

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
фармацевтичний факультет
кафедра фармацевтичної хімії

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: **ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ МЕЛІПРАМІНУ**

Виконала: здобувачка вищої освіти групи

Фм21(4,6з)мед-01а

спеціальності: 226 Фармація, промислова фармація

освітньо-професійної програми Фармація

Лідія ЛАЗАРЬ

Керівник: професор закладу вищої освіти кафедри

фармацевтичної хімії, д.фарм.н., професор

Сергій БАІЮРКА

Рецензент: професор закладу вищої освіти кафедри

клінічної фармакології ІПКСФ, д.фарм.н., професор

Ілля ПОДОЛЬСЬКИЙ

Харків – 2026 рік

АНОТАЦІЯ

Метою нашого дослідження є оптимізація умов пробопідготовки біологічного матеріалу при проведенні цілеспрямованого хіміко-токсикологічного дослідження на вміст в ньому відомого трициклічного антидепресанту меліпраміну шляхом розробки спеціального методу ізолювання препарату при елююванні його зі зневодненого біооб'єкту хлороформом та наступною реекстракцією в системі петролейний етер – ацетонітрил, що дозволяє запобігти втраті високоліпофільного препарату на етапі реекстракції з водного середовища, а також розробка методів виявлення та ідентифікації меліпраміну, придатних для виконання підтверджуючих аналітичних досліджень біологічних екстрактів (при проведенні спрямованих скринінгових досліджень) на наявність зазначеного трициклічного антидепресантного препарату за допомогою чутливих та простих методів: хімічних реакцій (осадові реакції та хромогенні експрес-реактиви), методу хроматографії у тонкому шарі сорбенту, методу ультрафіолетової спектрофотометрії, та наступного опрацювання методу кількісного визначення меліпраміну в отриманих після елюювання витяжках з гомогенізованих та зневоднених тканин модельного біологічного матеріалу методом спектрофотометрії в ультрафіолетовій ділянці спектру. Загальний об'єм роботи становить 56 сторінок та складається з огляду літературних джерел та двох розділів експериментальних досліджень, висновків, восьми таблиць, двох рисунків та 32 джерел літератури.

Ключові слова: меліпрамін, біологічні об'єкти, модельний біоматеріал, ізолювання, елюювання, хроматографія в тонкому шарі сорбенту, спектрофотометрія, екстракційна спектрофотометрія.

ANNOTATION

The aim of our study is to optimize the conditions for sample preparation of biological material when conducting a targeted chemical-toxicological study for the content of the known tricyclic antidepressant melipramine by developing a special method for isolating the drug by eluting it from a dehydrated bioobject with chloroform and subsequent re-extraction in the hexane-acetonitrile system, which allows preventing the loss of a highly lipophilic drug at the stage of re-extraction from the aqueous medium, as well as developing methods for detecting and identifying melipramine, suitable for performing confirmatory analytical studies of biological extracts (when conducting targeted screening studies) for the presence of the specified tricyclic antidepressant drug using sensitive and easy-to-perform methods: the method of chemical reactions (microcrystallographic reactions and chromogenic express reagents), the method of chromatography in a thin layer of a sorbent, the method of ultraviolet spectrophotometry, and subsequent development of the method for quantitative determination of melipramine in extracts obtained after elution from homogenized and dehydrated tissues of model biological material by spectrophotometry in the ultraviolet region of the spectrum. The total volume of the work is 56 pages and consists of a review of literary sources and two sections of experimental studies, conclusions, eight tables, two figures and 32 sources of literature.

Keywords: melipramine, biological objects, model biomaterial, isolation, elution, thin layer chromatography, spectrophotometry, extraction spectrophotometry.

З М І С Т

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. МЕЛІПРАМІН. ТОКСИКОЛОГІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ. ТОКСИКОДИНАМІКА ТА ТОКСИКОКІНЕТИКА. БІОАНАЛІТИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ В ОБ'ЄКТАХ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	12
1.1 Фармакологія меліпраміну. Застосування в медичній практиці.....	15
1.2. Токсична дія меліпраміну. Причини інтоксикацій.....	16
1.3. Меліпрамін. Фізико-хімічні властивості.....	19
1.4. Меліпрамін. Токсикокінетика	20
1.5. Меліпрамін. Біоаналітичні дослідження	20
Висновки до розділу 1.....	24
РОЗДІЛ 2. МЕЛІПРАМІН. ВИЯВЛЕННЯ ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ.....	25
2.1. Матеріали та методи.....	25
2.2. Меліпрамін. Виявлення хромогенними та осадовими реактивами.....	26
2.3. Меліпрамін. Дослідження методом тонкошарової хроматографії....	29
2.4. Меліпрамін. УФ-спектрофотометричне визначення.....	31
2.5. Меліпрамін. Кількісне визначення УФ-спектрофотометричним методом.....	32
Висновки до розділу 2.....	37
РОЗДІЛ 3. МЕЛІПРАМІН. ВИДІЛЕННЯ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ.....	38
3.1. Очищення екстрактів з об'єктів дослідження.....	38
3.2. Розробка умов ізолювання меліпраміну з гомогенізованого біоматеріалу хлороформом.....	42
3.3. Виявлення меліпраміну в біоекстрактах методом тонкошарової хроматографії та хромогенними реакціями.....	43
3.4. Меліпрамін. УФ-спектрофотометричне визначення в екстрактах...	45

3.5. Кількісне визначення меліпраміну в біоекстрактах	45
Висновки до розділу 3.....	48
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ.....	49
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	51
ДОДАТКИ.....	55

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

LC	–Liquid Chromatography
DL	– Detection Limit (or Limit of Detection)
QL	– Quantitation Limit (or Limit of Quantitation)
TIAFT	– The International Association of Forensic Toxicologists (Міжнародна асоціація судових токсикологів (МАСТ))
ВЕРХ-МС/МС	– високоефективна рідинно-рідинна хроматографія з тандемним типом мас-спектрометричного детектування
МТФМЕ	– метод твердофазної мікроекстракції
АДП	– антидепресантні препарати
ТШХ-скринінг	– скринінг, що базується на використанні тонкошарової хроматографії

ВСТУП

Актуальність теми. Найпоширенішими ментальними порушеннями у світі є депресивний та тривожний розлади. Депресивні розлади — це патологічні стани, домінуючим симптомом яких є пригнічений настрій. Вони зустрічаються при афективних розладах настрою, соматичних розладах, порушеннях адаптації, при отруєннях та побічних діях лікарських засобів, інших психічних розладах (афективні розлади, психотична депресія, депресивні і тривожні біполярні розлади, неврастенії, абстинентні синдроми). За даними ВООЗ, у 2019 р. 301 млн людей жили з тривожними розладами, 280 млн – з депресивними, включаючи великий депресивний розлад. У людей раннього віку частіше фіксуються тривожні розлади, тоді як у старшому – депресивні. Хворі на депресію часто відчують брак сил та сум, тому її симптоми схожі на пригнічення чи поганий настрій. Однак це різні стани, які можуть мати схожі симптоми, але відрізнятися за рівнем впливу. Депресія — це розлад, який впливає на почуття, думки та поведінку особи. Симптоми депресії можуть включати постійний смуток, втрату інтересів, зміни апетиту та сну, втому, почуття безнадії, труднощі з концентрацією, думки про самогубство. Депресія вимагає професійного лікування, зазвичай її симптоми тривають понад два тижні та є стійкими. Ментальні синдроми та розлади призводять до значного погіршення якості життя (зокрема, фізичного та фінансового) великої кількості населення нашої планети. Неліковані депресивні розлади – це глобальна причина, через яку багато людей проживає життя практично з інвалідністю. Потерпаючи від емоційних, поведінкових та фізичних проблем, ці люди не можуть вести нормальне життя – вчитися та працювати, підтримувати стосунки з іншими людьми, знаходити роботу, проявляти свої таланти, адекватно сприймати оточуючий світ. Покращенню цієї ситуації заважає стигматизація психічних розладів. Через упередженість, страх та нерозуміння, що таке ментальне здоров'я,

люди з депресією та іншими психічними синдромами або розладами не звертаються по лікарську допомогу. Їхні проблеми залишаються поза увагою, що призводить до передчасної смерті, отримання інвалідності або самогубства. Депресія у глобальному масштабі є прихованою епідемією, оскільки лікування отримує лише незначна кількість пацієнтів. За даними центру DEPRES, у Європі 43% із 75 тис. дорослого населення, що страждає від депресії, ніколи не звертались до лікаря. Втрата працездатності в цьому випадку перевищує аналогічні показники при таких хронічних захворюваннях, як артрит, гіпертонічна хвороба, захворювання шлунково-кишкового тракту та легенів. Погіршення якості життя, пов'язане з депресією, є вражаючим. Майже у всіх, хто переніс депресивний епізод, зберігається висока ймовірність виникнення повторних приступів хвороби, в таких випадках 20% тривалості життя забирає депресія. Депресія суб'єктивно переживається як зупинка часу і життя. Захворювання людини на депресію залежить від її генетичної схильності. Хоча депресія не є прямою спадковістю, певні генетичні особливості підвищують ризик її розвитку. Окрім генетики, односторонні негативні моделі мислення також можуть сприяти депресії. Під час депресії песимістичне мислення про свої перспективи на майбутнє стають більш вираженими. Поширеними причинами депресії є травматичний досвід або фундаментальна зміна життєвої ситуації. Це може бути втрата партнера або розвиток серйозної хвороби. Хронічний стрес також може стати причиною депресії. Незважаючи на чіткі симптоми, причина депресії не завжди є зрозумілою. Депресія похилого віку часто виникає через збільшення кількості захворювань та погіршення загального стану здоров'я. Як наслідок, постраждалі більше не можуть структурувати своє повсякденне життя без обмежень, у деяких випадках повністю втрачаючи почуття незалежності. Це може призвести до відчуття пригніченості або навіть до депресії. Під час депресії людина відчуває внутрішню порожнечу. Головним захисним механізмом при депресії

є заперечення або спотворення реальності відповідно до внутрішніх переживань і конфліктів. Причини депресивного стану, як правило, не усвідомлюються. Самогубство є четвертою за поширеністю причиною смерті молоді (віком 15-29 років) у всьому світі. За даними ВООЗ, щороку відбувається близько 700 тисяч самогубств, тобто одне самогубство кожні 40 секунд, 90% з них пов'язані з психічними розладами, понад 77% – сталися в країнах з низьким і середнім рівнем доходу. Станом на 2019 р. Україна входила до переліку 15 країн світу з найвищим рівнем суїцидів. Світовий підхід до психічних розладів почав кардинально змінюватись у 2008 р. Тоді ВООЗ закликала всі країни боротися зі стигматизацією проблем з ментальним здоров'ям, а також розробила "Програму mhGAP", яка передбачає, що переважна більшість пацієнтів з легкими та помірними формами психічних розладів може отримувати допомогу у сімейних лікарів. У 2016 р. в Україні було розпочато медичну реформу. МОЗ та держава об'єднали зусилля зі створення умов, які повинні надати кожному українцю доступ до якісних послуг щодо підтримки психічного здоров'я. На теперішній час в нашій країні діагностикою та лікуванням легких та помірних форм психічних розладів займаються лікарі первинної ланки. Сьогодні в терапії депресії застосовуються різні класи антидепресантів, але всі вони призначаються виключно лікарем: селективні інгібітори зворотного захоплення серотоніну (СІЗЗС) (лікарі часто починають терапію депресії з призначення саме цього класу антидепресантів як значно безпечніших в плані побічних ефектів порівняно з іншими класами тимолептиків); трициклічні антидепресанти (відносно старі препарати, які можуть бути дуже ефективними, але викликають серйозні побічні ефекти); інгібітори моноаміноксидази (ІМАО) (ці засоби призначають для лікування депресії, коли не діють інші препарати; ІМАО можуть проявляти серйозні побічні ефекти). Застосування ІМАО вимагає суворих обмежень в раціоні харчування через небезпечні (часом навіть смертельні) взаємодії з багатьма

продуктами харчування, а також з деякими ліками. Ці препарати не можна комбінувати з селективними інгібіторами зворотнього захоплення серотоніну. Інша група – інгібітори зворотного захоплення серотоніну та норадреналіну, які крім терапії депресії, використовуються для лікування обсесивно-компульсивного та тривожного розладів, а також синдрому хронічного нейропатичного болю. Атипові антидепресанти не потрапляють до будь-якої іншої категорії антидепресантів та мають певну специфіку фармакологічної дії. Отруєння препаратами тимолептичної дії займають провідне місце серед усіх інтоксикацій лікарськими засобами. Це обумовлюється тривалим хронічним протіканням депресивних захворювань і серйозними суїцидальними ризиками, які дуже часто супроводжують це небезпечне захворювання. Чисельні випадки передозувань класичними трициклічними антидепресантами пов'язані з вузьким терапевтичним діапазоном дозувань тимолептиків цієї групи та їх суттєвою токсичністю. Антидепресантом трициклічної будови, що відноситься до першої лінії вказаних лікарських засобів, є меліпрамін. Зважаючи на можливий прояв токсичної дії препарату, що обумовлює його токсикологічне значення, опрацювання та впровадження у біоаналітичну практику методів аналітичного діагностування отруєнь меліпраміном є актуальним завданням аналітичної токсикології.

