15,0 мкг/г; мозок 4,3 мкг/г та шлунок із вмістом 38,2 мкг/мл.

До теперішнього часу чітко не визначено смертельну дозу докsepінової інтоксикації. Наведені в літературі дані про летальний вміст зазначеного антидепресанту в крові людини, яка коливалась у межах від 0,5 до 29 мг/л, але при цьому нічого не вказувалось про місце взяття зразка біологічної рідини. Окрім того, приведений досить широкий діапазон концентрацій вказує на те, що складно встановити: абсолютний чи стандартизований показник концентрації антидепресанту при летальній інтоксикації?

В іншому дослідженні автор А. Dettling з'ясовувала можливість приймати визначені показники вмісту докsepіну та нордокsepіну як підтвердження можливості робити висновок про смертельне отруєння. Автор стверджувала про факт того, що вміст докsepіну в крові міокарду вп'ятеро перевищував цей показник у порівнянні з кров'ю стегневої вени. Така значна відмінність іноді пояснюється процесом перерозподілу. Зазначений термін стосується посмертних особливостей перерозподілу ксенобіотику поміж різного роду порожнинами, наслідком чого є значна зміна рівня концентрацій в органах та тканинах трупу. Характер та рівень таких змін вмісту докsepіну визначається проміжком часу, що пройшов з моменту загибелі людини від отруєння, та часом відбору зразка.

Докsepін не має сталого тимолептичного ефекту через певні фармакокінетичні особливості, пов'язані зі ступенем проникненості препарату до спинномозкової рідини, яка залежить від можливості проникати крізь гематоенцефалічний бар'єр людини. Але R. Schomburg довів, що проникненість докsepіну через гематоенцефалічний бар'єр є сталою і практично незмінною. Саме через це терапевтична дія докsepіну об'єктивно не може бути пояснена різнорівневим проникненням через гематоенцефалічний бар'єр.

Іншим автором Koski A. зроблено припущення про можливий поліморфізм окремого гену системи Цитохрому, що сприятиме збільшенню вирогідності отруєння антидепресантами, і докsepіном, зокрема. Автором зафіксовано декілька випадків летальної інтоксикації вказаним антидепресантом, а постраждалі мали абсолютно нефункціональну форму генотипу CYP2D6. Крім зазначеного чинника, докsepін є сумішшю цис- та транс-ізомерів препарату, а фармакологічно активним є цис-ізомер лікарського засобу. Окрема категорія хворих має слабку здатність ферментної системи організму перетворювати транс-форму на цис-форму препарату, чим і пояснюється значне зниження терапевтичного ефекту.

Докsepін значною мірою впливає на когнітивні функції людини та здатен знижувати увагу при виконанні певних видів діяльності [15].

Через відсутність ін'єкційної форми докsepіну абсолютна біодоступність антидепресанту є невідомою. Протягом 3–4 год (перорально) після надходження докsepіну максимумами концентрації в крові досягають рівня 8,6 – 45,4 нг/мл. Середній період напіввиведення нативного препарату та нордокsepіну становить 16,8 та 51,1 год відповідно. Препарат легко всмоктується в тонкому кишечнику, він характеризується низьким рівнем біодоступності, що пояснюється високим ефектом першого проходження докsepіну. Об'єм розподілу препарату складає 9 – 31 л / кг.

Докsepін є ліпофільним препаратом, який досить легко проникає через гематоенцефалічний бар'єр людини, він також потрапляє до грудного молока, кумулює в м'язах, печінці та нирках. Докsepін і дезметилдокsepін на 80–90 % зв'язуються з білками крові, сталий рівень нативної речовини та метаболіту в крові встановлюється після двох тижнів вживання терапевтичної дози антидепресанту. З організму людини докsepін і його метаболіти виводяться нирками та з жовчю через шлунково-кишковий тракт.

1.4. Методи виявлення та ідентифікації докsepіну

Сучасні методики детектування та визначення кількісного вмісту докsepіну в крові людини запропоновано для моніторингу при проведенні

терапевтичного лікарського моніторингу рівня вмісту докsepіну та його основного метаболіту в крові, що пов'язано з вузьким терапевтичним діапазоном дозувань антидепресанту та відповідною необхідністю здійснення моніторингу вмісту докsepіну в крові хворих [16].

Превалюючими методами виявлення та визначення докsepіну в біосередовищах організму, що наведені в джерелах літератури, є газова [17], та рідинна хроматографія [18–21], з різноманітними типами детектування, а також спектральні та електрохімічні методи аналізу [22]. При цьому, як об'єкти для біоаналітичних досліджень, переважно використовували кров (плазму) людини, ротову рідину [20], сечу [15] та спинномозкову рідину [14].

У дослідженні Frigerio наведені результати визначення докsepіну та його метаболітів у плазмі крові лабораторних тварин (щури) методом газо-рідинної хроматографії з використанням мас-фрагментографічного детектування. Автором показано селективність методики проведеного дослідження та відсутність впливу на нього чисельних ендогенних субстратів та чутливість методики до терапевтичного діапазону концентрацій докsepіну, що встановлюється в крові після разового вживання препарату.

Іншим автором Farjami запропоновано методику визначення докsepіну в біорідинах людини (сеча, кров) на основі методу газо-рідинної хроматографії сумісно з мас-спектрометричним типом детектування [22].

В роботі A. Negruszl виконано дослідження з визначення докsepіну та нордокsepіну в волоссі хворого чоловіка, який за медичним призначенням вживав докsepін одноразово за добу (по 25 мг) тривалістю понад п'ять місяців. Пробопідготовку зразків волосся виконували за допомогою методу твердофазної екстракції, дослідження проведено методом газо-рідинної хроматографії з селективним мас-спектрометричним детектуванням. Встановлена чутливість методики визначення нативної речовини та його основного метаболіту складала 0,25 нг/мг. Виконані фармакокінетичні дослідження докsepіну засвідчили, що впродовж першого місяця терапії нативна форма препарату та продукт його деметилування не виявлялись.

Максимальний рівень вмісту вказаних ксенобіотиків спостерігався після п'ятого місяця вживання антидепресанту (0,59 та 0,40 нг/мг для докsepіну та нордокsepіну, відповідно), при цьому вміст докsepіну завжди був вищим за вміст його продукту біотрансформації. Автором показано, що за півроку після припинення фармакотерапії досліджуваний антидепресант та його продукт метаболічного перетворення виявлялись у зразках волосся хворого.

Інтоксикації лікарськими препаратами антидепресивної дії можуть відбуватись на фоні вживання інших психотропних препаратів, тому важливим є розробка методик їх визначення за умов одночасної присутності в біорідинах людини інших сильнодіючих засобів, в тому числі, й антидепресантів. Дослідження W. Ma [23] присвячено одночасному виявленню в крові людини тринадцяти тимолептиків, в тому числі, й докsepіну, за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії з високоселективним подвійним мас-спектрометричним детектуванням. Встановлено межі виявлення та кількісного визначення досліджуваних антидепресантів після попередньої ретельної пробопідготовки біологічної рідини.

Варіант обернено-фазного рідинного хроматографічного визначення запропоновано Kabra при проведенні аналітичного контролю для терапевтичного лікарського моніторингу трициклічних антидепресантів докsepіну, іміпраміну та амітриптиліну в плазмі крові людини. Встановлена чутливість методики склала 5 нг/мл до кожного аналіту.

Запропоновано методику S. Rana газо-хроматографічного визначення з мас-спектрометричним типом детектування антидепресантів та продуктів їх біотрансформації в сечі людини (докsepін, дезіпрамін, нортриптилін, амітриптилін, іміпрамін, мапротилін). Значення меж виявлення та кількісного визначення докsepіну складала 50 та 100 нг/мл відповідно.

Більшість селективних методів кількісного визначення докsepіну та декількох його продуктів метаболічних перетворень стосуються досліджень цільної крові у крові людини. Авторами Faulkner та Lee з метою

моніторингових досліджень концентрацій докsepіну та нордокsepіну в цільній крові людини було порівняно ефективність методів інструментальної рідинної хроматографії та хроматографії в тонкому шарі сорбенту. Показано, що перевагою методу рідинної хроматографії є значно вища чутливість та відтворюваність методики.

Дослідженнями Groot та співробітників опрацьовано методики кількісної аналітичної оцінки вмісту докsepіну сумісно з його декількома метаболітами та ізомерами в крові людини, яка вживала по 25 мг препарату, тричі за добу, методом газо-адсорбційної (полум'янево-іонізаційний тип детектору) та газо-рідинної хроматографії [33]. Авторами показано високу чутливість та специфічність розробленої методики.

В іншій роботі з досліджень проб сечі пацієнту на присутність докsepіну використано метод газової хроматографії та абсорбційної спектрофотометрії в УФ-ділянці. Метод газо-адсорбційної хроматографії дозволяє детектувати близько 0,1 нг/мл антидепресанту в біорідині хворого після вживання терапевтичної дози докsepіну протягом доби.

