

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

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

**на тему: РОЗРОБКА МЕТОДУ ІЗОЛЮВАННЯ ВОРТІОКСЕТИНУ З
БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ВОДОЮ, ПІДКИСЛЕНОЮ
КИСЛОТОЮ АЦЕТАТНОЮ**

Виконала: здобувачка вищої освіти групи

Фм21(4,6з)мед-01а

спеціальності: 226 Фармація, промислова фармація

освітньо-професійної програми Фармація

Вікторія ТОЛПИГІНА

Керівник: професор закладу вищої освіти кафедри

фармацевтичної хімії, д.фарм.н., професор

Сергій БАЮРКА

Рецензент: завідувач кафедри загальної хімії,

д.фарм.н., професор

Сергій КОЛІСНИК

АНОТАЦІЯ

Метою дослідження є розробка оптимальних умов ізолювання новітнього препарату антидепресивної дії (тимолептика) вортіоксетину з тканин секційного матеріалу за допомогою спеціального методу, заснованого на екстракції зазначеного антидепресанта полярним розчинником – водою, підкисленою кислотою ацетатною, а також розроблення простих, чутливих та достатньо селективних методів виявлення, ідентифікації та кількісного визначення досліджуваного тимолептичного лікарського засобу в одержаних органічних витягах з тканин біологічного матеріалу на основі використання комплексу хімічних та фізико-хімічних методів: кольорових експрес-реакцій у сполученні з методом хроматографії в тонких шарах сорбенту (ТШХ), рідинної хроматографії, а також методів УФ-спектрофотометрії та зворотної екстракційної спектрофотометрії (у видимій ділянці спектру). Робота загальним об'ємом 58 сторінок, яка складається з трьох розділів, висновків, десяти таблиць, чотирьох рисунків та 33 джерел літератури.

Ключові слова: вортіоксетин, біологічні тканини, секційний матеріал, спеціальний метод ізолювання, підкислена вода, хроматографія тонкошарова, пряма УФ-спектрофотометрія, метод зворотної екстракційної спектрофотометрії.

ANNOTATION

The aim of the study is to develop optimal conditions for isolating the new antidepressant drug (thymoleptic) vortioxetine from tissues of sectioned material using a special method based on the extraction of the specified antidepressant with a polar solvent – water acidified with acetic acid, as well as to develop simple, sensitive and sufficiently selective methods for the detection, identification and quantitative determination of the studied thymoleptic drug in the obtained organic extracts from tissues of biological material based on the use of a complex of

chemical and physicochemical methods: color express reactions in combination with the method of thin-layer chromatography (TLC), liquid chromatography, as well as UV spectrophotometry and reverse extraction spectrophotometry (in the visible region of the spectrum). The work has a total volume of 58 pages, consisting of three sections, conclusions, ten tables, fourth figures and 33 references.

Keywords: vortioxetine, biological tissues, section material, special isolation method, acidified water, thin-layer chromatography, liquid chromatography, direct UV spectrophotometry, reverse extraction spectrophotometry method.

З М І С Т

ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1. ФАРМАКОДИНАМІКА ТА ТОКСИКОДИНАМІКА ВОРТІОКСЕТИНУ. АНАЛІТИЧНА ДІАГНОСТИКА ІНТОКСИКАЦІЙ ВОРТІОКСЕТИНОМ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	14
1.1 Терапевтичні аспекти застосування вортіоксетину в фармакологічній корекції ендogenous депресій.....	15
1.2. Аналіз біоаналітичних методів визначення вортіоксетину.....	18
1.3. Розчинність, молекулярна маса та основні властивості гідроброміду вортіоксетину	23
Висновки до розділу 1.....	24
РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ВОРТІОКСЕТИНУ. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВОРТІОКСЕТИНУ В БІОЕКСТРАКТАХ.....	26
2.1. Матеріали та методи.....	26
2.2. Детектування гідроброміду вортіоксетину за допомогою кольорових експрес-реактивів та осадкових реакцій.....	27
2.3. Виявлення гідроброміду вортіоксетину методом тонкошарової хроматографії	31
2.4. Ідентифікація гідроброміду вортіоксетину методом УФ- спектрофотометрії.....	33
2.5 Ідентифікація вортіоксетину методом ВЕРХ.....	34
2.6. Кількісне визначення гідроброміду вортіоксетину методом ультрафіолетової спектрофотометрії.....	35
2.7. Кількісне визначення гідроброміду вортіоксетину методом зворотньої екстракційної спектрофотометрії.....	38
Висновки до розділу 2.....	41