Мета дослідження. Метою даного дослідження є вдосконалення існуючих методів пробопідготовки досліджуваних об'єктів біологічного та небіологічного походження при виконанні спрямованих (направлених) та неспрямованих (ненаправлених) досліджень витяжок на підтверджуючому етапі виконання скринінгових аналітичних досліджень щодо присутності тимолептичного засобу трициклічної будови меліпраміну при його ізолюванні шляхом елюювання у хроматографічній колонці ліпофільним розчинником хлороформом з гомогенізованого та ретельно зневодненого за допомогою безводного натрій сульфату біологічного матеріалу, реекстракція

меліпраміну з отриманих вилучень у системі петролейний етер – ацетонітрил, та наступним опрацюванням оптимальних умов детектування і наступної ідентифікації зазначеного трициклічного антидепресантного препарату в отриманих біовитягах методом хімічних реакцій (мікрокристалоскопічні реакції та хромогенні експрес-реагенти), що поєднані з ТШ-хроматографією на різних типах хроматографічних пластин, визначення мапротиліну УФ-спектрофотометричним методом, а також підбір ефективних умов для додаткового видалення з досліджуваних біологічних витяжок небажаних ендогенних сполук шляхом послідовного сполучення екстракційного та ТШ-хроматографічного методів. Заключним етапом запропонованого хіміко-токсикологічного дослідження стала оцінка кількісного вмісту меліпраміну в біоекстрактах з модельних тканин біологічного матеріалу УФ-спектрофотометричним методом.

Завдання дослідження. Для досягнення поставленої мети роботи необхідним було вирішення наступних завдань:

1. розробити оптимальні умови методик детектування меліпраміну в біологічних витягах в умовах проведення підтверджуючих скринінгових досліджень на основі методів тонкошарової хроматографії та деяких хромогенних реактивів;
2. встановити параметри хроматографічної рухливості меліпраміну у деяких загальних скринінгових ТШХ-системах, що використовуються для виявлення лікарських речовин основного та слабоосновного характеру;
3. встановити забарвлення для продуктів взаємодії меліпраміну з хромогенними реактивами та визначити їх чутливість по відношенню до вказаного препарату;
4. визначити оптимальні умови виявлення та ідентифікації меліпраміну в біовитягах з гомогенізату тканин модельної печінки, а також кількісного визначення вказаного тимолептику методом ультрафіолетової спектрофотометрії;

5. розробити просту та ефективну методику очищення біоекстрактів від супутніх ендогенних компонентів біоматриці методом тонкошарової хроматографії;

6. визначити розрізняючу ефективність вдосконаленого методу ізолювання лікарських «отрут» хлороформом по відношенню до меліпраміну;

7. розробити обґрунтований алгоритм проведення хіміко-токсикологічного аналізу біоматеріалу на присутність у ньому тимолептичного препарату меліпраміну, придатний для проведення комплексу біоаналітичних досліджень.

Об'єкт дослідження. Системний комплекс методів хіміко-токсикологічного аналізу трициклічного антидепресанту меліпраміну.

Предмет дослідження. Розробка нових та вдосконалення існуючих біоаналітичних методів детектування та кількісного визначення сучасного трициклічного антидепресанту меліпраміну в біоекстрактах та елюатах, отриманих з наважок модельних проб секційного біологічного матеріалу.

Методи дослідження: комплекс хімічних, фізико-хімічних (хроматографічних та спектральних) методів дослідження біологічних екстрактів на присутність в них тимолептичного препарату меліпраміну при виконанні хіміко-токсикологічних досліджень тканин секційного матеріалу та ізолюванні з них вказаного лікарського препарату шляхом колонкового елюювання хлороформом.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблено методику ізолювання з високою розрізняючою спроможністю щодо меліпраміну з гомогенізованого та зневодженого біооб'єкту, що значною мірою підвищує ефективність пробопідготовки, запропоновано оптимізовані умови для виявлення, наступної ідентифікації та кількісного визначення в досліджених тканинах секційного матеріалу вказаного антидепресантного препарату методами ТШ-хроматографії та ультрафіолетової спектрофотометрії, які

призначено для використання у рутинній експертній роботі відділів судово-медичної токсикології щодо аналітичної діагностики летальних отруєнь вказаним тимолептиком.

Елементи наукових досліджень. Вперше для виділення з біоматеріалу препарату антидепресивної дії меліпраміну запропоновано раніше розроблений та вдосконалений нами метод, заснований на проведенні його елюювання з гомогенізованих та зневоднених безводним сульфатом натрію тканин модельної печінки методом, та наступною реекстракцією меліпраміну в системі рочинииків петролейний етер – ацетонітрил. Показано високу ефективність опрацьованого методу ізолювання по відношенню до вивчаємого антидепресанта. Запропоновано умови виконання підтверджуючого етапу систематичного скринінгу щодо ідентифікації меліпраміну ТШХ-методом, хромогенними реактивами та спектральним методом. Розроблено методики для виконання кількісної оцінки вмісту препарату в біоекстрактах методом ультрафіолетової спектрофотометрії. Встановлено умови для оптимального екстрагування меліпраміну з водних розчину за допомогою поширених в токсикологічній практиці органічних екстрагентів у залежності від рН досліджуваної водної фази. На основі опрацьованих методів ХТА оптимізовано умови для проведення скринінгових досліджень біовитягів з матриці біологічного походження на присутність меліпраміну.

Апробація результатів дослідження і публікації. Результати опрацьованих систематичних експериментальних досліджень, що були результатом виконання магістерської роботи, були висвітлені в збірнику тез конференції: Лазарь Л., Баярка С., Карпушина С. «Розробка методу ізолювання меліпраміну з біологічного матеріалу». *Modern chemistry of medicines*: матеріали Міжнародної Internet-конференції., м. Харків, 7 листопада 2025 р. Харків: НФаУ. С. 137.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи. Магістерська кваліфікаційна робота складається зі вступної частини, виконаного огляду та аналізу даних фахових літературних джерел, двох розділів експериментальних досліджень (результати провалідовано у відповідності до вимог UNODC), загальних висновків і переліку використаних наукових фахових літературних джерел. Представлену магістерську кваліфікаційну роботу викладено на 56 сторінках, вона містить 8 таблиць, 2 рисунки та 32 літературних джерела.

РОЗДІЛ 1

МЕЛІПРАМІН. ТОКСИКОЛОГІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ. ФІЗИКО- ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ. ТОКСИКОДИНАМІКА ТА ТОКСИКОКІНЕТИКА. БІОАНАЛІТИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ В ОБ'ЄКТАХ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Антидепресанти — це психотропні ліки, які застосовуються для лікування депресії, тривожних розладів та інших психічних захворювань шляхом коригування балансу нейромедіаторів у мозку, таких як серотонін, дофамін і норадреналін. Вони покращують настрій, знімають тривогу та підвищують психічну активність, хоча їхній ефект проявляється поступово, протягом кількох тижнів. Ці препарати відпускаються за рецептом і призначаються лікарем, вони часто поєднані з психотерапією.

Фармакокорекція депресивних захворювань тимолептиками у теперішній час є найбільш важливим методом їхньої терапії. Неселективна стимуляція α_2 -адренорецепторів забезпечує сприятливу седативну, знеболювальну, міорелаксантну та анксиолітичну дію, але пов'язана з серцево-судинними та респіраторними побічними ефектами. Тривожні стани підкреслюють порушення моноамінів, що піддаються модуляції α_2 -адренорецепторів [1]. Сучасні фармакодинамічні дослідження засвідчують, що визначальним є саме нейрохімічний механізм фармакологічної дії тимолептиків, що опосередковується їхнім впливом на моноамінергічні механізми головного мозку. Ендоканабіноїдна система відіграє важливу роль у патофізіології депресії. В останні роки було відзначено потенційну участь цієї системи у механізмі дії антидепресантів. Авторами було вивчено експресію каннабіноїдних рецепторів за допомогою вестерн-блоту та щільності рецепторів за допомогою авторадіографії після гострого або хронічного введення антидепресантів [2]. Ендоканабіноїдна система відіграє певну роль у патофізіології депресії. Метою авторів було дослідити

експресію ферментів, що синтезують ендоканабіноїдну систему (N-ацилфосфатидилетаноламінфосфоліпаза, діацилгліцеролліпаза), та ферментів, що деградує ендоканабіноїдну систему (гідролаза аміду жирних кислот та моноацилгліцеролліпаза) після гострого або хронічного введення антидепресантів (іміпрамін, 15 мг/кг), есциталопрам (10 мг/кг) та тіанептин (10 мг/кг) [3]. Пуринергічні рецептори пов'язані з важкістю симптомів у пацієнтів, які страждають на депресивні та біполярні розлади, а фармакологічна блокада рецепторів викликає антидепресантний ефект у доклінічних моделях. Однак, існує мало доказів щодо змін поведінкових наслідків, викликаних попереднім впливом стресу, що є основним фактором ризику депресії у людей. Оцінено вплив іміпраміну на рівні вказаних рецепторів у дорсальному та вентральному гіпокампі, а також у фронтальній корі щурів, які пройшли передтестовий сеанс парадигми вивченої безпорадності. Повторне введення іміпраміну (15 мг/кг внутрішньоочеревинно) знижувало рівні обох рецепторів у вентральному, але не в дорсальному гіпокампі або фронтальній корі [4].

Враховуючи важливу роль сигналізації, опосередкованої нейротрофічним фактором мозку, у механізмі дії антидепресантів, досліджено ліганд-рецепторні взаємодії в поясній корі головного мозку щурів за допомогою аналізу лігандування у відповідь на гостре та повторне введення іміпраміну. Як гостре, так і хронічне введення іміпраміну посилювало взаємодію зі структурами мозку, яка спостерігалася через 3 год після введення препарату. Відзначено значне зниження цієї взаємодії після хронічного введення іміпраміну [5].

Авторами досліджено вплив введення іміпраміну на щурів, яким інтрацеребровентрикулярно вводили убаїн. Фронтальна кора та гіпокамп були препаратомані для подальшої біохімічної оцінки. Введення убаїну викликало маніакальноподібний ефект на сьомий день та депресивноподібну поведінку. Введення іміпраміну викликало значний ефект на тій же стадії у

тварин, які отримували убаїн, що збільшило окисне пошкодження та активність антиоксидантних ферментів у мозку щурів. Іміпрамін посилив окисне ушкодження убаїну [6].

Великий депресивний розлад являє собою проблему з обмеженою ефективністю існуючих методів лікування, особливо у випадках резистентної до лікування депресії. Силденафіл, селективний інгібітор фосфодіестерази, відомий своїми нейропластичними, протизапальними та антиоксидантними властивостями є перспективним кандидатом на роль антидепресанту. Нейробіологічний механізм, що лежить в основі антидепресантних ефектів моно- та комбінованих терапій силденафілом, відображає мультимодальну дію і не може бути повністю пояснений змінами індивідуально вимірних рівнів біомаркерів [7].

Амітриптилін, який призначають пацієнтам з паркінсонізмом, продемонстрував значну затримку початку дофамінергічної терапії та покращення рухової недостатності у цих пацієнтів. Досліджено можливі нейропротекторні механізми, що забезпечуються амітриптиліном, та оцінено активність іміпраміну щодо відповідного ефекту. Отримані результати свідчать про те, що модуляція рівнів норадреналіну та серотоніну, підвищення регуляції нейротрофіну, антиоксидантна та протизапальна активність можуть служити важливими механізмами, що лежать в основі нейропротекторної дії [10].

За можливістю прояву серйозної побічної дії та безпекою медичного використання, тимолептичні препарати поділяються на дві наступні групи: антидепресанти препарати першого ряду (характерними є мінімальні небажані побічні ефекти, а також високий ступінь вибіркової нейрохімічної дії, як приклад, група селективних інгібіторів зворотнього захвату серотоніну), а також препарати-тимолептики другого ряду (характерними є значна ефективність, але володіють серйозними побічними ефектами, наприклад група трициклічних антидепресантних препаратів).