Виконано рандомізоване дослідження з виявлення та кількісної оцінки вмісту докsepіну в біорідинах за участі 25 волонтерів за допомогою спектрофотометричного методу. Вказано на низьку селективність обраного методу, хоч він і характеризувався експресністю та достатньою відтворюваністю, а також охоплював переважну більшість метаболітів докsepіну у порівнянні з хроматографічним методом.

Метод електромембранної екстракції у сполученні з методом ультрависокоєфективної рідинної хроматографії запропоновано T. Skaalvik для визначення докsepіну в сироватці крові [25].

В ряді інших досліджень запропоновано визначення докsepіну методом рідинної хроматографії при виконанні досліджень з вивчення рецепторної активності докsepіну [26], при біоаналітичних дослідженнях докsepіну та

нордоксепіну [27], при визначенні терапевтичних компонентів в косметології [28].

T. Venga Mendes запропонував визначення ряду антидепресантів, в тому числі доксепіну, та антипсихотичних препаратів в зразках плазми людини з використанням магнітних вуглецевих нанотрубок [29].

Автором J. Geogin розроблено достатньо чутливий метод визначення доксепіну в плазмі людини після дериватизації вказаного антидепресанту з еозином Y [30] та наступним його визначенням спектрофлуориметричним методом.

Дослідження Neukamta присвячено визначенню доксепіну в цільній крові людини, взятій із вени стегна, за допомогою високоефективної рідинної хроматографії з мас-спектрометричним типом детектування. Об'єктом дослідження була посмертна кров пацієнтки, що одночасно перорально вживала вісімнадцять лікарських препаратів різних фармакологічних груп, зокрема, доксепіну, метопрололу, амлодипіну, ібупрофену.

Автором S. Shin опрацьовано високоселективний метод одночасного визначення 18 антидепресантів (в т. ч. доксепіну) в біорідині людини методом рідинної хроматографії з попереднім проведенням концентрування препарату з досліджуваних проб методом твердофазної екстракції [31].

В роботі F. Kashi запропоновано високочутливий електрохімічний біосенсор для детектування тразодону та доксепіну в зразках біологічного та небіологічного походження [32].

В роботі Maes проаналізовано чотири випадки летальної інтоксикації доксепіном та результати визначення вмісту його концентрації в зразках секційного матеріалу (тканина нирок, селезінки, легенів, печінки) та біорідин (жовч, кров, сеча). Метод газо-рідинної хроматографії у сполученні з мас-спектрометрією використано для кількісного визначення транс- та цис-ізомерів доксепіну, а також N-оксиду антидепресанту та дезметилдоксепіну.

При цьому слід зазначити, що для усіх чотирьох випадків отруєння суттєвих відмінностей щодо вмісту антидепресанту не було, а його максимальний рівень спостерігався в нирках при мінімальному в тканинах легенів.

З метою контролю за вмістом у лікарських формах докsepіну запропоновано методи спектрофлюориметрії, полярографії (на ртутному капаючому електроді) та спектрофотометрії в ультрафіолетовій ділянці спектру. Метод абсорбційної спектрофотометрії використано для кількісної оцінки вмісту досліджуваного антидепресанту в капсулах.

Автором розроблено метод спектрофлюориметрії в кислому середовищі на основі реакції докsepіну з алізарином червоним. Метод є специфічним в присутності компонентів лікарської форми препарату, межа виявлення докsepіну 0,55 нг/мл.

Автором представлено результати комплексного дослідження в галузі екології стосовно наявності, стійкості та можливої гідролізуємості семи трициклічних антидепресантів, в тому числі докsepіну, у воді з використанням високочутливих інструментальних хроматографічних методів аналізу [33]. Зазначено, що вказані лікарські препарати виявлялись у «слідових» кількостях навіть у додатково очищеній воді.

Висновки до розділу I

1. Докsepін широко використовується в психофармакології для лікування захворювань на депресію. Побічні ефекти докsepіну обумовлені особливостями метаболізму препарату в печінці, що може впливати на прояв токсичності зазначеного антидепресанту.
2. Проведений аналіз наукових публікацій останніх років щодо аналітичних методів визначення докsepіну стосуються на застосуванні варіантів колонкової хроматографії та попередньої підготовки зразка проби методами рідинної мікроекстракції (онлайн режим) для отримання об'єктивних результатів, що обмежує їх використання через високу вартість обладнання.

3. Дані з опрацьованих методів хіміко-токсикологічного аналізу докsepіну, що є придатними для практичного застосування при біоаналітичних дослідженнях у судовій токсикології, є малочисельними та не систематичними, через що існує необхідність їх подальшого розроблення.

РОЗДІЛ II

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ ОБ'ЄКТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА МЕТОДІВ АНАЛІЗУ

2.1. Об'єкт дослідження

Об'єкт дослідження – субстанція докsepіну гідрохлориду, отримана шляхом її виділення з лікарської форми (капсули) «Докsepін» (10 мг №10), Teva Operations (Poland). Виділяли докsepін наступним чином: вміст 10 капсул розтирали в скляній ступці при додаванні 20 мл діетилового етеру, суміш профільтровували. Етерний фільтрат відкидали, а залишок на паперовому складчастому фільтрі підсушували та розтирали у скляній ступці при додаванні 20 мл хлороформу. Отриманий розчин профільтровували крізь складчастий паперовий фільтр до кварцової чашки та випаровували розчинник. Отриманий висушений залишок зважували.

2.2. Матеріали та методи

1. Хромогенні реактиви.
2. Кислота сульфатна концентрована (Merk, ЧДА).
3. Кислота нітратна концентрована (Merk, ЧДА).
4. Кислота перхлоратна концентрована (Merk, ЧДА).

5. Модифікований (по Муньє) реактив Драгендорфа. 0,85 г нітрату основного бісмуту розчиняли в 20 мл льодяної кислоти ацетатної та потім додавали при перемішуванні 40 мл бідистильованої води. До отриманого розчину додавали 20 мл води, що містила 8 г калій йодиду. Для обробки хроматографічних пластин 1 мл отриманого розчину розбавляли 2 мл льодяної кислоти ацетатної та 10 мл бідистильованої води.

Набір скляних хроматографічних камер об'ємом 2000 см³.

Пластини ВЕТШХ (силікагель), розмір 10×10 см, шар 130 мкм, фракція 10÷25 мкм.

Пластини Сорбфіл (силікагель), розмір 5×10 см, шар 120 мкм, фракція 10÷15 мкм.

Пластини Silufol (силікагель) (Чехія), розмір 5×15 см, сорбент.

Пластини Армсорб (силікагель), розмір 5×20 см, шар 80 мкм, фракція 20÷35 мкм.

Капіляри скляні.

Ацетатний буфер. Розчин А. 6,05 г льодяної кислоти ацетатної розчиняли при перемішуванні в 500 мл бідистиляту (вода). Розчин Б. 8,2 г натрій ацетату (безводний) розчиняли в 500 мл бідистиляту (вода). Розчини А та Б змішували у співвідношенні 51:49.

Буфер універсальний Бріттона-Робінсона. Розчин А. 24,72 г кислоти борної при перемішуванні розчиняли в 500 мл гарячого бідистилляту (вода). До отриманого розчину вносили 23 мл кислоти ацетатної льодяної та 21 мл 80 % кислоти ортофосфатної. Об'єм суміші доводили бідистильованою водою до 1000 мл. Розчин Б. 37,4 мл 0,2 М розчину натрій гідроксиду доводили бідистильованою водою до 1000 мл. Змішували розчини А та Б до отримання необхідного значення рН.

РОЗДІЛ III. РОЗРОБКА МЕТОДІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ДОКСЕПІНУ

3.1. Виявлення доксепіну за допомогою кольорових експрес реакцій

Для сучасного етапу розвитку біоаналітичних досліджень характерним є активне використання високоспецифічних та найбільш чутливих інструментальних методів аналізу, насамперед, методів колонкової хроматографії з різними типами детектування сигналів аналітів, що забезпечує отримання об'єктивних результатів хіміко-токсикологічних досліджень. Але використання хімічного методу виявлення лікарських отрут, зокрема, кольорових експрес-тестів на попередньому етапі проведення токсикологічного скринінгу екстрактів з біологічного матеріалу та біологічних рідин, не втратило актуальності через їх простоту, доступність, експресність та дуже часто достатній рівень чутливості виявлення ксенобіотиків. В своїй роботі нами було вивчено можливість використання кольорових реакцій для виявлення доксепіну в біологічних екстрактах не тільки для ідентифікації вказаного препарату, а також як спосіб детектування досліджуваного антидепресанту на хроматографічних пластинах.