РОЗДІЛ 3. ВИДІЛЕННЯ ВОРТІОКСЕТИНУ З ТКАНИН СЕКЦІЙНОГО	
 БІОМАТЕРІАЛУ.....	43
3.1. Вивчення екстракції гідробромиду вортіоксетину	43
3.2. . Ізолювання вортіоксетину з тканин секційного біоматеріалу водою,	
 підкисленою кислотою ацетатною	45
3.3. Підтверджуючий етап скринінгу та проведення ідентифікації	
 вортіоксетину в біологічних витягах з тканин секційного матеріалу на	
 основі сполучення методів тонкошарової хроматографії та кольорових	
 експрес-реакцій.....	47
3.4. Використання методів УФ-спектрофотометрії та зворотнього	
 варіанту екстракційної спектрофотометрії для виявлення та кількісного	
 визначення вортіоксетину в витягах з тканин секційного матеріалу.....	48
Висновки до розділу 3.....	49
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ.....	51
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	53
ДОДАТКИ.....	57

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

HPLC	– High Pressure Liquid Chromatography
DL	– Detection Limit (Limit of Detection)
QL	– Quantitation Limit (Limit of Quantitation)
TIAFT	– The International Association of Forensic Toxicologists (Міжнародна асоціація судових токсикологів (МАСТ))
ВЕРХ-МС/МС	– метод високоефективної рідинної хроматографії з подвійним (тандемним) мас-спектрометричним типом детектуванням
МТФМЕ	– метод твердофазної мікроекстракції
АД	– антидепресант(и)
ТШХ-скринінг	– скринінг на основі тонкошарової хроматографії

ВСТУП

Актуальність теми. Захворювання на депресію – це серйозний розлад психічного здоров'я, що характеризується тривалим пригніченим станом, втратою інтересу до діяльності та нездатністю виконувати повсякденні справи. Симптоми включають зміни настрою, апетиту, сну, зниження енергії, проблеми з концентрацією, а також думки про самогубство. Депресія може бути спричинена різними факторами, включаючи генетику, стреси, та інші хвороби, і потребує професійної допомоги лікаря-психіатра. Як засвідчили експерти Всесвітньої організації охорони здоров'я, на депресією страждає близько 300 млн людей у всьому світі. В Україні депресія є найбільш поширеною проблемою серед психічних розладів. Депресія – це захворювання, при якому людина почувається пригнічено та втрачає інтерес до занять, які раніше приносили задоволення. Причини виникнення депресивних розладів включають спадковість, зміни рівнів нейромедіаторів, змінену нейроендокринну функцію та психосоціальні фактори. У людей із депресивним розладом часто виникають думки про самогубство, а можливі супутні психічні порушення або розлади (тривожність, напади паніки), які зазвичай співіснують, часто ускладнюють діагностику та лікування захворювання.

Пацієнти з усіма формами депресії частіше зловживають алкоголем або нелегальними наркотиками, намагаючись самотійно лікувати порушення сну або симптоми тривоги, часто використовують антидепресанти на їх фоні, що призводить до важких наслідків для здоров'я.

Кожен з десяти хворих пацієнтів, що звертаються до лікаря з приводу лікування соматичних захворювань, має також і депресію з усіма її класичними клінічними проявами. Більше половини таких випадків залишаються нерозпізнаними, а у пацієнтів зі встановленим діагнозом тільки половина отримує відповідне адекватне медикаментозне лікування. Депресія — одне з найпоширеніших психічних захворювань. Зазвичай її лікують

антидепресантами, але не всім пацієнтам ці препарати допомагають. За даними дослідження (Journal of Clinical Psychiatry, 2021), майже третина хворих не реагує на лікування препаратами першої лінії протягом 1-3 місяців після початку терапії. Цей стан називається терапевтично резистентною (ТРД) або фармакорезистентною депресією. В Україні фіксується високий рівень поширеності депресії, що перевищує середні показники по ЄС, на хворобу страждає майже кожен восьмий дорослий мешканець. Наведені дані дослідження STEPS вказують на 12,4% дорослого населення, що мають симптоми, які відповідають клінічній депресії, з майже подвійним переважанням жінок (16,2%) над чоловіками (8,7%). Депресія є найбільш поширеним психічним розладом в Україні, і показники захворюваності, за даними МОЗ, продовжують зростати. Значна частина населення не вважає депресію хворобою і не звертається за професійною допомогою.

Токсикологічне значення препаратів тимолептичної дії обумовлено, насамперед, високим рівнем стресових станів людини, що призводить до серйозних порушень її психічного та емоційного здоров'я та серйозними негативними наслідками через можливий прояв небажаної побічної дії антидепресантів різних фармакологічних груп, в тому числі препаратів останніх генерацій, які дуже часто супроводжують фармакокорекцію та лікування тимолептиками. Станом на теперішній час систематичні біоаналітичні (хіміко-токсикологічні) дослідження з методів пробопідготовки, визначення лікарських препаратів-антидепресантів останніх генерацій в тканинах секційного матеріалу та біологічних рідинах людини, досліджені та опрацьовані недостатньо, а методи визначення препаратів-тимолептиків, що найчастіше наводяться в спеціалізованих наукових публікаціях, дуже часто пропонуються для виконання окремих спеціальних досліджень з питань вивчення механізмів та напрямків біотрансформації ксенобіотиків, кінетики та особливостей екскреції лікарських вказаних препаратів-антидепресантів. Переважно, такі методи засновані на різноманітних варіантах селективних методів газової та

ультрависокоефективної рідинної хроматографії з використання тандемних типів детектування. Такі інструментальні методи, зазвичай, є малодоступними, адже вони пов'язані з використання досить коштовного обладнання, високовартісних реактивів та інших матеріалів.