1.1 Фармакологія меліпраміну. Застосування в медичній практиці

Механізм терапевтичної дії меліпраміну повністю не з'ясований. Препарат пригнічує зворотнє захоплення в синапсах норадреналіну і серотоніну, що вивільняються при стимуляції, полегшуючи тим самим норадренергічну та серотонінергічну передачу. Меліпрамін чинить інгібуючу дію також відносно мускаринових та H_1 -гістамінових рецепторів, забезпечуючи антихолінергічний і помірний седативний ефект. Антидепресивна дія препарату проявляється поступово: оптимальний терапевтичний ефект досягається через 2-4 тижнів терапії.

Меліпрамін є основним представником типових трициклічних антидепресантів. Коморбідна депресія з посттравматичним стресовим розладом часто є резистентною до лікування. Розробляючи доклінічну модель резистентної до лікування депресії, авторами поєднано тваринні моделі депресії та досліджено механізми резистентності до лікування. Іміпрамін значно зменшив депресивну поведінку щурів [9].

Меліпрамін рекомендований до застосування при ендогенних депресіях різноманітної етіології, в тому числі і при астенічних та депресивних проявах з вираженою моторною загальмованістю, при реактивній депресії, невротичних станах та психопатіях [10, 11]. Досліджено протисудомну ефективність карбамазепіну (карбамазепін; 20 та 50 мг/кг), іміпраміну (10 та 20 мг/кг) окремо та в низькодозовій комбінації. Показано, що низькодозна комбінована терапія карбамазепіном (20 мг/кг) та іміпраміном (10 мг/кг) демонструє синергізм [12].

Депресія та зловживання кокаїном – це розлади з високою частотою коморбідності. У дослідженні поєднано тваринну модель депресії з внутрішньовенним введенням кокаїну та згасанням/відновленням у щурів для дослідження впливу есциталопраму та іміпраміну на індуковану кокаїном поведінку. Введення іміпраміну (2,5-30 мг/кг) зменшило вплив

кокаїну на щурів. Іміпрамін ефективно впливав на їх поведінку після введення ударної дози або повторного введення препарату [13].

Амлодипін та іміпрамін також демонстрували незначний потенціал як нові терапевтичні варіанти для лікування інфекцій, спричинених *S. aureus*, але є перспективними як нові провідні молекули. Це дослідження також підтверджує, що *G. mellonella* є стійкою та надійною моделлю для оцінки потенціалу ряду груп лікарських засобів [14].

Антидепресанти на основі моноамінергічних речовин широко використовуються для лікування великого депресивного розладу, але їхні механізми дії повністю не вивчені. Внутрішньоклітинний гомеостаз Ca^{2+} та кальмодулін бере участь у терапевтичній активності цих сполук. Отримані результати показують, що поведінкові переваги хронічного лікування антидепресантами можуть бути пов'язані з динамікою внутрішньоклітинного Ca^{2+} [15].

Клінічні та доклінічні дослідження показують, що хронічний стрес або дефіцит цинку у раціоні можуть бути факторами ризику розвитку великого депресивного розладу. Можуть існувати зв'язки між низьким рівнем цинку у сироватці крові та розвитком резистентної до лікування депресії. У роботі поєднано хронічний стрес обмеження та дієту з низьким вмістом цинку у мишей та провели серію поведінкових та біохімічних досліджень [16, 17]. Виявлено, що цинк посилює антидепресивну ефективність іміпраміну при дослідженнях депресії у людей та на тваринних моделях депресії, але механізм цього ефекту залишається невідомим [18].

Трициклічні антидепресанти мають серйозні небажані побічні ефекти, тому лікування ними слід супроводжувати проведенням терапевтичного моніторингу. Найбільш загрозливим побічним ефектом зазначеного тимолептиків є значне порушення серцевого ритму.

1.2 Токсична дія меліпраміну. Причини інтоксикацій

Група трициклічних антидепресантів є найчастішою причиною фатальних передозувань практично серед усіх лікарських препаратів, що пов'язано з їх гострим нейротропним ефектом та вираженою кардіотоксичністю. Авторами оцінено антидепресивну ефективність нового комплексу іміпрамін-магній у порівнянні з індивідуальним введенням іміпраміну та магнію. Було проведено тест на рухову активність для виключення хибнопозитивних результатів. Крім того, у дослідженні оцінювався рівень оксидативного стресу у лабораторних тварин, що зазнали гострого стресу. Введення комплексу іміпрамін-магній у дозах 5, 10 та 20 мг/кг призвело до скорочення часу нерухомості, що вказує на антидепресантний потенціал тестованого комплексу, що був подібним до того, який спостерігався після введення цих двох сполук як окремих лікарських форм. Цей інноваційний засіб має потенціал для покращення профілю безпеки терапії, оптимізації протоколу лікування та сприяння дотриманню терапевтичного режиму [19].

У традиційній медицині препарати, що містять меркурій, використовуються для лікування неврологічних захворювань. В дослідженні показано, що такі сполуки покращують депресивну поведінку у мишей, яких лікували хронічним стресом обмеження або хронічним непередбачуваним легким стресом [20].

Повідомлялося про порушення функції печінки у 20% пацієнтів, які тривало отримували терапію трициклічним антидепресантом іміпраміном, але механізм, такого впливу є невідомим. Хронічний легкий стрес широко використовується для моделювання депресивної поведінки у щурів. Вивчено вплив стресу та лікування іміпраміном, що застосовувалися окремо або в комбінації, на рівні маркерів оксидативного стресу [21]. Метою дослідження було визначити диференціальну токсичність антидепресантів на сперматогенні клітини мишей. Клітини інкубували з амітриптиліном, есциталопрамом, флуоксетином, іміпраміном, міртазапіном, оланзапіном,

ребоксетином (мезилатом) та венлафаксином, а також було оцінено кілька клітинних та біохімічних характеристик. Отримані результати показують, що всі досліджувані речовини проявляли виражену репротоксичність [22, 23].

Дані джерел літератури свідчать, що середня мінімальна терапевтична доза імізину для дорослих становить 1 г. Описано випадки, коли пероральне вживання п'яти грамів, а іноді більшої кількості цього лікарського засобу, не спричиняло фатального передозування. Повідомлялося, що деякі хімічні речовини викликають фототоксичність, пов'язану з метаболітами, і автори дослідження мали на меті перевірити вказані ризики. Фототоксичний ризик іміпраміну та його метаболіту дезіпраміну оцінювали за допомогою фотохімічного та фармакокінетичного аналізів. Було виявлено, що обидва препарати мають подібну фотореактивність, засновану на генерації активних форм кисню. Згідно з результатами, дезметиліміпрамін був визначений як фактор, що сприяє фототоксичності, викликаній пероральним прийомом препарату. У тестуванні на фототоксичність *in vivo* ультрафіолетове опромінення через 3-6 год після перорального введення іміпраміну (100 мг/кг) викликало сильніші фототоксичні реакції порівняно з опроміненням через 3 год [24].

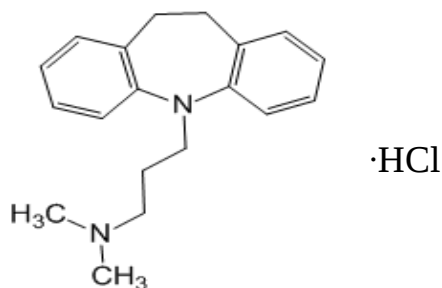
Авторами показано, що рівень пролактину змінюється під впливом психотропних препаратів, включаючи антидепресанти. Багато досліджень зосереджувалися на лікуванні антидепресантами (особливо пов'язаних із серотонінергічною системою) за допомогою фенфлурамінового тесту, проте деякі дані свідчать про відсутність кореляції між тестом та прогнозуванням клінічної відповіді на антидепресанти [25]. Якщо дезіпрамін потрапляє у водне середовище, він може трансформуватися під впливом бактерій навколишнього середовища або ультрафіолетового випромінювання. Тому фотоліз дезметиліміпраміну у воді проводили за допомогою імітації сонячного світла ксенонової лампи та ультрафіолетової лампи. Вивчено біорозкладність дезметиліміпраміну та його продуктів фототрансформації,

що утворюються під час УФ-фотолізу. Досліджено вплив змінних умов, таких як початкова концентрація препарату, рН розчину та температура, на поведінку під час УФ-фотолізу [26]. Відповідно до опублікованих даних, імізин (меліпрамін) переважно був причиною фатальних інтоксикацій дітей. Вживання всередину 350 мг вказаного препарату може викликати важке або смертельне отруєння. Концентрація імізину в крові близько 0,5 мг/л (імізин сумісно з його дезметильованим похідним) викликають гострі токсичні ефекти, а рівень концентрацій імізину в плазмі крові на рівні 0,8 – 13,0 мг/л відповідає летальному передозуванню.

Авторами наведено відомості про випадок смертельного передозування жінки після разового вживання всередину 33 таблеток імізину (кількість є відповідною 925 мг антидепресанту), відповідні концентрації тимолептичного препарату були наступними: кров – 14,0 мг/л, тканини головного мозку – 25,0 мг/г, жовч – 88,0 мг/л та тканини печінки – 75,0 мг/г.

1.3 Меліпрамін. Фізико-хімічні властивості

Меліпрамін – 10,11-дигідро-*N,N*-диметил-5*H*-дibenзо-[*b, f*]-азепін-5-пропанаміну гідрохлорид:



Синоніми: Тофраніл, Імізин, Медіпрамін.

$C_{19}H_{24}N_2$, HCl.

М. м. 316,9 г/моль.

Меліпраміну гідрохлорид – це білий кристалічний порошок. $T_{пл}$. 175 °C. Меліпрамін гідрохлорид розчинний у воді та етанолі (1:2), практично нерозчинний у етері діетиловому. LogP (октанол/вода) = 4,5; ступінь екстракції основи меліпраміну 1-хлорбутаном становить 100%.

1.4 Меліпрамін. Токсикокінетика

Середня терапевтична доза імізину при корекції депресії складає 20-25 мг (до 150 мг на добу).

Зареєстровані випадки вживання летальних доз становили 900 мг разово всередину, а також від 1,0 до 5,5 г.

Токсичні концентрації препарату в крові знаходились на рівні 0,5 мг/л.

Летальний плазменний рівень імізину становив 0,8 – 13 мг/л.

Концентрація імізину в сечі (летальні інтоксикації) становила 12,7 мг/л.

У секційному матеріалі вміст імізину становив: 75,0 мкг/г (тканини печінки), 25,0 мкг/г (мозок), 88,0 мг/л (жовч).

Меліпрамін швидко всмоктується та перерозподіляється по органах і тканинах організму. Процеси метаболічних перетворень пов'язані з деметилуванням та з утворенням фармакологічно активних вторинних метаболітів, а також процесами гідроксилування за ароматичними кільцями та подальшою кон'югацією з гліцином та глюкуроновою кислотою. Близько 10% від дози препарату у незмінному стані екскретується нирками.

Період напіввиведення імізину складає від 8 до 22 год, норімізину до 30 год. Об'єм розподілу (V_d) 12 – 22 л/кг. Ступінь зв'язування з білками плазми крові (F_b) становить 90 %.

1.5 Меліпрамін. Біоаналітичні дослідження

Дані наукових видань та фахових статей з методів детектування меліпраміну в біооб'єктах засвідчують, що найбільш вживаними методами є варіанти високоефективної рідинно-рідинної хроматографії (ВЕРХ) з різними типами детектування. При цьому в якості біологічних зразків досліджувались плазма крові, сеча та цільна кров. Методами пробопідготовки були твердофазна (мікро-) екстракція. У судово-біоаналітичних методах існує загальна думка, що калібратори слід готувати шляхом збагачення аналітів у матричних холостих зразках (матричних). Однак, у випадку склоподібного тіла, збір холостих зразків для валідації та рутинного аналізу вимагатиме

наявності великої кількості трупів. Окрім складності отримання достатньої кількості холостих проб скловидних тіл, подібна процедура також може становити етичну проблему. Тут було проведено дослідження впливу матриці з урахуванням склоподібного тіла людини та великої рогатої худоби та фізіологічного розчину (NaCl 0,9%). Трициклічні антидепресанти (амітриптилін, нортриптилін, імipрамін та дезипрамін) використовувались як модельні аналіти, що екстрагувалися зі зразків за допомогою рідкофазної мікроекстракції та детектувалися за допомогою газової хроматографії-мас-спектрометрії. Зразки людського та бичачого зразків склоподібного тіла були підготовлені в шести різних концентраціях антидепресантів (5, 40, 80, 120, 160 та 200 нг/мл) та проаналізовані. Відносний матричний ефект оцінювали, застосовуючи двосторонній *t*-критерій Стюдента, порівнюючи отримані результати з набором даних, отриманих з людським та бичачим зразками. Значного матричного ефекту не було виявлено для амiтриптиліну та нортриптиліну у трьох оцінених матрицях [27].