Методика виявлення доксепіну за допомогою кольорових експрес-реактивів. На хроматографічну пластину попередньо відкаліброваним мікрокапіляром наносили стандартний розчин доксепіну в етиловому спирті (зі вмістом антидепресанту від 0,05 до 40 мкг у пробі). Після випаровування органічного розчинника на повітрі додавали до отриманого залишку одну-дві краплі обраного хромогенного експрес-реактиву та одразу відмічали характер забарвлення та його зміну протягом декількох хвилин. Паралельно встановлювали чутливість виявлення доксепіну за результатами виконаних реакцій. Отримані при цьому результати детектування препарату за допомогою хромогенних експрес-реактивів наведено у табл. 3.1.

Як видно з наведених нами даних, найвищу чутливість стосовно виявлення докsepіну показали реактиви Лібермана та Фреде (чутливість 1,5 мкг препарату в пробі).

Таблиця 3.1

Результати реакцій виявлення докsepіну за допомогою кольорових експрес-реактивів

№ з/п	Хромогенний реактив		Результати виявлення	
			Забарвлення	Межа виявлення, мкг
1	УФ-світло	$\lambda - 254 \text{ нм}$	Н.ф. ¹	—
		$\lambda - 365 \text{ нм}$	Н.ф. ¹	—
2	Реактив Маркі		Червоне	2,5
3	Реактив Лібермана		Зелене	1,5
4	Реактив Фреде		Синьо-зелене	1,5
5	Реактив Манделіна		Блакитне, що змінюється на червоне	3,0
6	Реактив Ерדмана		Буре, що змінюється на зелене	3,0
7	Кислота сульфатна концентрована		Жовте	8,0
8	Кислота нітратна концентрована		Н.з. ²	—
9	Кислота хлоридна концентрована		Н.з. ²	—

¹Не має флюоресценції; ²Не утворює забарвлення.

3.2. Виявлення докsepіну методом хроматографії в тонких шарах сорбенту

Використання методу хроматографії в тонких шарах сорбенту має очевидну перевагу, пов'язану з тим, що він поєднує не лише процес ідентифікації токсиканту, а дає можливість провести додаткову очистку досліджуваного біологічного екстракту від небажаної присутності ендогенних супутніх домішок з секційного матеріалу та біорідин. Можливість проведення процесу одночасного виявлення декількох аналітів являє собою чи не найважливішу перевагу ТШХ-методу, адже причиною інтоксикацій іноді є сумісне надходження різних лікарських препаратів. Для підготовки хроматографічних пластин до досліджень їх попередньо розвивали в рухомій фазі етанол, а потім висушували в термостаті при $t=120^{\circ}\text{C}$ на протязі 45 хв. В дослідженні було використано як рухомі фази такі, що рекомендовані Міжнародною асоціацією токсикологів для проведення попереднього етапу систематичного скринінгу, так і інші рухомі фази, що використовуються у вітчизняній практиці проведення хіміко-токсикологічних досліджень.

Перед проведенням усіх хроматографувань до хроматографічних камер додавали 40 мл відповідних рухомих фаз та насичували їх протягом 15 хв. Після цього, за 1,5 см від нижнього краю хроматографічної пластинки олівцем, акуратно, не натискаючи на шар сорбенту, відмічали лінію старту та місця нанесення проб. Довжина пробігу суміші рухомих розчинників для усіх типів пластин становила 10 см. На лінію старту кожної з хроматографічних пластинок скляним мікрокапіляром обережно, не пошкоджуючи сорбент, наносили спиртові розчини докsepіну, що містили від 2,0 до 10,0 мкг препарату в досліджуваній пробі та вміщували їх до хроматографічних камер. Після того, як рухомі розчинники досягали лінії фінішу, пластини виймали з камер та висушували. Плями докsepіну виявляли за допомогою реактиву Драгендорфа (для обробки хроматограм за Мун'є) (спостерігали оранжеві плями антидепресанту на жовтому фоні пластини) та кольоровими реактиви.

Результати зі встановлення хроматографічної рухливості докsepіну в модельних розчинах препарату представлено в табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Значення величин R_f докsepіну в різних рухомих фазах та шарах сорбенту

№ з/п	Рухомі фази, що запропоновані для систематичного скринінгу*	Значення величини R_f на різних типах пластин**			
		I	II	III	IV
*TIAFT					
1	Хлороформ–ацетон (8:2)	0,02	0,01	0	0,04
2	Хлороформ–метанол (9:1)	0,22	0,25	0,11	0,16
3	Метанол–25% розчин амоній гідроксиду (100:1,5)	0,61	0,55	0,67	0,44
4	Етилацетат–метанол–25% розчин амоній гідроксиду (85:10:5)	0,78	0,75	0,58	0,74
5	Метанол– <i>n</i> -бутанол (6:4)	0,19	0,15	0,08	0,19
6	Циклогексан–толуен–діетиламін (7,5:1,5:1)	0,76	0,68	0,52	0,70
7	Етилацетат	0	0	0	0
8	Метанол	0,19	0,17	0,05	0,10
9	Ацетон	0,14	0,07	0,05	0,04
*Інші рухомі фази					
10	Толуен–ацетон–етанол–25% розчин амоній гідроксиду (45:45:7,5:2,5)	0,77	0,65	0,60	0,68
11	Хлороформ–діоксан–ацетон– 25% розчин амоній гідроксиду (47,5:45:5:2,5)	0,49	0,53	0,50	0,55
12	Етилацетат–ацетон–25% розчин амоній гідроксиду (50:45:5)	0,72	0,75	0,66	0,70
13	Хлороформ	0	0	0	0

****Тип пластини:** I – Пластина Сорбфіль; II – Пластина Merk; III – Пластина Silufol; IV – Скляна пластина для ВЕТШХ.

Дані з вивчення нами хроматографічної поведінки докsepіну, представлені в табл 3.2. Як видно, найбільш оптимальними для виявлення вказаного антидепресанту на хроматографічних пластинах серед досліджених нами систем розчинників, є рухомі фази 3, 6, 10 та 11.

3.3. Виявлення докsepіну УФ-спектрофотометричним методом

Метод молекулярної абсорбційної спектроскопії заснований на поглинанні розчинами речовин електромагнітного випромінювання. Спектроскопію в ультрафіолетовій та видимій областях спектру звуть спектрофотометрією. Відповідна енергія фотонів для цих ділянок спектру є достатньою для переходу електронів в молекулах з одного енергетичного рівня на іншій рівень. Такі переходи супроводжуються змінами коливальної та обертальної енергій, і саме через це молекулярні спектри складаються з багатьох спектральних ліній, що зливаються до однієї смуги поглинання. Повертаючись до висхідного стану, молекула, в основному, втрачає свою енергію у вигляді теплоти, і рідше у вигляді випромінювання. Зважаючи на те, що збуджених молекул загалом небагато (у порівнянні з їх загальною кількістю), то теплота, що виділилася, практично не має впливу на стан усієї досліджуваної системи.

Таким чином, УФ-спектр являє собою графічну залежність інтенсивності поглинання світлової енергії системою I (завичай виражається величинами, які є похідними від неї: пропусканням світла T або світлопоглинанням A , де $A = \lg(I/I_0) = -\lg T$) від довжини хвилі λ (нм) (або частоти) випромінювання. Ідентифікація проводиться шляхом порівняння довжині хвилі, яка відповідає максимуму світлопоглинання досліджуємої речовини у відповідному розчиннику, зі стандартним розчином цієї речовини у тому ж розчиннику.

В своїй роботі нами було обрано метод спектроскопії в УФ-ділянці спектру для виявлення докsepіну в екстрактах з модельної печінки та крові.

Для спектрофотометричного дослідження докsepіну ми готували стандартний розчин вказаного антидепресанту в 0,1 М розчині кислоти хлоридної з концентрацією препарату $1,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л та знімали спектр світлопоглинання на спектрофотометрі в діапазоні довжин хвиль від 215 до 380 нм (розчин порівняння (компенсаційний розчин) – 0,1 М розчин кислоти хлоридної, кювета з товщиною шару рідини 10 мм). Отриманий нами розчин докsepіну в 0,1 М розчині кислоти хлоридної мав характерне специфічне поглинання світла за довжини хвилі 293 ± 2 нм (рис 3.1).