Вортіоксетин – є новітнім лікарським антидепресивним препаратом, родоначальником серії оригінальних тимолептиків, які за своєю структурою суттєво відрізняються від усіх існуючих антидепресантних засобів – є похідним біс-арилсульфаніламінів. Вортіоксетин в медичній практиці рекомендується до застосування при комбінованій фармакотерапії депресивного синдрому у дорослих людей.

Відповідно до чисельних публікацій моніторингових центрів, у всьому світі регулярно реєструються досить чисельні випадки індивідуальних та комбінованих, часто на фоні вживання етилового алкоголю, важких інтоксикацій вортіоксетином. Означений препарат, безумовно, є потенційним об'єктом для хіміко-токсикологічних досліджень, але біоаналітичних методів його визначення в тканинах секційного матеріалу практично не розроблено. Методи ізолювання вказаного тимолептика з біоматеріалу на основі його екстракції полярними розчинниками (загальноприйнятими в аналітичній токсикології методами) мають низьку ефективність та є малопридатними для біоаналітичного призначення.

Мета дослідження. Метою даного дослідження є розроблення спеціального (індивідуального) методу виділення тимолепичного засобу нової генерації вортіоксетину з тканин секційного матеріалу (наважка модельної печінки) шляхом настоювання (екстракції) з полярним розчинником – водою, підкисленою кислотою ацетатною на етапі пробопідготовки, а також наступною розробкою методів виявлення та ідентифікації зазначеного препарату в отриманих витягах з гомогенізованих тканин печінки витягах з використанням методу хімічних реакцій у поєднанні з хроматографією в тонких шарах сорбенту на різних типах пластин, а також опрацювання умов визначення вортіоксетину методом

рідинної хроматографії, УФ-спектрофотометричним методом після додаткового очищення біологічних витягів поєднанням методів екстракції та ТШХ-методу. На заключному етапі хіміко-токсикологічного дослідження провести кількісне визначення вортиоксетину методом екстракційної спектрофотометрії у зворотньому варіанті визначення (видима ділянка спектру).

Завдання дослідження. Для досягнення попередньо поставленої нами мети необхідним було вирішити наступні практичні завдання:

1. провести розширений літературний пошук щодо систематизації та узагальнення інформації стосовно токсикологічної значущості препарату новітньої генерації вортиоксетину, проаналізувати відомі випадки моно- та поліотруєнь зазначеним тимолептиком, а також відповідних даних щодо існуючих в галузі клінічної біохімії та судової токсикології біоаналітичних методик його визначення в різноманітних об'єктах біологічного та небіологічного походження;
2. вивчити процес взаємодії вортиоксетину з найбільш відомими диференціюючими реактивами, які найчастіше використовуються у випадку виконання окремих етапів систематичного скринінгу сильнодіючих, психотропних та наркотичних речовин на основі підходу, що передбачає сполучення методу хроматографічного дослідження (ТШХ) та хромореактивів;
3. розробити достатньо чутливі та доступні методики визначення антидепресанту і показати можливість їх використання з метою ідентифікації та кількісного визначення вортиоксетину в біологічних витягах методом ультрафіолетової спектрофотометрії, методом рідинної хроматографії та методом зворотної екстракційної спектрофотометрії, з'ясувати оптимальні умови для їх використання при дослідженні біологічних витягів, що містять зазначений вище досліджуваний антидепресивний засіб;

4. вивчити та опрацювати можливості використання методу рідинно-рідинної екстракції (одно- та багатократної) для звільнення біологічних витягів, що отримані з тканини обраного секційного матеріалу, до якого попередньо було додано вортіоксетин, від присутніх біогенних речовин-домішок, спираючись на дослідження екстрагуючої здатності по відношенню до вказаного препарату деяких органічних розчинників з водних розчинів при різних їх значеннях рН;
5. встановити ефективність та розрізняючу здатність спеціального (індивідуального) методу ізолювання антидепресанту вортіоксетину з наважки тканин секційного біоматеріалу шляхом екстракції його полярним розчинником – водою, підкисленою кислотою ацетатною та показати можливість застосування запропонованого методу для потреб судово-токсикологічних досліджень.

Об'єкт дослідження. Систематичні хіміко-токсикологічні та біоаналітичні дослідження тимолептику останньої генерації в ряду антидепресантів – вортіоксетину.

Предмет дослідження: розробка комплексної пробопідготовки наважки тканин печінки (секційний матеріал) при проведенні направлено (цілеспрямованого) хіміко-токсикологічного аналізу об'єкту на присутність вортіоксетину.