Опубліковано результати детектування меліпраміну в біорідинах за методом капілярної газо-рідинної (нітроген-фосфорний детектор) хроматографії після твердофазної екстракції з одночасним поділом декількох антидепресантів (плазма крові): венлафаксин, вилосазин, імизин, амоксицин, сертралін та дезипрамін. У роботі описано два спектрофотометричні методи видимого діапазону, які використовують утворення комплексів переносу заряду між чотирма антидепресивними сполуками: амiтриптиліном, імipраміном, кломіпраміном та триміпраміном, що діють як донори електронів, та двома *n*-бензохінонами, а саме: *n*-хлораніловою кислотою та 2,3-дихлор-5,6-диціано-1,4-бензохіноном, що служать акцепторами електронів. Стехіометрія отриманих сполук демонструвала стабільне співвідношення 1:1 у всіх випадках, як встановлено за методом Джоба. Для всіх комплексів було визначено молярну поглинальну здатність, константи рівноважної асоціації та кілька інших спектроскопічних властивостей.

Розроблені спектрофотометричні методи були валідовані всередині лабораторії та успішно застосовані для кількісної оцінки чотирьох активних інгредієнтів антидепресантів у кількох комерційних фармацевтичних препаратах [28].

Розроблено новий, чутливий, швидкий та простий флуоресцентний зонд на основі зелених синтезованих вуглецевих точок. У роботі вуглецеві точки були синтезовані з кореня валеріани гідротермальним методом. Результати просвічувальної електронної мікроскопії та динамічного розсіювання світла підтверджують утворення вуглецевих точок розміром менше 10 нм. Гасіння флуоресценції було зумовлене агрегацією негативних зарядів з позитивним зарядом іміпраміну та потім використовувалось як сигнал для визначення препарату. Крім того, цитотоксичність була визначена за допомогою МТТ-тесту. Відповіді зонду за оптимальних умов були лінійними в діапазоні 1,0-200,0 нг/мл з межею виявлення 0,6 нг/мл [29].

Проведено визначення імізину та норімізину в плазмі крові дорослої людини методом газової (капілярної) хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням. Авторами представлено нове застосування нанокристалічного алмазного електрода, легованого бором, для створення електрохімічного ДНК-біосенсора на основі дволанцюгової ДНК для різних біоаналітичних застосувань. Характеристика поверхні перетворювача (до та після виготовлення негативно зарядженої термінованої поверхні електроду) була виконана за допомогою скануючої електронної мікроскопії, раманівської спектроскопії та лінійної вольтамперометрії з розгорткою, яка надалі використовувалася для вольтамперометричного визначення, дослідження залежності швидкості сканування та дослідження повторюваності електрохімічного окислення ДНК на електроді. Виготовлення біосенсора шляхом електростатичної адсорбції ДНК включало ретельний процес оптимізації потенціалу осадження, часу осадження та

оптимальної концентрації насичення з оптимальними значеннями 0,3 В, 3 хв та 10 мг/мл [30].

Виконано систематичні хіміко-токсикологічні дослідження в біологічному матеріалі та біологічних рідинах тразодону, циталопраму, венлафаксину, флуоксетину з попереднім проведенням пробопідготовки на основі методу рідинної екстракції. Встановлено, що загальноприйняті у аналітичній токсикології методи ізолювання шляхом екстракції отрут полярними розчинниками (підкислена вода та спирт) мають низьку розрізняючу спроможність стосовно антидепресантів різних хімічних та фармакологічних груп малоефективними (ефективність ізолювання знаходилась у межах 5 – 16 % для меліпраміну). Запропоновано процедуру на основі твердофазної екстракції для одночасного попереднього концентрування п'яти трициклічних антидепресантів, амітриптиліну гідрохлориду, нортриптиліну гідрохлориду, докsepіну гідрохлориду, іміпраміну гідрохлориду та кломіпраміну гідрохлориду із зразків води з визначенням за допомогою ВЕРХ. Полімери були охарактеризовані за допомогою ІЧ-спектроскопії з перетворенням Фур'є, скануючої електронної мікроскопії та термогравіметричного аналізу. Методи на основі твердофазної екстракції були проведені шляхом попереднього концентрування 320,0 мл ТЦА при рН 7,0 (забуферених 0,01 моль/л фосфатним буфером) через 70,0 мг адсорбенту, упакованого в картридж, з подальшим елююванням 1,0 мл розчину ацетонітрил : метанол : кислота ацетатна (45:45:10) [31]. Інше дослідження мало на меті вибрати високоефективну катіонообмінну смолу та оцінити поглинання нею позитивно іонізованих трициклічних антидепресантів (амітриптиліну, іміпраміну, кломіпраміну та дезипраміну), які часто використовуються та виявляються в системах очищення стічних вод. Для вибору смоли було проведено одноточковий контрольний тест амітриптиліну в дистильованій воді з використанням кількох смол. В результаті було обрано сильнокислотну полістирольну смолу, Dowex

50WX4-200, на основі її поглинання амітриптиліну. Максимальна адсорбційна здатність Dowex 50WX4-200 для вилучення антидепресантів коливалася від $2,53 \pm 0,20$ ммоль/г до $3,76 \pm 0,12$ ммоль/г, що значно вище показників раніше описаних адсорбентів [32].

Враховуючи досить високу жиророзчинність меліпраміну (див. вище), практичний інтерес представляє розробка умов ізолювання з біоматеріалу вказаного препарату розчинниками з ліпофільними властивостями.

Висновки до розділу 1

1. Висока токсичність трициклічних антидепресантів та летальність при отруєннях ними, в тому числі меліпраміном, практично є найвищою серед психотропних лікарських препаратів.

2. Вивчення, систематизація та узагальнення джерел наукової літератури показали, що базові біоаналітичні методи детектування меліпраміну в різноманітних об'єктах біологічного походження засновані на використанні варіантів колонкової хроматографії, що передбачає проведення ретельної пробопідготовки.

3. Використання для виділення з біоматеріалу меліпраміну гідрофільних розчинників як екстрагентів характеризується їх невисокою ефективністю, тому важливе практичне значення має розроблення ефективних умов ізолювання меліпраміну на основі використання розчинника з ліпофільними властивостями.

РОЗДІЛ 2

МЕЛІПРАМІН. ВИЯВЛЕННЯ ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

З метою детектування та проведення кількісного визначення меліпраміну в біоекстрактах з секційного матеріалу нами було використано тонкошарову хроматографію, хромогенні експрес-реакції, метод УФ-спектрофотометрії, які є доступними для більшості лабораторій, мають достатньо високі межі виявлення та визначення більшості токсичних і летальних кількостей основних груп сильнодіючих та психотропних лікарських засобів.

2.1 Матеріали та методи

При виконанні усіх нижченаведених досліджень використовували субстанцію меліпрамініну, яку було попередньо виділено з лікарської форми «Меліпрамін» (10 таблеток по 25 мг) ЗАТ ФП «ЕГІС», Угорщина.

Органічні розчинники відповідали кваліфікації «ч.д.а.» (Sigma-Aldrich, США): трихлорметан, хлористий метилен, метанол, ацетон, етанол 96%, *i*-зопропанол, петролейний етер, етиловий естер ацетатної кислоти, діоксан, діетиловий етер, циклогексан, бензен, толуен.

Усі використані реактиви відповідали кваліфікації «ч.д.а.»: розчин амоній гідроксиду 25 %, натрій гідроксид кристалічний, калій йодид кристалічний, кальцію хлорид кристалічний, натрію нітрит кристалічний, амоній молібдат кристалічний, амоній ванадат кристалічний, натрій сульфат безводний кристалічний, кислота нітратна концентрована (97,5%), перхлоратна кислота концентрована (70,5%), кислота фосфатна концентрована (83,5%), кислота ацетатна концентрована (98,8%).

Типи хроматографічних пластинок: вир-во Естонії (КСКГ, фракція – $9\div 18$ мкм, товщина шару – 110 ± 15 мкм) (I), «Сорбфіл» (СТХР-1, шар – 120 мкм) (II), «Silufol» (сорбент силікагель) (III), Merck, Germany (Sil gel 60, f 254) (IV).

Пристрій для опромінювання пластинок УФС 254/365.

Мірні колби на 10,00 мл, 25,0, 50,0, 100,0 мл.

Спектрофотометр СФ-46 (190 – 1100 нм).

У роботі було використано хромогенні реактиви.

1. Реактив Драгендорфа-Муньє.
2. Реактив Манделіну.
3. Реактив Маркі свіжоприготовлений.
4. Реактив Фреде свіжоприготовлений.
5. Реактив Ердмана свіжоприготовлений.
6. Реактив ФПН свіжоприготовлений.
8. Реактив Лібермана свіжоприготовлений.

2.2 Меліпрамін. Виявлення хромогенними та осадовими реактивами

Як хромогенні експресні реагенти нами використовувались візуалізатори, що рекомендує Комітет із систематичного токсикологічного аналізу Асоціації токсикологів для опрацювання ТСХ-скринінгу. Встановлювали результати реакцій забарвлення для продуктів взаємодії імізину з хромореактивами, при цьому використовували стандартний розчин вказаного антидепресанту в хлороформі (конц-я – 1 мг/мл в перерахунку на основу препарату).

Відповідні проби по 10 мкл приготовленого стандартного розчину імізину капіляром наносили на хроматографічні пластинки та обробляли їх хромореактивом, встановлюючи забарвлення.

При визначенні чутливості цих реакцій стандартний розчин імізину (1,0 мг/мл) об'ємом 0,25 до 30 мкл наносили кварцовим каліброваним капіляром на різні пластини (проби 0,50 до 30 мкг). Для валідації величин межі виявлення (LOD) ми керувались настановами United Nations Office on Drugs and Crime. З цією метою нами було досліджено по 10 проб ст-го р-ну імізину (вміст 1,25 LOD – 2,0 LOD кількісно). Загальна кількість хибних негативних результатів не була більшою, ніж два з десяти дослідів для

кожного реактиву (Relative Standart Deviation $\leq 20,0\%$). Отримані нами в дослідженні результати хромореакцій для меліпраміну та, відповідно, їх чутливість (LOD, мкг для проб) наведено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1.

Результати реакцій забарвлення меліпраміну з хромогенними реактивами

Реактив	Забарвлення (LOD, мкг у пробі)
УФ-промені (λ – 254 нм / 365 нм)	Темно-червона флюоресценція (0,3) /оранжева флюоресценція (0,3)
Пари йоду	Буре (0,5)
Розчин нінгідрину	Рожеве (2,5)
Реактив Манделіна	Темно-синє (7,0)
Реактив Манделіна, послідовно з формальдегідом	Темно-синє (7,0)
Реактив Маркі	Жовте (8,0)
Реактив Лібермана	Зелене, переходить на синє (1,0)
Реактив Фреде	Блідо-синє (1,5)
Реактив Ерліха	Рожеве (6,0)

Було встановлено, що найбільш чутливими для детектування меліпраміну є УФ-промені, пари йоду, реактиви Лібермана та Фреде, LOD, мкг становить відповідно 0,5, 1,0 та 1,5 мкг досліджуваного трициклічного антидепресанту в пробі.

Меліпрамін проявляє основні властивості, тому для його виявлення доцільно використовувати реакції з реактивами групового осадження алкалоїдів. З цією метою хлороформні біовитяги з досліджуваного об'єкту по 1 краплі (0,05 мл) наносили на предметні скельця та випаровували органічний розчинник. Залишки обережно розчиняли в 1 краплі 0,1 М р-ну кислоти хлоридної (паралельно виконували дослідження з самим реактивом – «сліпий дослід»). Осади, що утворювались, спочатку розглядали візуально на темному фоні у світлі, що проходить, а потім, за 15 хв — під мікроскопом.

Результати реакцій із реактивами групового осадження для меліпраміну, виділеного з біоматеріалу та меліпраміну-стандартного розчину співпадали (таб. 2.2).