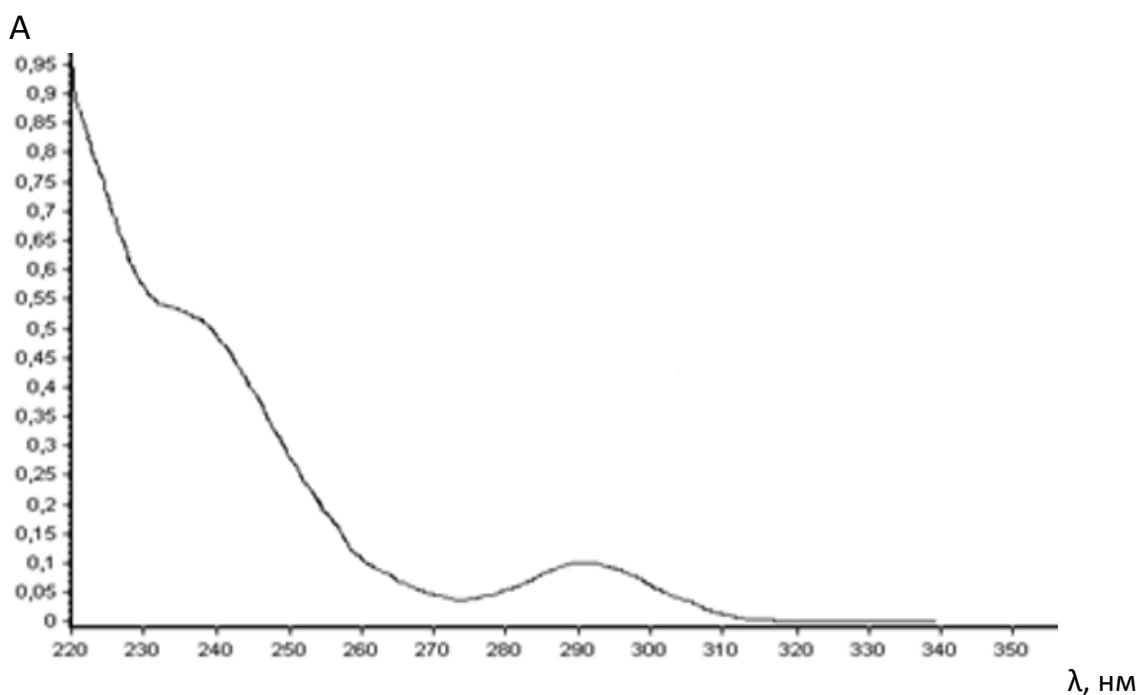


Рис. 3.1. УФ-спектр докsepіну в 0,1 М розчині кислоти хлоридної (концентрація $1,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л)

Молярний коефіцієнт світлопоглинання препарату становив $\epsilon = 7072$.

Висновки до розділу III

1. Досліджено умови хроматографічного виявлення антидепресанту докsepіну з використанням чотирьох різних типів хроматографічних

пластин та ряду систем рухомих розчинників, що запропоновані Асоціацією судових токсикологів для проведення попереднього етапу загального хроматографічного скринінгу наркотичних та психотропних речовин, та ряду інших рухомих фаз, що застосовуються в вітчизняній повсякденній аналітичній практиці проведення хіміко-токсикологічних досліджень.

2. В роботі досліджено взаємодію докsepіну з хромогенними експрес-реактивами, встановлено характер їх забарвлення та чутливість.
3. Досліджено спектр світлопоглинання докsepіну в 0,1 М розчині кислоти хлоридної та встановлено його специфічне світлопоглинання при 293 нм, що дозволяє використовувати метод УФ-спектрофотометрії для виявлення докsepіну в біологічних екстрактах при виконанні хіміко–токсикологічних досліджень.

РОЗДІЛ IV. РОЗРОБКА МЕТОДУ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДОКСЕПІНУ

Лікарські отрути, що надходять до людського організму, в біологічному матеріалі містять в невеликих кількостях. З метою визначення їх кількісного вмісту використовують чутливі спектральні фізико-хімічні методи, зокрема, УФ-спектрофотометрію, різні варіанти прямої та екстракційної спектрофотометрії.

4.1. Розробка методу кількісного визначення доксепіну УФ-спектрофотометричним методом

З метою розробки методу кількісного визначення антидепресанту доксепіну методом абсорбційної спектрофотометрії в УФ-ділянці нами встановлено графічну залежність світлопоглинання вказаного препарату від його концентрації в приготовлених нами стандартних розчинах.

Ступінь поглинання світла речовиною при застосуванні спектрофотометричних методів вимірюють шляхом порівняння інтенсивностей світла від зовнішнього джерела, що падає на зразок та світла, що пройшло через нього. Коли крізь шар розчину речовини з концентрацією C , що поглинає світло, пропустити монохроматичне світло з певною інтенсивністю I_0 , то частина цього світла буде поглинута, а при виході з шару розчину речовини інтенсивність світла буде становити I , а $I < I_0$ (через те, що світловий потік слабшає). Експериментально доведено, що частка поглиненого речовиною світла є пропорційною товщині шару розчину та концентрації речовини, що поглинає. Цей закон світлопоглинання не враховує природу середовища, що поглинає світло, а також сам характер випромінювання, що поглинається. Саме тому зазначений закон є універсальним та справедливим для усіх абсорбційних методів спектроскопії: інфрачервоної, атомно-абсорбційної та рентгенівської. Аналітичним сигналом у спектрофотометрії є оптична густина.

На практиці лінійний характер залежності між оптичною густиною та концентрацією часто порушується, особливо це стосується або ділянки високих концентрацій, або високих показників оптичної густини. Основними причинами зазначеного є немонохроматичність джерел випромінювання, відбиття світла, вплив розсіяного світла. Для того, щоб позбавитись впливу світлорозсіювання, розчин, що фотометрують, повинен бути прозорим. Деякі інші небажані ефекти можна нівелювати, використовуючи для цього розчини порівняння (компенсаційний розчин). У найбільш простому випадку таким розчином є чистий розчинник, а також розчин «сліпого» дослід (він містить усі реактиви та компоненти, окрім того, що визначається).

Також на стан системи, що досліджується, впливають і хімічні процеси в самій системі. При цьому можуть мати місце процеси дисоціації, протонування, депротонування, взаємодії з розчинником та іншими компонентами розчину. Такі відхилення від закону світлопоглинання через хімічних фактори можуть бути і негативними, і позитивними, дуже часто їх можна передбачати та усувати.

Істинні відхилення від закону світлопоглинання, насамперед, пов'язані із зміною коефіцієнтів переломлення досліджуваних середовища. У випадку невеликих концентрацій досліджуваних речовин вказану характеристику не враховують. Відхилення від закону світлопоглинання мають вплив на величини молярних коефіцієнтів світлопоглинання досліджуваних речовин.

Метод спектрофотометрії в УФ-області спектру значною мірою впроваджено до практичної біоаналітичної діяльності, що супроводжує судово-токсикологічні та клінічні дослідження, як простий та доступний метод, який використовується для детектування та кількісного визначення ксенобіотиків з групи лікарських речовин. Суттєвим обмеженням щодо використання зазначеного спектрального методу в аналітичній токсикології є вимога практично повної відсутності в біоекстрактах коекстрактивних

домішок з матриці біологічного походження, що пов'язано з їх впливом на характер світлопоглинання наявних токсикантів в витяжках.

Розрахунок концентрації аналізованої речовини виконують різними способами. Метод побудови градувального графіку. Готують серію з декількох розчинів досліджуваної речовини з відомим вмістом та вимірюють їх світлопоглинання при обраній довжині хвилі світла та товщині шару рідини, а потім будують графік залежності $A = f(C)$. Якщо отримують пряму лінію (розчини підпорядковуються закону світлопоглинання), її можливо описати рівнянням виду $y = bx + a$, (x – концентрація розчину C , y – оптична густина A , b – кутовий коефіцієнт (він дорівнює відповідному коефіцієнту світлопоглинання (якщо при цьому використовується молярна концентрація, тобто $b = \varepsilon$); a – певний відрізок на осі оптичної щільності, який відрізається отриманою прямою, являє значення світлопоглинання у контрольному досліді ($A_{\text{контр.}}$). Побудувавши градувальний графік, вимірюють оптичну густину досліджуваного розчину та, користуючись графіком, визначають невідому концентрацію.

Метод додатків може бути використаним при аналізах невеличкої кількості досліджуваних зразків, коли побудова градувального графіку є недоцільною. Вказаний підхід надає можливість уникнути впливу компоненту розчину, який піддають аналізу. При цьому спочатку вимірюють світлопоглинання розчину з концентрацією, що невідома, а потім для визначуваної речовини. Потім до досліджуваного розчину вводять певну кількість розчину з точною відомою концентрацією цієї ж речовини та знов вимірюють світлопоглинання. Концентрацію знаходять шляхом розрахунку або графічним шляхом.