Методи дослідження. Хімічний метод з використанням хромореагентів, хроматографічний метод (тонкошарова хроматографія), метод ультрафіолетової спектроскопії, рідинна хроматографія, зворотний варіант екстракційно-спектрофотометричного методу визначення (видима ділянка спектру).

Практичне значення отриманих результатів. В практичній частині магістерської роботи досліджено та запропоновано умови проведення основних етапів, пов'язаних з підготовкою наважки тканин секційного матеріалу (біооб'єкту) для виконання спрямованого (направленого) хіміко-токсикологічного аналізу щодо наявності в ньому вортіоксетину,

оптимізовано умови виявлення та ідентифікації, а також опрацьовано досить чутливі методики визначення кількісного вмісту тимолептичного засобу в отриманих біоекстрактах з наважки тканин секційного матеріалу із застосуванням досить вибіркових та достатньою мірою чутливих методів їх аналізу. Отримані експериментальні дані магістерської роботи можуть бути застосовані в галузі клінічної токсикології, а також при проведенні спеціальних судово-токсикологічних дослідженнях органів та тканин біооб'єктів на присутність в них вортіоксетину.

Елементи наукових досліджень. Вперше експериментально розроблено та систематизовано комплекс методик для окремих етапів хіміко-токсикологічного аналізу біооб'єкту стосовно вмісту новітнього тимолептичного лікарського засобу вортіоксетину із використанням ТШХ-методу та хромореактивів як експрес-тестів, рекомендованих Асоціацією судових токсикологів для проведення попереднього етапу систематичного скринінгу психотропів, наркотичних і сильнодіючих речовин. Розроблено методики проведення визначення кількісного вмісту вортіоксетину в біовитягах методами прямої ультрафіолетової спектрофотометрії, рідинної хроматографії та зворотним варіантом екстракційно-спектрофотометричного визначення (видима ділянка спектру) на основні реакції утворення іонних асоціатів з азобарвником метиловим оранжевим. Вперше вивчено умови ефективного екстрагування тимолептику вортіоксетину з водного розчину найбільш поширеними в аналітичній токсикології органічними розчинниками в залежності від рН водного середовища. На основі зазначеного комплексу методів аналізу розроблено ефективну спеціальну (індивідуальну) методику ізолювання вортіоксетину з секційного біоматеріалу шляхом екстрагування з водою, підкисленою кислотою ацетатною; оптимізовано умови для видалення з біовитягів ендогенних компонентів біологічної матриці (тканини подрібненої печінки) за допомогою двократної рідинно-рідинної екстракції.

Апробація результатів дослідження і публікації. Результати комплексних експериментальних досліджень, що було отримано при виконанні магістерської роботи, було представлено в збірнику тез: Толпигіна В. В., Баюрка С. В., Карпушина С. А. Розробка методу ізолювання вортіоксетину з біологічного матеріалу водою, підкисленою кислотою ацетатною. *Modern chemistry of medicines*: матеріали Міжнародної Internet-конференції (7 листопада 2025 р., м. Харків) – Харків: НФаУ, 2025. – С. 193.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи. Магістерська кваліфікаційна робота містить вступну частину, огляд та аналіз даних, отриманих з літературних джерел, двох розділів з валідованими результатами виконаних експериментальних досліджень, загальних висновків та переліку використаних наукових літературних джерел. Представлену роботу викладено на 58 сторінках, в ній міститься 10 таблиць, 3 рисунки, а також 33 літературних джерела.

РОЗДІЛ 1

ФАРМАКОДИНАМІКА ТА ТОКСИКОДИНАМІКА ВОРТІОКСЕТИНУ. АНАЛІТИЧНА ДІАГНОСТИКА ІНТОКСИКАЦІЙ ВОРТІОКСЕТИНОМ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Тимолептичні засоби є токсикологічно значущою групою лікарських препаратів, що пов'язано з їх досить значним використанням в сучасній практичній медицині як засобів для фармакокорекції та лікування патологічно зміненого психічного стану людини, а також небажаними побічними ефектами від тривалого лікування тимолептичними засобами [1–2]. Найголовнішими причинами інтоксикацій, які винивають при фармакотерапії антидепресантами різних генерацій та груп, є систематичні передозування через резистентний характер більшості захворювань на ендогенні види депресій, самолікування тимолептиками та чисельні випадки неадекватного вживання зазначеної групи препаратів сумісно з будь-якими іншими психотропами чи алкоголем. Біоаналітичні методи для проведення аналітичної діагностики інтоксикацій тимолептиками до теперішнього часу опрацьовані недостатньо. Наведені в наукових виданнях та статтях методики детектування для більшості представників антидепресантів мають відношення до їх визначення в біологічних середовищах живої людини та у тканинах біологічного матеріалу, передбачають проведення комплексних досліджень з фармако- або токсикокінетики ксенобіотиків, процесів метаболізму та біотрансформації лікарських засобів в умовах існування живого організму. Наведені в літературних джерелах багаточисельні та різноманітні методики визначення препаратів тимолептичної дії ґрунтуються на використанні високоселективних, з високою розрізняючою спроможністю, та сучасних методів ультрависокоєфективної хроматографії (УВЕРХ) з різними типами селективних детекторів. Такі сучасні прилади, реагенти та спеціальне обладнання до них, значною мірою, не є доступними фахівцям вітчизняної галузі експертних судово-токсикологічних досліджень.