Таблиця 2.2

Деякі осадові реактиви на меліпрамін та їх чутливість

Реактив	Колір осаду	Чутливість	
		Межа виявлення, мкг	Граничне розведення
Сіль Рейнеке, 1%-й розчин	Білий, аморфний	1,0	1:5000
Розчин I ₂ в KI	Коричнево-бурий, аморфний,	1,0	1:5000
Розчин BiI ₃ в KI	Оранжевий, аморфний	1,0	1:5000
0,5 % розчин кислоти пікринової	Жовтий, аморфний	3,0	1:6666
Фосфорно-вольфрамова кислота	Оранжево-коричневий, аморфний	2,5	1:50 000
Роданідний комплекс феруму (III)	Коричневий, аморфний	5,0	1:10 000
Роданідний комплекс кобальту	Синій, аморфний	5,0	1:10 000
Роданідний комплекс мангану (II)	Білий, аморфний	2,5	1:50 000
Роданідний комплекс цинку	Білий, аморфний	3,0	1:6666
Фосфорно-молібденова кислота	Коричневий, аморфний	5,0	1:10 000
Кремній-вольфрамова кислота	Коричневий, аморфний	2,5	1:50 000

З наведених у табл. 2.2. даних видно, що з усіма використаними реактивами меліпрамін утворює забарвлені аморфні осад.

2.3 Меліпрамін. Дослідження методом тонкошарової хроматографії

Комітет зі систематичного токсикологічного аналізу Асоціації судових токсикологів запропонував скринінгові рухомі фази, створивши для них інформаційну базу параметрів рухливості, яка охоплює до двох тисяч отруйних речовин.

В нашій роботі досліджено хроматографічну поведінку меліпраміну в уніфікованих рухомих фазах рекомендованих для виконання токсикологічного скринінгу по TIAFT (табл. 2.2, р. ф. №1–8), та інших, які є «скринінговими» при виконанні біоаналітичних досліджень вітчизняною токсикологічною службою.

На стартову лінію певної хроматографічної пластини (2,0 см від її країв) капіляром до однієї точки наносили чотири проби (10 мкл), а поруч – стандартний розчин меліпраміну в хлороформі (конц-я 1 мг/мл).

Усі хроматографічні пластини з досліджуваними пробами переносили до скляних камер для хроматографування (об'єм 2500 см³), куди заздалегідь, за 10 хв до дослідження, додавали 50 мл рухомої фази. Пробіг суміші розчинників складав 10 см. Хроматограму після ретельного висушування спочатку опромінювали УФ-променями, після цього – першу смугу на пластині обробляли нінгідрином (спостерігали появу забарвлення). Далі цю ж смугу обробляли реактивом Драгендорфа-Мун'є. Плям у імізину на другій смузі візуалізовували реактивом Манделіна, а потім обробляли парами формальдегіду (фіксували кольори плям). Смуги, що залишились на ТШХ-пластині, відповідно, обробляли реактивами Лібермана та Фреде.

Результати зі встановлення хроматографічної рухливості імізину в досліджених нами рухомих фазах представлені в табл. 2.3.

Таблиця 2.3

Значення величин R_f плям меліпраміну в різних системах рухомих фаз та тонких шарах сорбенту

Рухома фаза	Значення R_f (n = 3)			
	Скляні пластини ВЕТШХ	Сорбфіл	Silufol	Merck
Хлороформ – ацетон (4:1) (1)	0,07±0,03	0,05±0,02	0	0,05±0,03
Хлороформ – метанол (9:1) (2)	0,18±0,04	0,26±0,05	0,12±0,04	0,22±0,04
Етилацетат – метанол – амоній гідроксид 25 % розчин (17:2:1) (3)	0,87±0,04	0,79±0,04	0,71±0,03	0,67±0,04
Метанол (4)	0,09±0,04	0,18±0,04	0,08±0,04	0,11±0,02
Метанол – <i>n</i> -бутанол (3:2) (5)	0,19±0,04	0,24±0,03	0,09±0,03	0,11±0,04
Метанол – амоній гідроксид 25 % розчин (100:1,5) (6)	0,51±0,05	0,62±0,04	0,65±0,04	0,47±0,04
Етилацетат	0	0	0	0
Циклогексан – толуен – діетиламін (15:3:2) (7)	0,69±0,03	0,81±0,05	0,87±0,05	0,71±0,04
Ацетон (8)	0,02±0,01	0,07±0,02	0,04±0,02	0,02±0,01
Хлороформ – <i>n</i> - бутанол – амоній гідроксид 25 % розчин (14:8:1) (9)	0,82±0,05	0,89±0,04	0,79±0,04	0,84±0,05
Хлороформ – ацетон – амоній гідроксид 25 % розчин (12:24:1) (10)	0,72±0,04	0,66±0,04	0,71±0,05	0,75±0,03

Скринінг на основі хроматографії в тонкому шарі сорбенту передбачає підбір рухомих фаз з низькою кореляцією значень R_f (зазвичай, дві або три такі системи) та наступну візуалізацію хромогенними реактивами. Доказовим для детектування токсиканта є використання чотирьох реактивів.

Як видно з наведених у табл. 2.2 даних, для меліпраміну оптимальними є системи 2, 6 та 9 з низьким рівнем кореляції величин R_f між ними. Як реактиви для наступного детектування вказаного препарату слід використовувати УФ-промені, пари йоду, реактиви Лібермана, Манделіна та Фреде.

2.4 Меліпрамін. УФ-спектрофотометричне визначення

В літературних джерелах наводяться дані щодо визначення меліпраміну методом ультрафіолетової спектрофотометрії, при цьому вказується на специфічне характеристичне світлопоглинання в УФ-ділянці (λ_{max} відповідала 251 нм у розчині хлоридної кислоти). Однак умови виконання кількісного визначення вказаного препарату та значення коефіцієнтів світлопоглинання не зазначались.

В нашій роботі УФ-спектрофотометричний метод використано з метою детектування меліпраміну, що був виділений з тканини модельного секційного біоматеріалу, на етапі проведення підтверджуючого хіміко-токсикологічного дослідження, а також для його кількісного визначення в біоекстрактах.

З цієї метою нами було приготовлено стандартний розчин меліпраміну в 0,1 М р-ні HCl (конц-я $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л). 0,03170 г лікарського препарату розчиняли в мірній колбі (100,00 мл) та доводили до відповідної позначки розчином кислоти. Спектр світлопоглинання розчину (діапазон величин A становив від 0,1 до 1,0) вимірювали на спектрофотометрі (діапазон довжин хвиль становив від 200 до 370 нм; кювета з товщиною слою поглинання 10 мм; «нольовий розчин» – 0,1 М розчин HCl).

Максимальну абсорбцію імізину в 0,1 М р-ні HCl спостерігали при 251 нм ($A^1_1 = 289$, $\epsilon = 9011$).

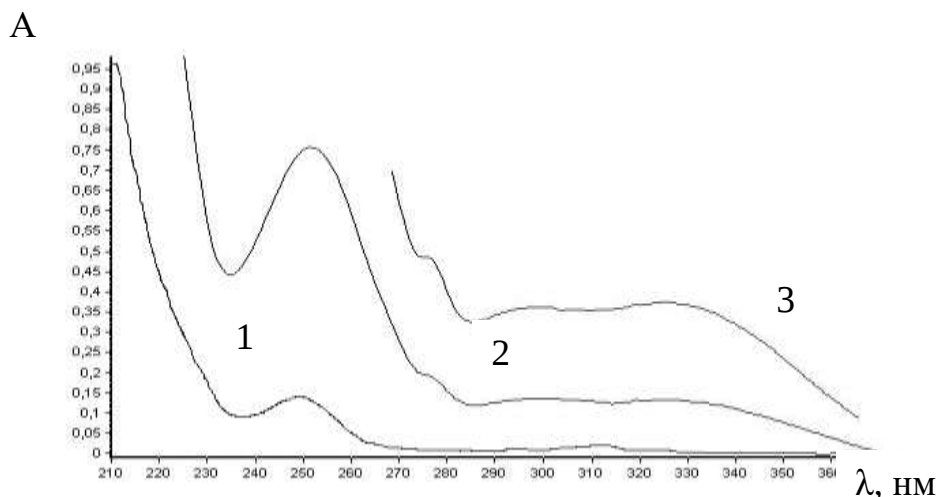


Рис. 2.1. Спектр світлопоглинання розчину меліпраміну в УФ-ділянці в 0,1 М розчині кислоти хлоридної (1 конц-я – $1,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л; 2 – конц-я $8 \cdot 10^{-5}$ моль/л; 3 – конц-я $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л)

2.5 Меліпрамін. Кількісне визначення УФ-спектрофотометричним методом

Процедуру кількісного визначення імізину виконували при $\lambda_{\max}$ 251 нм. Методику нами було провалідовано за діапазоном лінійності, межею виявлення (LOD) та кількісного визначення (LOQ), правильністю протягом одного дня («intra day») та протягом трьох днів («inter day») і показником прецизійності.

Методика побудови калібрувального графіка. Станд-й розчин імізину готували шляхом розчинення 0,00340 г його гідрохлориду (0,00300 г основи) в 0,1 М розчині HCl (колба на 100,0 мл), отримуючи розчин з концентрацією 30 мкг/мл. Для приготування робочих станд-х р-нів до ряду мірних колб (10,0 мл) каліброваною піпеткою переносили по 0,5; 1,0 – 9,0 мл стандартних розчинів, доводячи об'єм до позначки 0,1 М HCl (отримано концентрації 1,5 мкг/мл; 3,0 мкг/мл; 6,0 мкг/мл; 9,0 мкг/мл; 12,0 мкг/мл; 15,0 мкг/мл; 18,0 мкг/мл; 24,0 мкг/мл та 27,0 мкг/мл). Для отриманих розчинів було виміряно показники світлопоглинань А (при 251 нм).

Показники A для дев'яти робочих стандартних розчинів меліпраміну при $m = 9$ та $n = 2$ нами були обраховані за методом лінійної регресії, її загальний вигляд відповідає рівнянню виду: $y = b \times x + a$. Перевірка значущості параметру a (критерій Фішера) показала неможливість переходу до рівняння за видом: $y = b' \times x$, тобто побудований калібрувальний графік для кількісного визначення меліпраміну описується рівнянням: $y = 0,0417 \times x - 0,043$.

Метрологічні характеристики, обчислені для калібрувального графіку для спектрофотометричного методу кількісного визначення меліпраміну, наведено нами в табл. 2.3.

Лінійність (діапазон лінійності опрацьованої методики): лінійність відповідає межам концентрацій імизину від 3,0 до 27,0 мкг/мл.

А

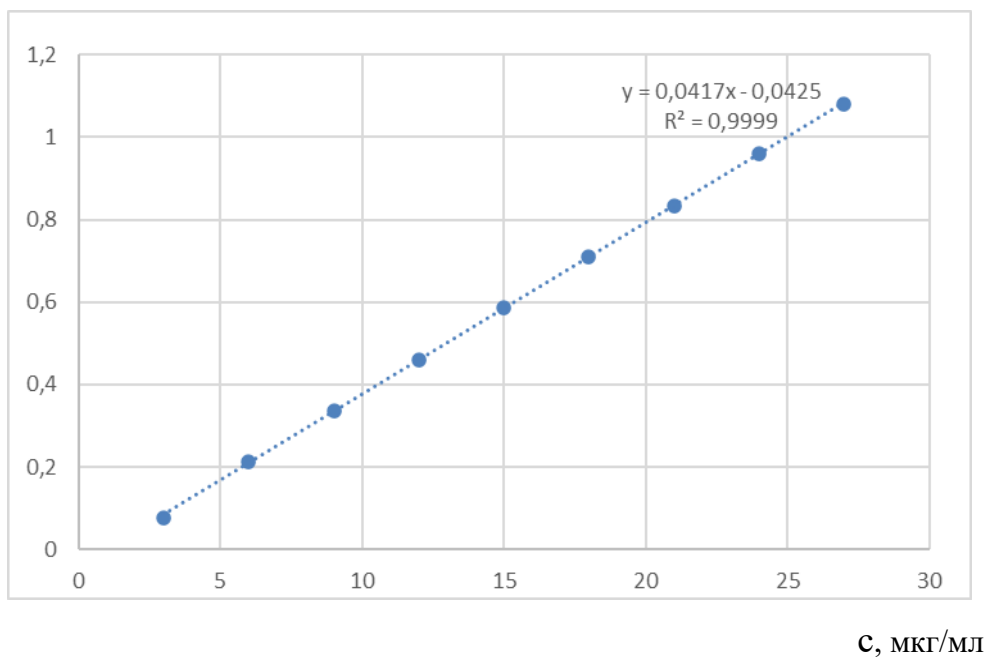


Рис. 2.2. Калібрувальний графік для кількісного визначення меліпраміну УФ-спектрофотометричним методом

Таблиця 2.4

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

Пара- метр	r	b	a	S^2	Δb	Δa	S_a	S_b
Значен- ня	0,9999	0,0417	- 0,043	$7,9 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-4}$	0,007	0,0040	$2,1 \cdot 10^{-4}$

Нами також розраховані значення LOD та LOQ за значеннями стандартного відхилення вільного члену в рівнянні побудованого калібрувального графіку (S_a) відповідно до формул: $LOD = 3,3 \times S_a^2/b$ та $LOQ = 10 \times S_a^2/b$, де S_a – значення станд-го відхилення вільного члену в рівнянні калібр-го графіку;

b – вугловий коефіцієнт рівняння.