Диференційна фотометрія може бути використана для визначення досить високих концентрацій досліджуваної речовини, коли використання звичайних методів неможливе через високі показники світлопоглинання. З метою зменшення зазначених показників розчин, що досліджується, розбавляють (в таких випадках можливі деякі побічні процеси: посилення гідролізу тощо), а

також використовують в якості розчину порівняння (компенсаційний розчин) розчин зі значною концентрацією досліджуваної речовини. Важливим є, щоб такий розчин порівняння мав значення оптичної густини дещо менше, ніж досліджуваний. При користуванні цим методом приготують два розчини, що містять усі компоненти системи, що аналізується (один, з відомою та невеликою концентрацією, є розчином порівняння). Кювету з таким розчином розміщують на шляху світлового потоку та встановлюють стрілку індикатору на пристрої приладу на нуль. А другий розчин (невідома концентрація) вносять до іншої кювети та вимірюють для нього оптичну густину A_x по відношенню до першого приготованого розчину. Розрахунок виконують за формулою: $A_x = \varepsilon l(C_x - C_0)$.

Побудова калібрувального графіку для УФ-спектрофотометричного методу кількісного визначення докsepіну. Стандартний розчин СР докsepіну та відповідні робочі стандартні розчини РСР зазначеного препарату докsepіну нами було приготовлено наступним чином: точна наважка (0,01138 г гідрохлориду докsepіну), яка відповідала 0,0100 г основи антидепресанту, розчиняли в мірній колбі місткістю 50,00 мл в 0,1 М розчині кислоти хлоридної, доводячи до об'єм до позначки (вміст основи докsepіну становив 200 мкг/мл).

Приготування робочих стандартних розчинів (РСР): до дев'яти мірних колб об'ємом 10,00 мл додавали по 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00 та 7,50 мл стандартного розчину СР докsepіну та доводили вміст колб до позначки (вміст антидепресанту становив, мкг/мл: 5,0; 10; 20; 40; 60; 80; 100; 120 та 150 відповідно). Вимірювали світлопоглинання приготовлених РСР таким чином, як зазначено нами раніше при вимірюванні спектру світлопоглинання докsepіну (довжина хвилі вимірювань відповідала максимуму світлопоглинання препарату 293 нм). Отримані нами таким чином показники величин світлопоглинання робочих стандартних розчинів (середні значення для трьох калібрувальних зразків з кожної окремої концентрації)

було оброблено за методом лінійної регресії. Отримане рівняння калібрувальної кривої приведено в табл. 4.1.

Розроблену методику було валідовано за показниками діапазон лінійності, межа виявлення, межа кількісного визначення. Кількісне визначення докsepіну нами проведено за калібрувальним графіком, рівняння лінійної залежності якого має вигляд: $y = bx + a$, (y – показник світлопоглинання, b – кутовий коефіцієнт, x – концентрація, a – вільний член лінійної залежності). Отриманий калібрувальний графік придатний для проведення кількісного визначення за умови $r \geq 0,999$.

Показники значень світлопоглинання дев'яти робочих стандартних розчинів докsepіну було нами оброблено методом лінійної регресії, що описувалась рівнянням $y = bx + a$. Перевірка значущості параметра a в отриманому нами рівнянні за показником критерію Фішера показала на неможливість переходу до рівняння вигляду $y = b'x$. Побудований нами калібрувальний графік для кількісного визначення докsepіну описувався рівнянням $y = 0,00768x + 0,021$ ($r = 0,999$; $S_o^2 = 6 \cdot 10^{-4}$; $S_a = 0,00298$), лінійність методики відповідала діапазону концентрацій препарату від 5,0 до 150 мкг/мл. Значення межі виявлення докsepіну та межі його кількісного визначення розраховано за величиною показника стандартного відхилення вільного члену y відповідному рівнянні градувального графіку (S_a) за наступними формулами: $LOD = 3,3S_a/b$ та $LOQ = 10S_a/b$, які складали 1,3 мкг/мл та 3,8 мкг/мл, відповідно.

Отримана нами градувальна залежність величин світлопоглинання розчинів докsepіну від його концентрації представлена на рис. 4.1. Шляхом статистичного аналізу отриманих нами визначено основні валідаційні показники методики, представлені в табл. 4.1. Наведені метрологічні показники: r (коефіцієнт кореляції), S_o^2 (дисперсія), S_a (стандартне відхилення вільного члена лінійної залежності a), b та Δb (кутовий коефіцієнт та його абсолютна невизначеність відповідно), a та Δa (вільний член лінійної залежності та його абсолютна невизначеність відповідно).

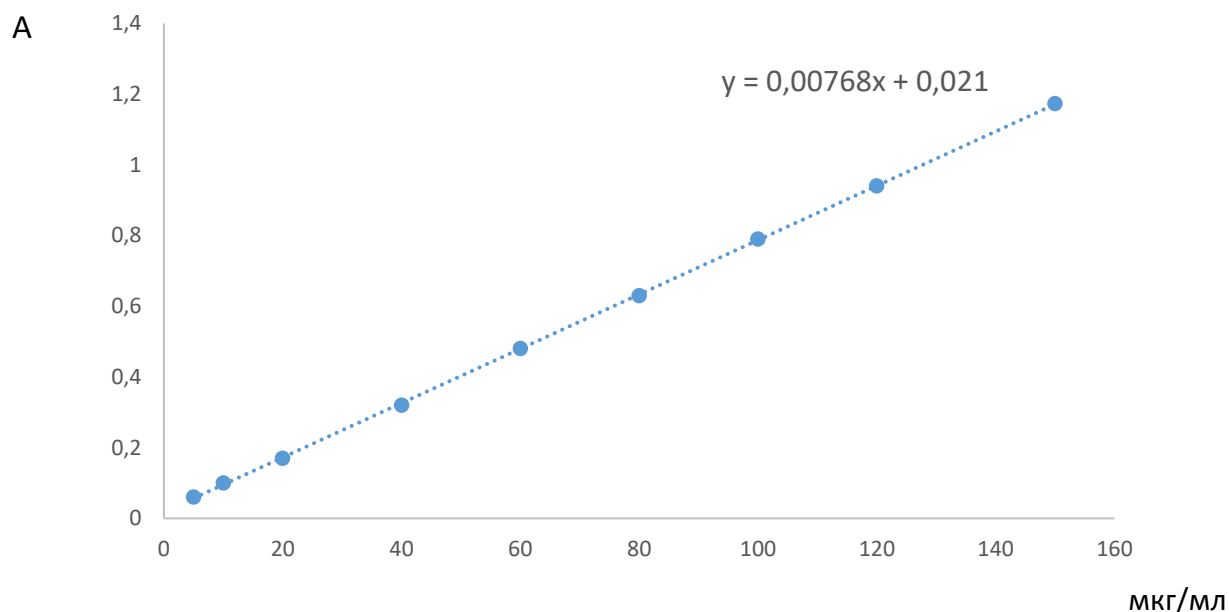


Рис.4.1. Калібрувальний графік для кількісного визначення докsepіну УФ-спектрофотометричним методом (λ_{max} 293 нм)

Таблиця 4.1

**Валідаційні характеристики методики кількісного визначення докsepіну
УФ-спектрофотометричним методом**

λ_{max} , нм	Діапазон лінійності, мкг/мл	$y = bx + a$	r	S_o^2	S_a	Δb	Δa
293	5,0-150,0	$y = 0,00768x + 0,021$	0,999	$6 \cdot 10^{-4}$	0,00298	$7,1 \cdot 10^{-5}$	0,006

Результати обрахунку метрологічних характеристик методу кількісного визначення докsepіну свідчить про її придатність для проведення кількісного визначення вказаного препарату методом УФ-спектрофотометрії при хіміко-токсикологічних дослідженнях.

Висновки до розділу IV

Опрацьовано та валідовано за рядом показників методику кількісного визначення докsepіну методом УФ-спектрофотометрії та показано її відповідність вимогам, що пред'являються до методів хіміко-токсикологічного аналізу.

РОЗДІЛ V. ВИВЧЕННЯ УМОВ ІЗОЛЮВАННЯ ДОКСЕПІНУ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ТА БІОЛОГІЧНИХ РІДИН

Процес пробопідготовки об'єктів біологічного походження до проведення хіміко-токсикологічного дослідження включає процес ізолювання токсиканту, видалення з екстрактів ендогенних співекстрактивних домішок з біоматеріалу, концентрацію досліджуваних аналітів з розбавлених витяжок, для реалізації яких найчастіше використовується метод рідинно-рідинної екстракції. При цьому ступінь виділення ксенобіотиків з об'єктів біологічного походження залежить від рН водного середовища, природи органічного екстрагента, структури секційного матеріалу та інших факторів.

В ряді керівництв та настанов до проведення хіміко-токсикологічних досліджень лікарських отрут показано, що простим, доступним та ефективним способом видалення з біологічних екстрактів ендогенних домішок є поєднання методу рідинної екстракції та тонкошарової хроматографії. Зазначений підхід дуже широко реалізується в практичній експертній діяльності відділів судово-хімічної токсикології. З метою з'ясування оптимальних умов екстрагування доксепіну з водних розчинів та умов екстракційної очистки витягів ми попередньо дослідили екстракцію доксепіну з водних розчинів у залежності від значення рН водної фази та природи органічного екстрагенту.