Визначальне прикладне значення відіграє дослідження умов та встановлення ступенів ізолювання препаратів-тимолептиків з наважок секційного біоматеріалу їх екстрагуванням різними розчинниками з гідрофільними властивостями за певними, вже існуючими загальноживаними методиками, та за впроваджуваними індивідуальними методиками ізолювань з урахуванням фізико-хімічних властивостей досліджуваних аналітів, для переважної більшості не досліджених у хіміко-токсикологічному відношенні препаратів-антидепресантів, в тому числі й представників останніх генерацій, зазначені вище дослідження, особливо з визначення їх розрізняючої спроможності, в аналітичній токсикології не проводились.

1.1 Терапевтичні аспекти застосування вортіоксетину в фармакологічній корекції ендогенних депресій

Відома фармацевтична компанія з Данії Lundbeck на початку двохтисячних років розпочала методичний цілеспрямований біологічний скринінг нових синтезованих її лабораторією речовин, яким притаманна здатність сумісно інгібувати процес зворотнього нейронального захвату медіатору серотоніну та безпосередньо мати вплив на $5HT_{2C}$ структури рецепторів. Через деякий час за результатом ретельним чином проведених систем скринінгового відсіювання серії сполук – похідних арилпіперазину, було отримано ряд перспективних речовин-лідерів, що володіли вираженою високою нейрональною хімічною активністю щодо відношення до специфічного трансферного переносника білкової природи серотоніну, та до специфічних рецепторів $5HT_{1A}$ та $5HT_3$. Обраній після ретельних досліджень новій оригінальній сполуці було надано назву вортіоксетін.

Вортіоксетину гідробромід являє собою оригінальний лікарський з мультимодальним механізмом фармакологічної дії, що рекомендований для фармакотерапевтичної корекції депресивних станів різної етіології та ступеня важкості [1–2]. З огляду на суттєвий вплив препарату вортіоксетин на цілий комплекс медіаторних систем живого організму, цей лікарський засіб було

визнано «мультиmodalним нейротрансмітерним підсилювачем» [3–4]. Найчастіше депресивні захворювання проявляються у вигляді серйозних когнітивних порушень, наслідком чого є втрата концентрації хворими пацієнтами, неможливість зосередити увагу, значною загальмованістю та уповільненням мисленням, а також втрата навичок до відтворення будь-якої набутої інформації. Сучасний стан терапії депресивних станів пов'язаний з увагою фахівців, насамперед, саме до когнітивного аспекту зазначеного захворювання приділяють важливе значення. Вважається за доведене, що терапія когнітивних порушень має першочергове значення в процесі стабілізації звичайного стану функціонування людини, якщо хвороба знаходиться у стані ремісії, що, в свою чергу, буває достатнім для процесу стабільного відновлення у пацієнтів працездатності, що була порушена захворюванням на депресію [5]. Досягнення медичної науки, які оприлюднені останніми роками, засвідчують про наявність достатньо ефективних підходів по відношенню до фармакотерапевтичної корекції системно порушених когнітивних функцій, а також патологічних емоційних розладів. Слід також відмітити, як відмічають фахівці в галузі психофармакології, виключно високу терапевтичну ефективність при лікуванні хворих осіб з ендogenousними типами депресивних патологій та когнітивних порушень, чинять препарати з тимолептичною дією, що мають, насамперед, мультиmodalні механізми фармакологічної активності [3, 6–7]. Таким чином, зважаючи на наведене вище, необхідно відмітити, що найбільш оптимістичні сподівання у відношенні перспективи застосування з практичною метою пов'язані саме з терапією тимолептиком останньої оригінальної генерації серед усіх груп антидепресантів, що володіє доведеним мультиmodalним типом дії «Brintellix»[8].