Обчислені нами значення LOD та LOQ становили 0,3 мкг/мл та 1,0 мкг/мл (відповідно).

Показники правильності та прецизійності опрацьованої методики також встановлювали на трьох рівнях концентрацій імизину протягом одного дня (*intra day*) (табл. 2.5) та трьох днів (*inter day*) при $n = 3$ (табл. 2.6).

Таблиця 2.5

**Показники правильності та прецизійності УФ-спектрофотометричного
методу кількісного визначення меліпраміну (*intra day*)**

Внесено, мкг	Світлопоглинання	Визначено, мкг	Визначено/ внесено, %	Середнє значення, %	SD	RSD , %	ε , %
3,0	0,079	2,94	98,00	100,10	1,091	1,92	2,32
	0,081	3,02	100,66				
	0,083	3,05	101,66				
15,0	0,581	14,86	99,06	99,57	1,144	1,02	3,21
	0,586	14,92	99,46				

	0,597	15,03	100,20				
30,0	1,221	30,05	100,16	99,35	1,272	1,35	3,43
	1,199	29,39	97,96				
	1,217	29,98	99,93				

Я видно з даних, що наведені в таблиці, значення показників «правильність» та «прецизійність» *intra day* складають 100,10 % (RSD = 1,92 %, низький конц-й рівень), 99,57% (RSD = 1,02%, середній конц-й рівень, та 99,35 % (RSD = 1,35%, високий конц-й рівень меліпраміну).

Таблиця 2.6

Показники правильності та прецизійності УФ-спектрофотометричного методу кількісного визначення меліпраміну (*interday*)

Внесе-но, мкг	День	Світло-поглинання	Визначено, мкг	Визначено/внесено, %	Середнє значення, %	SD	RSD, %	ε, %
3,0	I	0,080	2,96	98,60	100,85	1,712	1,69	2,11
		0,085	3,08	102,66				
		0,084	3,06	102,00				
				Середнє 101,22				
	II	0,082	3,00	100,00				
		0,087	3,10	103,33				
		0,086	3,09	103,00				
				Середнє 102,11				
	III	0,083	3,01	100,33				
		0,078	2,94	98,00				
		0,081	2,99	99,33				
				Середнє 99,22				
15,0	I	0,593	15,06	100,40	100,11	0,937	0,77	1,20
		0,590	15,02	100,13				
		0,586	14,98	99,86				
				Середнє				

				100,07				
	II	0,589	15,00	100,00				
		0,592	15,05	100,33				
		0,591	15,03	100,20				
				Середнє				
				100,18				
	III	0,593	15,06	100,40				
		0,588	14,98	99,86				
		0,589	15,00	100,00				
				Середнє				
				100,08				
30,0	I	1,224	30,13	100,43	100,09	1,012	0,081	1,25
		1,220	30,02	100,06				
		1,219	30,01	100,03				
				Середнє				
				100,17				
	II	1,217	29,97	99,90				
		1,223	30,11	100,36				
		1,219	30,01	100,03				
				Середнє				
				100,09				
	III	1,220	30,02	100,06				
		1,221	30,04	100,13				
		1,195	29,41	99,83				
				Середнє				
				100,01				

Як зазначено в таблиці 2.5, показники правильності та прецизійності *inter day* становили 100,85 % (RSD = 1,69%) на низькому рівні концентрацій імізину, 100,11 % (RSD = 0,77%) на середньому концентраційному рівні, та 100,09 % (RSD = 0,08%) на високому рівні концентрацій.

Висновки до розділу 2

1. Досліджено хроматографічну поведінку меліпраміну в різних тонких шарах сорбентів з використанням скринінгових рухомих фазах, що запропоновані Асоціацією токсикологів для проведення попереднього дослідження біоекстрактів на наявність лікарських речовин, а також деяких інших, які є загальноновживаними при проведенні хроматографічних біоаналітичних досліджень сильнодіючих лікарських речовин. Хроматографічні дослідження опрацьовано для чотирьох типів пластин для ТШХ.

2. Проведено підбір хроматографічних систем з низькою кореляцією значень R_f для імизину, застосування яких здатне підвищити надійність виявлення вказаного антидепресанту при проведенні скринінгу ТШХ-методом.

3. Вивчено процес взаємодії меліпраміну з хромогенними реактивами-візуалізаторами, які використовуються при виконанні попереднього етапу скринінгу на основі тонкошарової хроматографії та встановлено їх чутливість.

4. Встановлено наявність характеристичного специфічного світлопоглинання меліпраміну в ультрафіолетовій ділянці спектру, що дає можливість використовувати метод УФ-спектрофотометрії для його детектування при виконанні токсикологічних досліджень.

5. Опрацьовано методику кількісного визначення меліпраміну методом УФ-спектрофотометрії та проведено її валідацію за показниками: межа виявлення та межа кількісного визначення, діапазон лінійності, правильність, прецизійність. Методика є придатною для практичного використання в аналітичній токсикології, що підтверджено відповідними валідаційними параметрами.

РОЗДІЛ 3

МЕЛІПРАМІН. ВИДІЛЕННЯ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Пробопідготовка при біоаналітичних дослідженнях передбачає переведення токсиканту з наважки тканин чи проб біорідин до витягу, видалення заважаючих біологічних компонентів-домішок, що чинить вплив на достовірність аналітичних токсикологічних визначень в цілому. На сьогодні рідинна екстракція є превалюючим методом пробопідготовки об'єктів. Дослідження умов екстракції аналіту пов'язане зі встановленням ступеню ліпофільності токсиканту, величини pK_a , полярності та щільності підібраного екстрагенту.

Вивчаючи умови рідинно-рідинної екстракції аналітів, слід також враховувати, що в біоекстрактах присутні фонові речовини, які іноді унеможливають подальші токсикологічні дослідження, тобто, на практиці слід враховувати певні морфологічні особливості біоматриць.

Важливим фактором стосовно ізолювання лікарської речовини є її взаємодія зі складовими біологічних матриць: екстракцією виділяють виключно вільну частину аналіту.

3.1 Очищення екстрактів з об'єктів дослідження

Процес екстракційного видалення з біовитягів домішок є основним серед методів очищення екстрактів від переважної кількості компонентів біологічного походження. Але екстракційний метод загалом не дозволяє отримати екстракти високої чистоти, окрім того, його проведення пов'язане з втратами досліджуваного аналіту, іноді суттєвими.

Багаторічними систематичними дослідженнями доведено раціональність поєднання методів екстракції та ТШХ-очищення, що широко впроваджено до практики біоаналітичних досліджень, в тому числі і при виконанні токсикологічного скринінгу несерійних зразків аналітів, якими є об'єкти судово-токсикологічних досліджень.

Нами досліджено умови процесу екстрагування імизину з водного розчину у залежності від природи органічного екстрагенту та показника рН середовища.

Необхідні значення показників рН для водних розчинів створювали, використовуючи універс-й буферний р-н Бріттона-Робінсона (межі значень рН 2,00 – 11,98), 0,1 М розчин к-ти хлоридної (рН 1,10) та 0,1 М р-н натрій гідроксиду (рН 13,0). Гідрофобними екстрагентами були свіжоперегнані: хлороформ, 1,2-дихлоретан, толуен та етилацетат. До ділительних лійок місткістю 150 мл додавали по 9,0 мл відповідного буферного р-ну, 1,0 мл водного р-ну імизину (вміст 40 мкг/мл) та 10,0 мл досліджуваного гідрофобного органічного екстрагенту. Лійки обережно струшували протягом десяти хвилин, а потім залишали для розшарування фаз (на десять хвилин). Відокремлений шар органічного екстрагенту профільтровували через скляний фільтр, який містив 0,25 г безводного натрій сульфату, переносили його до порцелянової чашки та випаровували в потоці теплого повітря до видалення розчинника. Висушені залишки кількісно розчиняли в 10,0 мл 0,1 М р-ну к-ти хлоридної та визначали вміст імизину в отриманих нами розчинах методом ультрафіолетової спектрофотометрії, як зазначено в розд. 2.5.

Опрацьовані нами результати з дослідження ступеню екстрагування меліпраміну засвідчили, що кращим органічним екстрагентом для препарату є хлороформ при рН 9-10. Етилацетат є оптимальним екстрагентом біодомішок при рН 1, про що свідчать показники ступенів екстракції меліпраміну, наведені в табл. 3.1.

При опрацюванні способу екстракційного видалення біодомішок з витягів з біологічного матеріалу елюати, що отримано після виділення меліпраміну з гомогенізованих тканин печінки, вносили до порцелянової випаровувальної чашки та видаляли екстрагенти нагріванням на водяній бані (40 °C).

Таблиця 3.1

**Залежність ступеню екстракції меліпраміну з водних розчинів
органічними розчинниками в залежності від рН середовища**

рН середовища	Ступінь екстракції органічними розчинниками, % (n = 5; P = 0,95)			
	Хлороформ	1,2- Дихлоретан	Толуен	Етилацетат
1	11,3	9,2	8,7	4,4
2	19,2	4,7	10,3	13,1
3	19,8	15,7	10,8	16,0
4	20,3	18,1	13,1	16,6
5	27,8	23,8	15,0	18,3
6	27,5	22,4	18,4	21,2
7	28,0	24,5	22,2	26,1
8	26,7	24,0	30,9	28,4
9	39,1	31,6	34,0	35,0
10	34,4	28,3	35,6	37,2
11	28,5	23,9	23,2	29,5
12	16,8	14,5	17,3	21,3
13	10,9	10,7	12,8	18,6

До отриманого залишку додавали 20 мл 0,1 М р-ну кислоти хлоридної, перемішували, переносили до скляної ділильної лійки на 100,0 мл та суміші двічі, по 10 мл, збовтували з етилацетатом. Після розшарування фаз органічний розчинник відкидали. Залишок в лійці підлюговували 5 % р-ном натрій гідроксиду до рН 9,0 та екстрагували його тричі хлороформом (по 10 мл). Біоекстракти профільтровували через скляний фільтр з 0,25 г безв-го натрій сульфату до колби (місткість 25 мл) та доводили вміст до rischi хлороформом (V1).

Виконані нами експериментальні дослідження «холостих» екстрактів щодо ступенів звільнення їх від ендогенних компонентів після додаткового екстракційного видалення з них домішок, визначали шляхом вимірювання показників поглинання в ультрафіолетовій ділянці спектру, які становили

0,12–0,18. Це унеможливлювало проведення детектування та кількісного визначення імизину методом ультрафіолетової спектрофотометрії. Зважаючи на зазначене, усі біоекстракти додатково піддавали хроматографічному (ТШХ) очищенню.