5.1. Екстракція доксепіну з водних розчинів

В дослідженні з метою створення необхідних значень рН використовували універсальний буфер Бріттона-Робінсона (інтервал рН 2,0 – 11,98).

В якості обраних для вивчення процесу екстракції органічних екстрагентів використовували свіжоперегнані діетиловий естер, хлороформ та гексан. Методика проведення екстракції доксепіну. До ряду скляних ділільних лійок місткістю 45 мл вносили по 9,00 мл буферу Бріттона-Робінсона з необхідним значенням рН та по 1,00 мл водного розчину доксепіну (50,0 мкг/мл) та додавали по 10,00 мл кожного з обраних для вивчення

органічних екстрагентів. Отримані суміші в лійках струшували на механічному струшувачі рідин на протязі 10 хв та залишали з метою розділення фаз на 5 хв. Обережно відокремлювали шар органічного екстрагенту та фільтрували його крізь складчастий паперовий фільтр з 0,2 г натрій сульфату (безводного) до випаровувальної порцелянової чашки. Екстрагент випаровували в потоці теплого повітря при температурі 40° С. Залишки в чашці розчиняли в 10,00 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної та вимірювали світлопоглинання отриманих кислих розчинів та визначали ступінь екстракції докsepіну за калібрувальним графіком (а також за рівнянням градувальної кривої). Отримані нами результати з дослідження умов екстракції докsepіну наведені в табл. 5.1. Як видно, найвищий ступінь екстракції досліджуваного антидепресанту спостерігається при рН 10 (екстрагент – хлороформ), за цих умов величина R складає 67 %. Найменші значення ступеню екстракції докsepіну мають місце при рН 2 при використанні як екстрагенту гексану (2 %). Максимальні значення ступенів досліджуваного препарату відмічалось в лужних середовищах в інтервалі значень рН від 9 до 11. Таким чином, встановлено, що оптимальним (з досліджених нами) екстрагентом докsepіну з водних розчинів є хлороформ при рН 10. Гексан (рН 2) є найбільш придатним органічним екстрагентом для екстракції біогенних співекстрактивних домішок з біологічних екстрактів, що містять докsepін (див. табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Значення ступеню екстракції докsepіну з водних розчинів органічними розчинниками в залежності рН від водного середовища

Значення рН	Ступінь екстракції докsepіну*, %		
	Хлороформ	Діетиловий етер	Гексан
1	2	3	4
2	5,1	4,4	2,0
3	7,3	8,1	3,6
4	13,5	13,4	5,1

Продовж. табл. 5.1

1	2	3	4
5	22,1	19,0	5,4
6	37,2	26,2	6,3
7	42,6	31,3	8,2
8	57,4	38,5	8,8
9	63,4	44,5	10,3
10	67,1	47,8	12,5
11	61,3	45,4	9,2
12	57,0	38,7	6,1

*(n = 5, P = 0,95)

5.2. Розробка методу виділення докsepіну з модельної крові

Відбирали декілька проб по 5 мл донорської крові людини, що не містили докsepіну та додавали до неї водні розчини докsepіну із вмістом від 200 до 1000 мкг вказаного тимолептику. Модельні суміші добре перемішували, а потім залишали на 48 год. Паралельно з цим ми ставили «холості» досліди з таким же об'ємом біологічної рідини. За дві доби до досліджуваних модельних сумішей добавляли при перемішуванні по 5 мл 2 % розчину кислоти трихлорацетатної та центрифугували модельні суміші біорідин на протязі 10 хв (3500 об/хв). Центрифугати обережно зливали з осадів формених елементів крові, переносили їх до скляних ділільних лійок з кранами та два рази збовтували їх вміст з гексаном порціями по 10 мл при рН 1 кожного разу. Відокремлювали верхній шар органічного екстрагенту, відкидали його та не досліджували. Очищену від домішок таким чином кислу суміш підлговували до рН 10 за допомогою 10 % розчину натрій гідроксиду (контроль рН за тест-смужкою універсального індикатору), додавали 5 мл насиченого розчину натрій сульфату з метою висолювання докsepіну та три рази екстрагували вказаний препарат хлороформом порціями по 10 мл. Отримані біоекстракти об'єднували, переносили їх до мірних колб на 50 мл та доводили об'єми витягів

до позначки зазначеним екстрагентом. З метою додаткового вилучення з екстрактів крові коекстрактивних домішок нами застосовано метод тонкошарової хроматографії та екстракційний методом. Результати, отримані нами при ізолюванні докsepіну з модельної крові приведені табл. 5.2.

Таблиця 5.2

Результати кількісного визначення докsepіну, виділеного з крові, УФ-спектрофотометричним методом (середнє з трьох визначень)

Додано докsepіну до 5 мл крові, мкг	Виділено докsepіну		Метрологічні показники
	мкг	%	
200	112,6	56,3	$\bar{x}=55,06$ $S^2=2,82$ $S=1,68$ $S\bar{x}=0,75$ $\Delta\bar{x}=1,6$ $\varepsilon=2,9$ $\bar{x}\pm\Delta\bar{x}=55,06\pm1,6$
400	214,4	53,6	
600	331,8	55,3	
800	424,8	53,1	
1000	570,0	57,0	

*(P=0,95; $t_{\alpha}=2,920$)

Для допоміжного екстракційного очищення біологічних витягів їх переносили до кварцової чашки та випаровували розчинник в потоці повітря при температурі 40° С, а до отриманого залишку добавляли 10 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної. Кислі розчини два рази по струшували з 10 мл гексану, відокремлюючи та відкидаючи органічний шар екстрагенту. Кислу суміш в ділильній лійці підлюговували 10 % розчином амоній гідроксиду до рН 10 та два рази екстрагували основу докsepіну хлороформом з плазми крові гексаном по 10 мл кожен раз. Хлороформні органічні витяги фільтрували крізь складчастий фільтр з 0.2 г безводного натрій сульфату до мірної колби на 50 мл, доводячи до позначки її об'єм тим же екстрагентом. Виконані нами дослідження «холостих» дослідів засвідчили, що отримані екстракти з плазми крові після їх додаткової очистки методом рідинної екстракції все ще вміщують достатньо значну кількість домішок з цільної крові, про що

засвідчили суттєві показники оптичних густин «холостих» екстрактів, які знаходились на рівні 0,085–0,090. Вказаний «фоновий» вплив співекстрактивних речовин заважав подальшій ідентифікації та кількісному визначенню докsepіну методом спектрофотометричним методом, через що виникла необхідність проведення ТШХ-очищення біологічних витягів.

Виконання очистки біологічних екстрактів методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту. 5-10 мл витягу після допоміжної екстракційної очистки випаровували в потоці теплого повітря до об'єму близько 0,03-0,05 мл та смугою наносили на стартову лінію пластини Сорбфіл. Приблизно, за 1 см від смуги екстракту каліброваним капіляром наносили 10 мкг докsepіну (хлороформний розчин «докsepіну-свідка», концентрація 0,5 мг/мл). На відстані 1 см від вказаної проби також смугою наносили 5 мл попередньо випареного до мінімального об'єму 10 мл «холостого» біоекстракту. Хроматографічні пластини розвивали послідовно в двох рухомих фазах: спочатку в хлороформі, потім, після висушування – в рухомій фазі метанол – 25% розчин амоній гідроксиду (100:1,5). Подальше виявлення плям докsepіну проводили так, як зазначено в розд. 3.2. Показники величин R_f плям докsepіну, проекстрагованого з модельної тканини печінки та «докsepіну-свідка» повністю співпадали, становивши 0,60-0,61, а витяги відповідних «холостих» біоекстрактів на хроматограмах не містили плям зі вказаними значеннями величин хроматографічної рухливості (R_f). Докsepін елюювали з усіх отриманих хроматограм метиловим спиртом. Шар силікагелю (сорбент) хроматографічної пластини із непрявленої частини смуги, що відповідав локалізації плями стандарту докsepіну, обережно знімали та елюювали, інтенсивно перемішуючи у мікропробірці з ретельно притертою скляною пробкою, два рази, по 2 мл, метанолом, а потім профільтровували крізь складчастий фільтр з паперу, який попередньо було змочено елюентом, до мірної колби на 10,00 мл, доводячи до позначки відповідним спиртом. Попередньо встановлений нами ступінь елюювання досліджуваного

антидепресанту обраним елюентом з використанням стандартних розчинів препарату становив $98,7 \pm 0,6$ %.

5.3. Ізолювання докsepіну з печінки підкисленою водою та підкисленим спиртом етиловим

Ізолювання докsepіну з модельних проб печінки водою, підкисленою кислотою оксалатною. До 20,00 г подрібнених тканин печінки додавали водний розчин докsepіну (2000,0 мкг). Отриманий об'єкт залишали на 48 год. З біологічним матеріалом, що не містив докsepіну, ставили «холостий» дослід.