Фармакологічні та токсикологічні властивості вортіоксетину в теперішній час знаходяться на етапі всебічного вивчення, навіть, усі можливі механізми фармакологічної активності вказаного тимолептичного засобу остаточно не є з'ясованими. Вважається доведеним, що препарат брінтеллікс

активним чином здатен модулювати серотонінергічну активність функцій центральної нервової системи людини опосередковано, через блокаду процесів зворотнього захоплення медіатору серотоніну [9–11]. Вирогідний комплекс механізмів фармакологічної дії вказаного лікарського засобу може реалізовуватись за наступними видами модальностей: активне інгібування процесів зворотнього нейронального захоплення серотоніну (нейромедіатор), активація процесу блокування рецепторних іонних каналів 5-НТ3, системий антагонізм до рецепторної групи типу 5-НТ1А, одночасний опосередкований агонізм до рецепторів групи 5-НТ1В, активний прояв антагонізму до обох типів рецепторів [2, 4, 5, 12–14]. Клінічно значущими дослідженнями було показано, що активні процеси захоплення транспортеру серотоніна шляхом вживання терапевтичних добових доз брінтелліксу становили близько 50 % (доза – 5 мг), перевищували 60 % (доза – 10 мг) та перебільшували 80 % (доза – 20 мг). Брінтеллікс характеризується клінічно достовірно доведеною високою тимолептичною активністю у тому випадку, коли ступень захоплення транспортеру 5-НТ відповідає рівню 50 % [12].

Антидепресант вортіоксетин має мультимодальний механізм дії, безпосередньо модулює активність рецепторів та інгібує транспортер серотоніну; вказаний препарат схвалений для лікування великого депресивного розладу (ВДР) (Sanchez). Ефективність і безпечність вортіоксетину при ВДР підтверджені під час виконання масштабної програми клінічних досліджень, яка включала 17 короткострокових, контрольованих плацебо досліджень, шість відкритих довгострокових додаткових досліджень та одне довгострокове щодо профілактики рецидивів. У них взяли участь понад 9 тис. 700 пацієнтів, і загалом охоплювали понад 3 тис. 450 пацієнтороків (Baldwin; Florea; Melander). Терапія вортіоксетином у дозуваннях від 5 до 20 мг на добу суттєво зменшувала прояви депресивних симптомів, що визначали за шкалою для оцінювання депресії Монтгомері-Асберг (MADRS) або за 24-пунктовою версією шкали Гамільтона для оцінювання вираженості депресії (HAM-D) (Kelliny). Результати зведеного

аналізу даних короткострокових досліджень засвідчили достовірно вищі показники відповіді на лікування вортіоксетином і частоти ремісії порівняно з прийомом плацебо (Berhan and Barker). Дані метааналізу впливу вортіоксетину на окремі показники, які оцінювали за певними пунктами шкали MADRS, підтверджують його сприятливий вплив на широкий діапазон депресивних ознак (Thase).

Дані інших доклінічних досліджень засвідчили, що вортіоксетин модулює кілька систем нейромедіаторів, зокрема ГАМК, глутамат, серотонін, норадреналін, допамін, гістамін- і холінергічну системи через складні механізми, які включають інгібування транспортера серотоніну і модуляцію декількох підтипів 5-НТ-рецепторів, наприклад 5-НТ7-рецептор. Крім того, у дослідженнях анальгетичної активності гризунів виявлено потенціал вортіоксетину для зменшення болю центрального генезу, хоча ефекту щодо болю при запаленні не спостерігали. Модуляція нейротрансмітерів, задіяних у провідних шляхах болю, може опосередковувати анальгетичну реакцію, полегшуючи в такий спосіб болісні фізичні симптоми, пов'язані з депресією [13–18]. Отримані результати з вивчення фармакодинаміки брінтелліксу дозволяють зробити певні висновки, що тимолептик нової генерації здатен чинити позитивну дію щодо відновлення порушених патологією когнітивних функцій хворих осіб, що страждають на депресивні захворювання [7, 10, 12, 19–25].

1.2 Аналіз біоаналітичних методів визначення вортіоксетину

Проведений нами ретельний літературний пошук доступних літературних джерел наочно засвідчив, що для мети детектування та, відповідно, доказу наявності вортіоксетину в пробах біологічних рідин та в секційному матеріалі з органів і тканин людини, а також в матеріалах з гомогенізованих тканин лабораторних тварин переважно використовуються сучасні високоселективні інструментальні методи та методики, отримані на їх основі: газо-рідинна (газо-абсорбційна) та майже усі варіанти

ультрависокоєфективної рідинної хроматографії з мас-спектрометричним видом використаного детектування [26–32].

Авторами розроблено метод високоєфективної рідинної хроматографії-тандемної мас-спектрометрії (ВЕРХ-МС/МС) для одночасного вивчення TDM та клінічної фармакокінетики 23 антидепресантів та їх активних метаболітів: сертраліну, есциталопраму, флувоксаміну, пароксетину, дулоксетину, мілнаципрану, флуоксетину, венлафаксину, *O*-дезметилвенлафаксину, міртазапіну, тразодону, бупропіону, гідроксибупропіону, норфлуоксетину, вортіоксетину, агомелатину, міансерину, докsepіну, дезметилдокsepіну, кломіпраміну, дезметилкломіпраміну, амітриптиліну та нортриптиліну гідрохлориду. Після осадження білків зразків сироватки ацетонітрилом, ізотопні внутрішні стандарти (ВС), антидепресанти та активні метаболіти розділяли за допомогою колонки ZORBAX Eclipse Plus C18 (50,0 мм×2,1 мм, 1,7 мкм) з водою, що містить 0,1% мурашиної кислоти та 10 ммоль/л ацетату амонію, і метанолом, що містить 0,1% мурашиної кислоти. Валідацію розробленого методу проводили на основі рекомендацій щодо валідації біоаналітичних методів, включаючи оцінку специфічності, калібрувальних кривих, перенесення, точності, перехресних перешкод, прецизійності, стабільності, відновлення, цілісності розведення та ефекту матриці. Результати показали, що розроблений та валідований метод ВЕРХ/МС/МС є простим, швидким, надійним та специфічним, а всі характеристики методу відповідали вимогам до аналітичних методів, що може бути використано для вивчення TDM та фармакокінетики вищезазначених 23 антидепресантів та активних метаболітів.