Методика опрацювання допоміжного очищення біоекстрактів. 5-10 мл відповідного біоекстракту (V2), який було отримано після етапів додаткової очистки рідинною екстракцією, обережно нагрівали та випаровували до приблизно 0,05 мл та кількісно, тонкою смужкою, переносили на стартову лінію хроматографічної пластини «Merck». За 2 см від розміщеної проби біоекстракту наносили 10-20 мкл стандартного хлороф-го р-ну імизину-«свідка» (конц-я 1 мг в мл). Поряд тонкою смужкою наносили 5,0 мл попередньо випареної (0,05 мл) «холостої» біовитяжки. Екстракти на хроматограмах розвивали (послідовно): спочатку в хлороформі (імизин лишався на старті, біодомішки пересувались з фронтом фази розчинника до лінії фінішу), пластини підсушували (до видалення запаху хлороформу) на повітрі. Після цього пластини повторно хроматографували, розвиваючи їх в суміші рухомих розчинників метанол – 25 % розчин амоній гідроксиду (100:1,5). Значення величини R_f плями імизину, ізольованого з гомогенізованого біоматеріалу, та імизину-«свідка» співпадали та становили $0,47 \pm 0,04$. Біовитяжки, що отримано для «холостих» дослідів, не утворювали плям зі вказаним значенням R_f . Після цього виконували елюювання імизину з отриманих хроматограм сумішшю метанол – ацетон (9 : 2). З цією метою з необробленої реактивом-візуалізатором смуги хроматограми на місці, що відповідає локалізації плями імизину-«свідку», скляною пластинкою знімали шар нерухомої фази розміром 8 мм × 8 мм, вносили його до мікропробірки з притертою та пришліфованою пробкою та двічі, по два мілілітри, збовтували з сумішшю елюентів та відфільтрували суспензію крізь скляний фільтр, що був змочений елюентом, до мірної колби-піднометра (5,0 мл) і доводили до позначки (V3). Ступінь елюювання імизину сумішшю метанол – ацетон (9 : 2)

із шару силікагелю (сорбенту) визначали експериментально, досліджуючи модельні розчини вказаного тимолептика УФ-спектрофотометричним методом. В зазначених умовах ступінь елюювання імизину (меліпраміну) дорівнював $99,8 \pm 1,1 \%$.

3.2 Розробка умов ізолювання меліпраміну з гомогенізованого біоматеріалу хлороформом

До наважки дрібноподрібненого біооб'єкту (5 г) тканин печінки, взятих з найбільш кровонаповнених частин органу, додавали піпеткою 1 мл водного розчину імизину, що вміщував 500 мкг цього препарату. В таких же умовах, паралельно, приготувляли «контрольні» проби з подрібненим біоматеріалом). За одну добу після «зараження» секційного матеріалу його переносили до невеликого розміру порцелянової ступки, порціями додавали до суміші 20 г натрій сульфату безводного та ретельно, розтиранням, доводили його до стану однорідної та легкосипучої маси. За допомогою капсули гомогенізований та висушений об'єкт переносили до скляної бюретки (діаметр 10 мм, довжина 50 мм) з краном. Для запобігання потрапляння сипучої маси до шліфа крану, в бюретку, до її нижньої частини, вносили тампон з марлі. Обережно відкривали кран колонки та повільно, уникаючи утворення полостей з повітрям, заповнювали її хлороформом, використовуючи гумову грушу, до шару органічного розчинника над гомогенізатом тканин товщиною приблизно 20 мм. Над заповненою біоматеріалом колонкою, у лабораторному штативі закріплювали ділильну лійку зі свіжоперегнаним хлороформом (близько 100 мл). З ділильної лійки до заповненої об'єктом колонки повільно додавали хлороформ зі швидкістю 70-80 крапель на хв. Зібрану фазу органічного елюента переносили до іншої ділильної лійки, вносили туди 80 мл води, підлуженої до рН 8 25 % розчином амоній гідроксиду та несильно струшували протягом 10 хвилин. Після повного розшарування рідин органічний шар відокремлювали, профільтровуючи його через скляний фільтр, який містив 1,5 г безводного

натрій сульфату. Хлороформні елюати повільно випаровували до сиропоподібного стану на водяній бані при температурі, що не перевищувала 40 – 45°C. Перед проведенням виявлення імізину та його кількісним визначенням випарений біоекстракт піддавали допоміжному очищенню послідовно, використовуючи методи тонкошарової хроматографії та екстракційний метод (наведено в розд. 3.1). Кількісне визначення імізину, виділеного з тканин печінки, проводили за допомогою УФ-спектрофотометричного методу, використовуючи побудований нами калібрувальний графік (наведено в розд. 2.5).

Методика проведення екстракційної очистки біоекстрактів у системі розчинників петролейний етер – ацетонітрил (модифікований метод). Висушений залишок біоекстракту ретельно розчинювали в 10 мл петролейного етеру та проводили чотириохкратне екстрагування ацетонітрилом (5 мл для кожного разу). Об'єднані ацетонітрильні витяги повільно випаровували на нагрітій до 40°C водяній бані до повного видалення вказаного органічного розчинника. До ретельно очищеного таким чином сухого залишку додавали 10 мл перегнаного хлороформу, кількісно переносячи суміш до мірної колби об'ємом 10,0 мл. Вміст колби доводили до позначки зазначеним органічним розчинником (V1). Після цього виконували очищення також і методом тонкошарової хроматографії (наведено в розд. 3.1). При проведенні кількісної оцінки вмісту імізину в біоекстрактах-елюатах проводили УФ-спектрофотометричним методом, використовуючи калібрувальний графік (як наведено в розд. 2.5).

3.3 Виявлення меліпраміну в біоекстрактах методом тонкошарової хроматографії та хромогенними реакціями

Проводили виявлення імізину в біоекстрактах, що отримані після допоміжного екстракційного видалення заважаючих ендогенних домішок. З зазначеною метою до лінії старту хроматографічної пластини (близько 1,5 см від кожного з країв) скляним відкаліброваним капіляром наносили в одну

точку 10 мкл хлороформного ст-го р-ну імізину (висхідна конц-я 1,0 мг/мл), а поруч – вузькою смугою, довжиною 2 см, наносили весь об'єм біоекстракту, що використовувався для ТШ-хроматографічного очищення (зазначено в розд. 3.1). Поруч, для контролю хроматографічної «чистоти», наносили близько 2-3 мл біоекстракту, що було отримано паралельно з контрольного «холостого» витягу. Безпосередньо перед хроматографічними дослідженнями всі біоекстракти було випарено до мінімально можливого об'єму (0,04-0,05 мл). Усі хроматографічні пластини з екстрактами піддавали послідовному хроматографуванню: рухома фаза 1 – хлороформ (відокремлення домішок з біологічної матриці від імізину, які найбільшою мірою рухались з фронтом рухомої фази до лінії фінішу хроматографічного поля, імізин лишався на лінії старту хроматографічної пластини). Потім, після ретельного висушування пластин з пробами біоекстрактів, їх повторно розвивали в рухомій фазі метанол – 25 % розчин амонію гідроксиду (100:1,5) (R_f 0,47–0,51). Процес детектування плям імізину в стандартному р-ні та в біоекстракті виконували послідовно: спочатку в УФ-променях, потім реактивом Драгендорфа-Мун'є, далі – хромореактивами Лібермана та Фреде. Отримані нами величини значень R_f плям імізину, виділеного з гомогенізованого біоматеріалу, та імізину в стандартному р-ні співпадали в межах похибки виконання експерименту. «Холості» біоекстракти не утворювали будь-яких забарвлених плям на пластині з вказаними значеннями R_f .

Залишкові кількості очищених елюатів наносили на хроматографічні пластини, додавали до проб реактив Манделіна, а потім обробляли в герметичній камері парою формальдегіду. Кольори плям імізину у витягах з біоматеріалу та для проб стандартного р-ну повністю були тотожними, а для «холостих» дослідів плями на пластині відповідних забарвлень не утворювали.

3.4 Меліпрамін. УФ-спектрофотометричне визначення в екстрактах

Етап виявлення меліпраміну в біовитях було проведено після допоміжного ТШХ-очищення, а також попереднього екстракційного видалення домішок (як наведено в розд. 3.1).

Детектування імізину в допоміжно очищених елюатах з хроматограм. Елюат з пластини випаровували нагріванням при температурі 40 °С на водяній бані, сухий залишок ретельно розчиняли в 4 мл 0,1 М р-ну кислоти хлоридної, переносили до кювети товщиною 1 см та знімали спектр поглинання в ультрафіолетовій ділянці, як наведено нами раніше в розд. 2.3. Компенсаційним розчином був елюат з «холостого» дослід.

Було отримано УФ-спектр поглинання елюату, який містив імизин, виділений з гомогенізату біоматеріалу, що був аналогічним ультрафіолетовому спектру поглинання стандартного р-ну імізину в 0,1 М розчині к-ти хлоридної та мав один максимум світлопоглинання при $\lambda_{\max} = 251$ нм.

3.5 Кількісне визначення меліпраміну в біоекстрактах

При виконанні кількісних визначень меліпраміну в біоекстрактах нами використано опрацьований та описаний вище УФ-спектрофотометричний метод ($\lambda_{\max} = 251 \pm 2$ нм).

Методика визначення вмісту імізину в елюатах з очищених хроматограм УФ-спектрофотометричним методом. Відмірювали по 5 мл метанольно-ацетонових елюатів ($V_3 = 5,00$ мл) та випаровували (температура водяної бані не була більшою за 40 °С). Залишки в чашках розчиняли в 4 мл 0,1 М розчину к-ти хлоридної та вимірювали світлопоглинання досліджуваних розчинів. Як компенсаційний розчин (розчин порівняння) використано проби «холостих» елюатів. Розрахунки концентрацій імізину проводили за побудованим калібрувальним графіком (наведено в розд. 2.5).

Обрахунок кількісного вмісту імізину, який було виділено з гомогенізованої наважки біоматеріалу, виконували після послідовного

проведення обох опрацьованих способів екстракційного очищення (наведено в розд. 3.2), та обчислювали відсоток ізолювання для методик пробопідготовки (X): виділено препарату/внесено препарату, у %. Розраховували кількість імізину, яку було виділено з гомогенізованої наважки біоматеріалу (J , мкг), за формулою, що наведено нижче:

$$J = \frac{CV_1 V_3}{V_2}, \quad (3.1)$$

где C : – концентрація імізину в елюаті-екстракті, у мкг/мл;

V_1 – об'єм біоекстракту, що отримано шляхом ізолювання імізину з гомогенізованого біоматеріалу (з попереднім проведенням двократного екстр-го очищення), мл;

V_2 – об'єм біоекстракту, що відібрано для виконання ТШ-хроматографічного очищення, мл;

V_3 – об'єм елюату-екстракту, що було отримано після ТШ-хроматографічного очищення, мл;

Отримані нами експериментальні дані стосовно встановлення ефективності (розрізняючої спроможності) виділення імізину з гомогенізованих тканин модельної печінки хлороформом після виконання екстракційного видалення біодомішок на основі використання системи двох неводних розчинників ацетонітрил – петролейний етер, представлено в табл. 3.2. Проведеними нами раніше попередніми дослідженнями показано, що ефективність виділення імізину при елююванні його хлороформом та подальшим опрацюванням реекстракційного очищення у системі вода – гідрофобний органічний розчинник була відносно низькою – 27%. Така невисока ефективність, вирогідно, є пов'язаною з високою ліпофільністю імізину та його значною втратою в процесі виконання екстракційного видалення біодомішок у системі «кисле водне середовище» – органічний екстрагент. В процесі реекстракції разом з ліпідами, які містилися в органічному шарі, що не досліджувався, до витягів переходила також значна

кількість і високоліпофільного антидепресантного препарату. Запропонований нами новий підхід до виконання етапів пробопідготовки стосовно видалення біодомішок та запобігання втрат ліпофільної сполуки у систем неводних орг-х розчинників петролейний етер – ацетонітрил значною мірою дозволяє позбутися втрат лікарського препарату та суттєво підвищити ступінь «повернення» з біологічного матеріалу меліпраміну.

При проведенні процедури валідації методик, що використовуються при біоаналітичних дослідженнях, ступені ізолювання меліпраміну для запропонованого методу виділення препарату при елююванні хлороформом з проведенням тонкої екстракційної очистки в системі петролейний етер – ацетонітрил було встановлено для трьох концентраційних рівнів препарату: $80,1 \pm 3,9$ % для 50 мкг, $80,8 \pm 4,6$ % для 250 мкг, $81,5 \pm 3,8$ % на 500 мкг.

Таблиця 3.2

Ступінь ізолювання меліпраміну з тканин модельної печінки при елююванні хлороформом та екстракційною очисткою в системі петролейний етер - ацетонітрил

Додано меліпраміну до 5 г гомогенізованої печінки, мкг	Ізольовано меліпраміну з печінки, %	Метрологічні характеристики					
		$\bar{X}$, %	SD	RSD, %	$S_{\bar{X}}$	$\Delta\bar{X}$	ϵ , %
50	77,3	80,1	2,30	2,87	1,33	3,9	4,8
50	82,7						
50	80,4						
250	83,2	80,8	2,71	3,35	1,56	4,6	5,7
250	78,1						
250	81,0						
500	79,9	81,5	2,77	,90	1,30	3,8	4,7
500	83,1						
500	81,6						

Коефіцієнт Ст'юдента 2,919

Опрацьований нами індивідуальний метод ізолювання меліпраміну при його елююванні з колонки хлороформом з попередньо гомогенізованого та зневодненого біоматеріалу з наступною ретельною екстракційною очисткою у системі неводних екстрагентів петролейний етер – ацетонітрил дає можливість значно підвищити ефективну розрізняючу спроможність виділення імізину в порівнянні з загальнозживаними в токсикологічній хімії методами ізолювання шляхом настоювання об'єктів з полярними розчинниками (підкисленою водою та підкисленим спиртом етиловим).