За дві доби до об'єктів додавали воду та підкислювали її насиченим розчином кислоти оксалатної до рН 2 (контроль величини рН здійснювали за допомогою універсального індикатору) до утворення «дзеркальної» поверхні над подрібненим секційним матеріалом. Досліджувані суміші настоювали 2 год, а після цього водних витяг зливали, проціджуючи його крізь потрібний шар марлі, а секційний матеріал знову заливали таким же чином підкисленою водою та настоювали 1 год, а потім проціджували її. Об'єднані водні витяги центрифугували протягом 5 хв при 4000 об / хв, потім зливали рідину над осадом та переносили її до ділильної лійки з краном та три рази екстрагували 20 мл хлороформу кожен раз. Нижній шар органічного екстрагенту відокремлювали та відкидали, а водних витяг, який залишився, підлговували 25 % розчином амоній гідроксиду до рН 10 та три рази екстрагували основу препарату 20 мл хлороформу кожен раз. Біологічні хлороформні витяги профільтровували крізь фільтр з 0,3 г безводного натрій сульфату до мірної колби на 25,00 мл, доводячи її об'єм до позначки органічним екстрагентом. Отримані нами витяги з біоматеріалу містили супутні біогенні домішки, які в подальшому було видалено додатковими екстракційною та ТШХ-очистками (див. вище).

Ізолювання докsepіну з модельних проб печінки етиловим спиртом, підкисленим кислотою оксалатною. До 20,00 г подрібненої (або гомогенізованої) модельної печінки людини додавали водний розчин докsepіну (2000 мкг) та залишали на 48 год. Через дві доби до об'єкту

додавали 96° спирт етиловий до утворення «дзеркальної» поверхні над об'єктом та підкислювали суміші насиченим розчином кислоти оксалатної в етанолі до рН 2. Настоювали об'єкти протягом 24 год, а потім витяги зливали з подрібненого біологічного матеріалу. Настоювання біоматеріалу з порціями підкисленого до рН 2 полярного розчинника (спирту етилового) виконували три рази протягом однієї доби кожен раз. Об'єднані етанольні витяги переносили до кварцової чашки та випаровували їх в тоці теплого повітря до стану сиропу. До отриманої рідини по краплях додавали абсолютний етиловий спирт при до тих пір, доки домішки (білки) не припинять випадати в осад. Отриманий таким чином у витягу осад відфільтровували крізь паперовий фільтр та промивали його спиртом етиловим. Після цього до сиропоподібного екстракту додавали 25 мл дистильованої води, а осад, що утворився, відфільтровували. Отриманий спиртово-водний витяг вміщували до скляної ділильної лійки з краном та три рази екстрагували порціями хлороформу по 10 мл. Нижній шар органічного екстрагенту відкидали та не досліджували в подальшому. Кислий біологічний витяг, який залишився, підлугувували 25 % розчином амоній гідроксиду до рН 10 та три рази екстрагували основу докsepіну 10 мл хлороформу кожен раз. Хлороформні біологічні витяги об'єднували, фільтруючи їх крізь фільтр з 0,3 г натрій сульфату (безводний) до мірної колби об'ємом 25,00 мл, та доводили до позначки обраним екстрагентом. Для видалення з витягів білкових біогенних домішок нами проведено додаткове екстракційне та хроматографічне (метод ТШХ) їх очищення. Кількісно визначали докsepін в біоекстрактах методом спектрофотометрії при $\lambda_{\max} = 292 \pm 2$ нм, для чого отримані нами елюати з хроматограм (по 5,00 мл) випаровували в потоці теплого повітря при температурі 40° С, залишок в чашці кількісно розчиняли в 5,00 мл 0,1 М розчину кислоти хлоридної (H_3 (5,00 мл)) та вимірювали показник оптичної густини розчину при вказаній вище довжині хвилі (компенсаційний розчин – «холостий» розчин-елюат). З метою розрахунку концентрації докsepіну нами було використано калібрувальний графік, а розрахунок кількості докsepіну,

що виділено з модельних проб біологічного матеріалу (W , мкг) проводили за

$$W = \frac{Sh_1 h_3}{h_2},$$

де S – концентрація в елюаті докsepіну, мкг/мл;

h_1 – об'єм отриманого при виділенні докsepіну з біоматеріалу витягу після додаткової екстракційної очистки, мл;

h_2 – об'єм екстракту, що взято для ТШХ-очищення, мл;

h_3 – об'єм розчину докsepіну в 0,1 М розчині НСІ, що взятий для кількісного визначення, мл.

Ступінь виділення докsepіну з біоматеріалу (W , %) відповідно до проведених методик пробопідготовки розраховували як «виділено препарату з об'єкту/внесено препарату до об'єкту». Отримані нами результати ізолювання докsepіну з печінки за допомогою настоювання з гідрофільними розчинниками представлено в табл. 5.2. та 5.3.

Таблиця 5.2

Ступінь ізолювання докsepіну з печінки настоюванням біологічного матеріалу з водою, підкисленою кислотою оксалатною (середнє з п'яти вимірювань*)

Метод ізолювання	Додано докsepіну, мкг	Виділено докsepіну		Метрологічні показники
		мкг	%	
Настоювання з водою, підкисленою кислотою оксалатною	2000	774	38,7	$\bar{X} = 39,4$ $S = 0,8$ $RSD = 2,0 \%$ $S_{\bar{X}} = 0,4$ $\Delta \bar{X} = 1,0$ $\varepsilon = 2,6 \%$ $\bar{X} \pm \Delta \bar{X} = 39,4 \pm 1,0$
		789	39,5	
		770	38,5	
		801	40,5	
		796	39,8	

* Коефіцієнт Ст'юдента 2,132

Таблиця 5.3

Ступінь ізолювання докsepіну з печінки настоюванням біологічного матеріалу зі спиртом етиловим, підкисленим кислотою оксалатною (середнє з п'яти вимірювань*)

Метод ізолювання	Додано докsepіну, мкг	Виділено докsepіну		Метрологічні показники
Настоювання зі спиртом етиловим, підкисленим кислотою оксалатною	2000	672	33,6	$\bar{X} = 33,3$ $S = 0,8$ $RSD = 8,6 \%$ $S_{\bar{X}} = 0,4$ $\Delta \bar{X} = 1,0$ $\varepsilon = 2,0 \%$ $\bar{X} \pm \Delta \bar{X} = 33,3 \pm 1,0$
		658	32,9	
		667	33,4	
		688	34,4	
		646	32,3	

*Коефіцієнт Ст'юдента 2,132

З наведених даних видно, що ефективність виділення докsepіну етиловим спиртом перевершує за ефективністю метод ізолювання підкисленою водою, які становили 47,4 % та 26,9 % відповідно.

Висновки до розділу V

1. Досліджено умови екстрагування антидепресанту докsepіну з водного середовища найбільш поширеними при біоаналітичних дослідженнях органічними екстрагентами в залежності від величини рН середовища. Показано, що кращим органічним розчинником для екстрагування докsepіну препарату є хлороформ при рН 10, видалення біогенних домішок з витягів зручно шляхом їх екстракції гексаном при рН 2.
2. Запропоновано умови ізолювання докsepіну крові на основі рідинно-рідинної екстракції із використанням висолювання препарату розчином натрій сульфату. Ступінь ізолювання докsepіну з крові розробленим нами методом виділення крові склав 55 %.

3. Встановлено розрізняючу спроможність по відношенню до докsepіну загальних методів виділення лікарських речовин з біоматеріалу шляхом настоювання об'єктів з підкисленою водою та підкисленим спиртом, їх ефективність методів склала 39 % та 33 % відповідно.

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

1. Досліджено умови виявлення докsepіну з рядом хромогенних експрес-реактивів, що використовуються як візуалізатори при хіміко–токсикологічних дослідженнях екстрактів з біоматеріалу. Показано, що найбільш чутливими для ідентифікації вказаного антидепресанту виявились реактиви Лібермана та Фреде.

2. Досліджено хроматографічну поведінку докsepіну на чотирьох типах хроматографічних пластин та з низкою рухомих фаз, рекомендованих Асоціацією судових токсикологів для застосування при виконанні скринінгових досліджень, та з окремими рухомими фазами, що є найбільш вживаними у вітчизняній практиці судово-токсикологічних досліджень біологічного матеріалу на наявність лікарських речовин з кислими та основними властивостями.

3. Розроблено методики ідентифікації та кількісного визначення докsepіну методом УФ-спектрофотометрії в екстрактах з біологічних об'єктів, передумовою використання яких була додаткова екстракційна та ТШХ-очистка отриманих екстрактів. Встановлено низку валідаційних параметрів розроблених методик, які підтвердили їх придатність для застосування у судовій токсикології.