Групою авторів опрацьовано та валідовано вибірково, з високою чутливістю визначення та одночасно експресну методику щодо визначення брінтелліксу в плазмі крові групи лабораторних тварин з використанням сполучення методів ультрависокоєфективної рідинно-рідинної хроматографії з подвійною мас-спектрометрією як метод детектування [33].

Опубліковано роботу колективу авторів, де описано ефективну методику визначення брінтелліксу в окремо взятих зразках сироватки, а також в зразках слини дорослої людини методом ультрависокоєфективної рідинно-рідинної хроматографії на основі тандемного детектування аналіту мас-спектрометричним методом. Попередньо проведені етапи підготовки біорідини до аналізу передбачали концентрування досліджуваного тимолептику з крові та плазми за допомогою методів твердофазної екстракції (ТФЕ). Для мети оцінки кількісного вмісту вортіоксетину в пробах слини чи сироватки дорослої людини було також впроваджено метод на основі ультрависокоєфективної рідинно-рідинної хроматографії з матрично-діодним та мас-спектрометричним видами детектування. Наведені авторами методики характеризувались високим показником чутливості визначення речовин та високою вибірковістю селективністю стосовно наявності ендогенних компонентів та співекстрактивних супутніх речовин. Розділення (процеси детермінації) брінтелліксу та його окремих метаболітів здійснювали на хроматографічній колонці (ізократичний режим елюювання), застосована рухома фаза складала суміш 70 % та 20 % метилового алкоголю, ацетатного буферу (при рН 3,5), 10 % води (бідистилят) та діетиламіну (розчин 0,025 М).

Групою дослідників було запропоновано біоаналітичні методи високої чутливості та відтворюваності для мети кількісного визначення вмісту тимолептика брінтелліксу при одночасній сумісній присутності з його головним продуктом метаболічного перетворення в плазмі крові дорослого чоловіка. Перший з наведених методів передбачає ізократичне хроматографічне визначення методом високоєфективної рідинно-рідинної хроматографії з подвійним мас-спектрометричним типом обраного детектування. Наступний метод визначення брінтелліксу становить собою визначення у варіанті обернено-фазного детектування з використанням ультрависокоєфективної рідинно-рідинної хроматографії (у поєднанні з тандемним мас-спектрометричним визначенням), що також як спосіб

пробопідготовки включало попередній процес відмивання пептидних супутніх домішок із досліджуваних зразків екстракту [35].

Для оптимізації та знаходження деяких домішок або напівпродуктів синтезу в субстанції брінтелліксу запропоновано методи високоефективної рідинно-рідинної хроматографії (варіант – зворотньо-фазний), а також селективна ультрависокоефективна рідинно-рідинна хроматографії на основі мас-спектрометричного виду детектуванням «HPLC-MS». Дослідження було виконано для можливого знаходження домішок з наявною генотоксичністю, що утворюються під час проведення промислового синтезу зазначеного тимолептику. Інша робота стосувалась процесів стандартизації та кількісної оцінки вмісту брінтелліксу в деяких лікарських формах. Автори опрацювали метод рідинно-рідинної хроматографії з матричним діодним детектуванням «LC-DAD» та інший – метод ультрависокоефективної рідинно-рідинної хроматографії з MS-MS як спосіб детектування [36]. Результатами досліджень авторів іншої роботи було встановлення можливості того, що у випадках присутності в людській сечі брінтелліксу іноді є причиною хибних позитивних результатів аналізу щодо вмісту в такій біологічній рідині людини метадону [37]. З метою аналітичних визначень брінтелліксу авторами опрацьовано зелений нанокompatитний та вибіркового сенсора для галузі електрохімії, що стосується детектування вортіоксетину в об'єктах біологічного та небіологічного походження. Електрохімічну активність вортіоксетину на запропонованому електроді було досліджено циклічною вольтамперометрією [38].