Висновки до розділу 3

1. Вперше запропоновано високоефективну методику екстракційного видалення супутніх домішок з отриманих при елююванні хлороформом екстрактів, які містять антидепресантний препарат меліпрамін, засновану на використанні неводної системи розчинників петролейний етер – ацетонітрил.

2. Розроблено умови для оптимального хроматографічного очищення біологічних екстрактів, які містять меліпрамін. Досліджено та запропоновано оптимальні системи рухомих фаз та ефективний елюент препарату з хроматограм, що забезпечує високий ступінь його елюювання з пластин.

3. Встановлено ефективну розрізняючу спроможність оригінального способу ізолювання лікарських речовин відносно до меліпраміну при елююванні хлороформом із гомогенізованого та зневодненого біоматеріалу з подальшим проведенням екстракційного очищення витягів у системі петролейний етер – ацетонітрил. Експериментально підтверджено, що використання вказаного способу пробопідготовки об'єкту сприяє підвищенню ступеню ізолювання з нього меліпраміну у порівнянні до загальних методів ізолювання «лікарських отрут».

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

В процесі проведення експериментальних досліджень виконано систематичні хіміко-токсикологічні стосовно розробки ефективного методу ізолювання з гомогенізованого біологічного матеріалу антидепресанту меліпраміну, що враховують високу ліпофільність препарату. Запропоновано схему послідовного проведення токсикологічних досліджень об'єктів біологічного походження на наявність зазначеного препарату на основі оригінальної методики пробопідготовки та хімічних і фізико-хімічних методів дослідження, що придатні для практичного застосування при виконанні біоаналітичних токсикологічних досліджень в клінічній токсикології та судово-токсикологічній експертизі.

1. Розроблено умови ізолювання препарату антидепресивної дії меліпраміну за допомогою спеціального методу, заснованого на його елююванні хлороформом з попередньо зневодненого та гомогенізованого біоматеріалу та наступним проведенням екстракційного видалення ендогенних домішок у системі неводних розчинників петролейний етер – ацетонітрил. Встановлено, що застосування зазначеного методу підготовки проби до дослідження запобігає втратам меліпраміну та значно підвищує ефективність його ізолювання у порівнянні з методами, заснованими на настоюванні з підкисленою водою та підкисленим спиртом етиловим.

2. Запропоновано оптимальні умови проведення скринінгових токсикологічних досліджень біоекстрактів на наявність меліпраміну. Рекомендовано декілька хроматографічних систем з низькими рівнями кореляції для величин R_f меліпраміну, що сприяє підвищенню надійності та специфічності виявлення зазначеного препарату методом хроматографії в тонкому шарі сорбенту.

3. Досліджено процеси взаємодії меліпраміну зі скринінговими хромогенними та осадовими реактивами, що використовуються як найбільш

чутливі візуалізатори при виконанні попереднього етапу загального токсикологічного скринінгу на основі тонкошарової хроматографії та встановлено їх чутливість по відношенню до зазначеного антидепресанту.

4. Досліджено світлопоглинання меліпраміну в ультрафіолетовій ділянці спектру та встановлено його специфічне світлопоглинання в 0,1 М розчині кислоти хлоридної при $\lambda_{\max} = 251$, що надає можливості використовувати УФ-спектрофотометричний метод для ідентифікації зазначеного трициклічного антидепресанту в біоекстрактах при виконанні хіміко-токсикологічних досліджень.

5. Запропоновано оптимальні умови для виконання кількісного визначення меліпраміну в біоекстрактах УФ-спектрофотометричним методом. Проведено валідацію опрацьованої спектрофотометричної методики кількісного визначення за наступними валідаційними показниками: межа виявлення та межа кількісного визначення, діапазон лінійності, правильність і прецизійність. Розроблена нами методика кількісного визначення меліпраміну відповідає критеріям до методів аналітичної токсикології.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Hippocampal monoamine changes in the Flinders sensitive line rat: A case for the possible use of selective α_2 C-AR-antagonists in stress and anxiety disorders in companion animals / B. H. Harvey et al. *Res. Vet. Sci.* 2021. Vol. 135. P. 175–183.
2. Changes in the cannabinoids receptors in rats following treatment with antidepressants / I. Smaga et al. *NeuroTox.* 2017. Vol. 63. P. 13–20.
3. Smaga I., Gawlinski D., Brodowicz J., Filip M. Brain region-dependent changes in the expression of endocannabinoid-metabolizing enzymes in rats following antidepressant drugs. *J. Physiol. Pharmacol.* 2019. 70(5). P. 705–713.
4. Reduced P2X receptor levels are associated with antidepressant effect in the learned helplessness model / D. E. Ribeiro et al. *Peer. J.* 2019. Vol. 7. P. e7834.
5. Pro-cognitive effect of acute imipramine administration correlates with direct interaction of BDNF with its receptor, Trk β / A. Faron-Górecka et al. *Brain Research.* 2022. Vol. 1789. P. 147948.
6. Imipramine induces hyperactivity in rats pretreated with ouabain: Implications to the mania switch induced by antidepressants / S. S. Valvassori et al. *J. Affect. Disord.* 2022. Vol. 299. P. 425–434.
7. Sildenafil, alone and in combination with imipramine or escitalopram, display antidepressant-like effects in an adrenocorticotrophic hormone-induced (ACTH) rodent model of treatment-resistant depression / J. L. Bernardus Saayman et al. *Eur. J. Pharmacol.* 2024. P. 176434.
8. Imipramine Inhibits Migration and Invasion in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer PC-3 Cells via AKT-Mediated NF- κ B Signaling Pathway / E. Y. Lim et al. *Molecules.* 2020. T. 25(20). P. 4619.

9. Brand S. J., Harvey B. H. Exploring a post-traumatic stress disorder paradigm in Flinders sensitive line rats to model treatment-resistant depression I: bio-behavioural validation and response to imipramine. *Acta Neuropsychiatr.* 2016. Vol. 29(4). P. 193–206.
10. Imipramine and amitriptyline ameliorate the rotenone model of Parkinson's disease in rats / E. A. Kandil et al. *Neurosci.* 2016. Vol. 332. P. 26–37.
11. Noreen S., Farzana Ya., Darakhshan Jabeen H. Co-treatment with imipramine averted haloperidol-instigated tardive dyskinesia: Association with serotonin in brain regions. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2016. 29(6). P. 2273–2279.
12. Combinatorial Regimen of Carbamazepine and Imipramine Exhibits Synergism against Grandmal Epilepsy in Rats: Inhibition of Pro-Inflammatory Cytokines and PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway / F. H. Pottoo et al. *Pharmaceuticals.* 2021. Vol. 14(11). P. 1204.
13. Effects of escitalopram and imipramine on cocaine reinforcement and drug-seeking behaviors in a rat model of depression / J. Jastrzębska et al. *Brain Research.* 2017. Vol. 1673. P. 30–41.
14. Evaluation of Amlodipine and Imipramine Efficacy to Treat *Galleria mellonella* Infection by Biofilm-Producing and Antimicrobial-Resistant *Staphylococcus aureus* / M. Andrade et al. *Antibiotics.* 2025. Vol. 14(2). P. 183.
15. Astrocyte Intracellular Ca^{2+} and TrkB Signaling in the Hippocampus Could Be Involved in the Beneficial Behavioral Effects of Antidepressant Treatment / F. R. Ferreira et al. *Neurotox. Res.* 2021. Vol. 39(3). P. 860–871.
16. Combined hyperforin and lanicemine treatment instead of ketamine or imipramine restores behavioral deficits induced by chronic restraint stress

- and dietary zinc restriction in mice / B. Pochwat et al. *Front. in Pharmacol.* 2022. Vol. 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.933364>
17. Evaluation of Antidepressive-like Behaviours and Oxidative Stress Parameters in Mice Receiving Imipramine-Zinc Complex Compound / A. Szopa et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24(18). P. 14157.
 18. Imipramine Influences Body Distribution of Supplemental Zinc Which May Enhance Antidepressant Action / A. Rafał-Ulińska et al. *Nutrients.* 2020. Vol. 12(9). P. 2529.
 19. The Novel Imipramine–Magnesium Complex Exerts Antidepressant-Like Activity in Mice Subjected to the Forced Swim Test and the Tail Suspension Test / A. Serefko et al. *Molecules.* 2025. Vol. 30(3). P. 519.
 20. Effects of Tibetan medicine metacinnabar (β -HgS) combined with imipramine or sertraline on depression-like symptoms in mice / Y. Qiao et al. *Front. Pharmacol.* 2022. Vol. 13. P. 13:971243.
 21. The Effect of Chronic Mild Stress and Imipramine on the Markers of Oxidative Stress and Antioxidant System in Rat Liver / W. Duda et al. *Neurotox. Res.* 2016. Vol. 30(2). P. 173–184.
 22. Molecular Consequences of Depression Treatment: A Potential In Vitro Mechanism for Antidepressants-Induced Reprotoxic Side Effects / P. Sołek et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22(21). P. 11855.
 23. IGF-1 as selected growth factor multi-response to antidepressant-like substances activity in C57BL/6J mouse testis model / A. Tabecka-Lonczynska et al. *Acta Histochem.* 2021. Vol. 123(3). P. 151685.
 24. An approach to evaluate metabolite-related phototoxicity with combined use of photochemical properties and skin deposition / Y. Seto et al. *Toxicol. Lett.* 2021. Vol. 350. P. 91–97.
 25. Basal prolactin levels in rat plasma correlates with response to antidepressant treatment in animal model of depression / A. Faron-Górecka et al. *Neurosci. Lett.* 2017. Vol. 647. P. 147–152.

26. UV-photodegradation of desipramine: Impact of concentration, pH and temperature on formation of products including their biodegradability and toxicity / N. D. H. Khaleel et al. *Sci. Tot. Environ.* 2016. Vol. 566–567. P. 826–840.
27. Liquid-Phase Microextraction and Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis of Antidepressants in Vitreous Humor: Study of Matrix Effect of Human and Bovine Vitreous and Saline Solution / M. F. dos Santos et al. *J. Anal. Toxicol.* 2016. Vol. 40(3). P. 187–193.
28. Ciuca M. D., Racovita R. C. Development of Visible Spectrophotometric Methods for the Determination of Tricyclic Antidepressants Based on Formation of Molecular Complexes with p-Benzoquinones. *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24(23). P. 16744.
29. Simple and green synthesis of carbon dots (CDs) from valerian root and application of modified mesoporous boehmite (AlOOH) with CDs as a fluorescence probe for determination of imipramine / R. Sobhani et al. *Anal. Bioanal. Chem.* 2019. Vol. 411(14). P. 3115–3124.
30. Novel, fast, and reliable electrochemical dsDNA biosensor based on O-terminated pristine nanocrystalline boron-doped diamond electrode for DNA interaction studies / M. Augustín et al. *Bioelectrochemistry.* 2024. Vol. 158. P. 108691.
31. Investigation on the performance of cross-linked poly(acrylic acid) and poly(methacrylic acid) as efficient adsorbents in SPE column for simultaneous preconcentration of tricyclic antidepressants in water samples / C. R. T. Tarley et al. *Anal. Methods.* 2022. Vol. 14. P. 5100–5109.
32. Adsorptive removal of cationic tricyclic antidepressants using cation-exchange resin / J. W. Choi et al. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2020. Vol. 27(20). P. 24760–24771.

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

Міністерство охорони здоров'я України
 Міністерство освіти і науки України
 Національний фармацевтичний університет
 Кафедра фармацевтичної хімії
 Українське товариство медичної хімії



СЕРТИФІКАТ №263

Цим засвідчується, що

Лазарь Лідія

брав(-ла) участь у Міжнародній internet-конференції
 'Modern chemistry of medicines'
 7 листопада 2025 р., м. Харків, Україна

Посвідчення Державної наукової
 установи «Український інститут
 науково-технічної експертизи та
 інформації» № 850 від 26.12.2024 р.

В. о. ректора НФаУ, проф.

Завідувач кафедри
 фармацевтичної хімії НФаУ, проф.



[Signature]
[Signature]

Олександр КУХТЕНКО

Вікторія ГЕОРГІАНЦ