5. Встановлено залежність ступеню екстракції докsepіну від рН середовища при екстракції препарату з водних розчинів органічними екстрагентами. Показано, що оптимальним органічним розчинником для екстракції зазначеного антидепресанту з водних розчинів є хлороформ при рН 10. Для видалення органічних біогенних домішок з отриманих біологічних екстрактів найбільш придатним органічним екстрагентом виявився гексан при рН 2.

6. Запропоновано умови виділення докsepіну з модельної крові методом рідинної екстракції з попереднім осадженням еритроцитів розчином кислоти трихлорацетатної та наступним проведенням висолювання антидепресанту з

лужного середовища за допомогою натрій сульфату. Ступінь ізолювання докsepіну з крові складав 55 %.

7. Розроблено умови та встановлено ефективність ізолювання докsepіну з модельної печінки за допомогою загальних методів виділення лікарських речовин, заснованих на настоюванні біологічних об'єктів з підкисленою водою та підкисленим етиловим спиртом. Ефективність ізолювання докsepіну зазначеними методами становила 39 % та 33 % відповідно.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Erratum to: Post-herpetic Neuralgia: a Review / G. R. Hadley et al. *Curr. Pain Headache Rep.* 2016. Vol. 20(4). P. 28.
2. Leppert W., Malec-Milewska M., Zajackowska R., Wordliczek J. Transdermal and Topical Drug Administration in the Treatment of Pain. *Molecules.* 2018. Vol. 23(3). P. 681.
3. Chronic inducible urticaria: classification and prominent features of physical and non-physical types / I. Pozderac et al. *Acta Dermatovenereol. Alp. Pannonica Adriat.* 2020. Vol. 29(3). P. 141–148.
4. Lundby C., Farrell B., Wilson A. Anticholinergic deprescribing: A case report demonstrating improved cognition and function with minimal adverse withdrawal effects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2024. Vol. 90(7). P. 1741–1744.
5. Kolla B. P., Mansukhani M. P., Bostwick J. M. The influence of antidepressants on restless legs syndrome and periodic limb movements: A systematic review. *Sleep Med.. Rev.* 2018. Vol. 38. P. 131-140.
6. Clinical efficacy and safety of low-dose doxepin in Chinese patients with generalized anxiety disorder: A before-after study / M. Zhang et al. *Medicine.* 2022. Vol. 101(42). P. e31201.
7. Reinert J. P., Veronin M. A., Medina C. Tricyclic Antidepressants in Nociceptive and Neuropathic Pain: A Review of Their Analgesic Properties in Combination With Opioids. *J. Pharm. Technol.* 2023. Vol. 39(1). P. 35–40.
8. Doxepin: Misuse and Abuse / B. Spurling et al. *J. Clin. Psychopharmacol.* 2018. Vol. 38(3). P. 279–280.
9. Toxicological findings in suicides-frequency of antidepressant and antipsychotic substances / M. Methling et al. *Forensic Sci. Med. Pathol.* 2019. Vol. 15(1). P. 23–30.
10. Ojanperä I., Kriikku P., Vuori E. Fatal toxicity index of medicinal drugs based on a comprehensive toxicology database. *Int. J. Legal Med.* 2016. Vol. 130(5). P. 1209–16.

11. Comparative efficacy and acceptability of antidepressant treatment in poststroke depression: a multiple-treatments meta-analysis / Y. Sun et al. *BMJ Open*. 2017. Vol. 7(8). P. e016499.
12. Use of antidepressants with pharmacogenetic prescribing guidelines in a 10-year depression cohort of adult primary care patients / C. D. Jessel et al. *Pharmacogenet Genomics*. 2020. Vol. 30(7). P. 145–152.
13. Paulke A., Wunder C., Toennes S. W. Sleep self-intoxication and sleep driving as rare zolpidem-induced complex behaviour. *Int. J. Legal. Med.* 2015. Vol. 129(1). P. 85–8.
14. Untargeted Metabolomic Analyses of Body Fluids to Differentiate TBI DOC and NTBI DOC / X. Xiao et. al. *Curr. Mol. Med.* 2024. Vol. 24(9). P. 1183-1193.
15. Paulke A., Wunder C., Toennes S. W. Field study to detect illicit and medicinal drugs in car drivers in Southern and Western Hesse. *Arch. Kriminol.* 2016. Vol. 238(5-6). P. 173–187.
16. Supramolecular microextraction combined with paper spray ionization mass spectrometry for sensitive determination of tricyclic antidepressants in urine / F. M. Oliveira et al. *Anal. Chim. Acta*. 2020. Vol. 1106. P. 52–60.
17. Extraction of antidepressant drugs in biological samples using alkanol-based nano structured supramolecular solvent microextraction followed by gas chromatography with mass spectrometric analysis / Q. Salamat et al. *J. Sep. Sci.* 2019. Vol. 42(8). P. 1620–1628.
18. A novel solid phase extraction sample preparation method for sensitively determining doxepin and N-nordoxepin in human plasma and its application in a bioequivalence study in healthy Chinese volunteers / B. Zheng et al. *Anal. Methods*. 2022. Vol. 14(22). P. 2168–2178.
19. Determination of psychoactive drugs in serum using conductive vial electromembrane extraction combined with UHPLC-MS/MS / T. S. Gottenberg et al. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2021. Vol. 1183. P. 122926.

20. Ma W., Gao X., Guo H., Chen W. Determination of 13 antidepressants in blood by UPLC-MS/MS with supported liquid extraction pretreatment. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2021. Vol. 1171. P. 122608.
21. In-situ growth of covalent organic framework on stainless steel needles as solid-phase microextraction probe coupled with electrospray ionization mass spectrometry for rapid and sensitive determination of tricyclic antidepressants in biosamples / J. Yuan et al. *J. Chromatogr. A.* 2023. Vol. 1695. P. 463955.
22. Farjami F., Fasihi F., Alimohammadi F., Moradi S. E. Electrochemical Behavior and Highly Sensitive Voltammetric Determination of Doxepin in Pharmaceutical Preparations and Blood Serum Using Carbon Ionic Liquid Electrode. *Iran J. Pharm. Res.* 2019. Vol. 18(1). P. 91–101.
23. Shin S. S., Borg D., Stripp R. J. Developing and Validating a Fast and Accurate Method to Quantify 18 Antidepressants in Oral Fluid Samples Using SPE and LC-MS-MS. *J. Anal. Toxicol.* 2020. Vol. 44(6). P. 610–617.
24. Determination of 13 antidepressants in blood by UPLC-MS/MS with supported liquid extraction pretreatment / W. Ma et al. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2021. Vol. 1171. P. 122608
25. Determination of psychoactive drugs in serum using conductive vial electromembrane extraction combined with UHPLC-MS/MS / T. G. Skaalvik et al. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2021. Vol. 1183. P. 122926.
26. Akashita G., Nakatani E, Tanaka S., Okura T. Development of simultaneous determination of dopamine 2, histamine 1, and muscarinic acetylcholine receptor occupancies by antipsychotics using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2024. Vol. 127. P. 107518.
27. High-throughput protein precipitation method with 96-well plate for determination of doxepin and nordoxepin in human plasma using LC-MS/MS / T. Margaryan et al. *Biomed Chromatogr.* 2020. Vol. 34(8). P. e4844.
28. Development and validation of a simultaneous analytical method for non-steroidal therapeutic compounds in cosmetics using liquid chromatography-

- tandem mass spectrometry / I. S. Woo et al. *J. Sep. Sci.* 2021. Vol. 44(12), P. 2371–2381.
29. Venga Mendes T., Figueiredo E. C. Magnetic Particle Spray Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2024. Vol. 96(14). P. 5519–5526.
30. Determination of doxepin hydrochloride in spiked human plasma and capsule after derivatization with eosin Y using resonance Rayleigh scattering, second-order scattering and frequency doubling scattering methods / J. Geogin et al. *Luminescence*. 2023. Vol. 38(6). P. 753–761.
31. Shin S. S., Borg D., Stripp R. Developing and Validating a Fast and Accurate Method to Quantify 18 Antidepressants in Oral Fluid Samples Using SPE and LC-MS-MS. *J. Anal. Toxicol.* 2020. Vol. 44(6). P. 610–617.
32. Kashi F., Ebrahimzadeh H., Nejabati F. Development and characterization of a non-enzymatic electrochemical biosensor for rapid determination of sorbent-based extracted trazodone and doxepin in complicated samples. *Anal. Chim. Acta*. 2024. Vol. 1317. P. 342902.
33. Estimating environmental fate of tricyclic antidepressants in wastewater treatment plant / J. W. Choi et al. *Sci. Total Environ.* 2018. Vol. 634. P. 52–58.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

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



СЕРТИФІКАТ №330

Цим засвідчується, що

Ярошко Г.

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 signatures]

Алла КОТВИЦЬКА

Інна ВЛАДИМИРОВА