Досліджено головні напрями біотрансформації вортіоксетину в людському організмі. Показано, що тимолептик в тканинах печінки активно піддається перетворенням першої та другої фази метаболізму переважно через окиснення молекули препарату ізоферментною системою Цитохрому P 450 з наступною кон'югацією з гліцином та кислотою глюкуроною. В повідомленні авторів наведено умови визначення брінтелліксу в крові людини методом високоефективної рідинно-рідинної хроматографії з ДМД

(діодно-матричним детектором) при виконанні досліджень з ідентифікації основного та мінорних метаболітів вказаного тимолептика. Зокрема, декілька відповідних метаболітів були ідентифіковані: основний метаболіт брінтелліксу виявився похідним карбонової кислоти, за хімічною будовою це 1-[2-(2,4-Диметил-фенілсульфаніл)-феніл]піперазину або 3-метил-4-(2-піперазин-1-іл-фенілсульфаніл)-бензойна кислота.

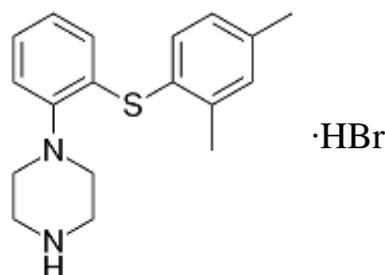
Основним показанням до фармакотерапевтичного використання вортіоксетину є усунення та корекція великого депресивного розладу пацієнтів з ендогенними депресіями, а також вживання тимолептику для того, щоб та запобігти рецидиву цього захворювання у дорослих [1, 10, 15, 18]. Зазвичай, терапію брінтелліксом хворих осіб середнього віку раціонально починати з призначення добової дози у 10 мг, іноді вказана початкова доза може бути суттєво зміненою, що залежить від індивідуальної чутливості особи до препарату, переважно в межах від 15 мг до 50 мг (добова доза). Рандомні розширені клінічні дослідження брінтелліксу показали наявну у препарату добру переносимість як дорослими здоровими волонтерами (чоловіки та жінки), так переважною більшістю пацієнтів похилого віку, що в анамнезі мали ознаки середньої та важкої депресії. Випадки розвитку побічних реакцій, що були наявні при цьому, мали характер легкого чи помірною ускладнення, а також, вони поступово зникали, переважно, у перші тижні такої терапії та не вимагали припинення вживання вортіоксетину. Превалюючою небажаною побічною реакцією, що систематично спостерігали під час проведення зазначених досліджень, були прояви легкої або помірної нудоти, яка набувала статистичної значущості.

Метою іншого дослідження було вивчення цитотоксичності та генотоксичності вортіоксетину *in vivo* та *in silico*. Генотоксичні ефекти оцінювали за допомогою аналізу хромосомних аберацій та мікроядер у культивованих лімфоцитах периферичної крові людини. Цитотоксичність оцінювали за допомогою мітотичного індексу, а взаємодію з ДНК аналізували за допомогою УФ-титрування та електрофорезу в агарозному

гелі. Аналізи *in silico* проводили за допомогою методів *Attraction Cavities* та *AutoDock Vina*. Експериментальні результати показують, що вортіоксетин зв'язується з ДНК телячого тимуса шляхом інтеркаляційних взаємодій та розщеплює ДНК рBR322 у присутності перекису водню. Дослідження зв'язування з ДНК показали, що зв'язування з борозенкою є ефективною взаємодією між вортіоксетином та ДНК телячого тимусу ($K_b: 6,25 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). Це також підтверджували результати молекулярного докінгу, де спорідненість зв'язування вортіоксетину та есциталопраму становила 7,29 та 7,69 ккал/моль для *Attracting Cavities* та 6,01 та 6,57 ккал/моль для *AutoDock Vina*. При порівнянні вортіоксетину з есциталопрамом обидва препарати виявилися потенційно генотоксичними. Ці результати свідчать про потенційний генотоксичний ризик при тривалому застосуванні та надають клініцистам цінну інформацію для оцінки довгострокової біодоступності брінтелліксу становить близько 75%, при вживанні терапевтичної дози тимолептику максимальне значення його концентрації в плазмі крові людини, зазвичай, сягає за 6-7 год. Період напіввиведення вортіоксетину приблизно становить 66-69 год, зазначений тимолептик дуже активно вступає у взаємодію з білками плазми (до 97–98 %).

1.3 Розчинність, молекулярна маса та основні властивості гідроброміду вортіоксетину

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



В теперішній час медичне застосування для лікування різної етіології депресій має гідробромід вортіоксетину. Молекулярна маса основи

брінтелліксу становить 298,47 г/моль, для сольової форми препарату (гідробромід) 379,36 г/моль. Гідробромід брінтелліксу являє собою мікрокристалічний важкий порошок, що має світло-бежевий відтінок кольору, вказана субстанція не має властивості гігроскопічності. Брінтеллікс добре розчиняється в диметилформаміді та диметилсульфоксиді (апротонні розчинники), в метиловому та етиловому спиртах, препарат погано розчиняється як у воді, так і в водних розчинах у межах значень величин рН від 2,0 до 8,0. Брінтеллікс проявляє виражені властивості органічної основи, відповідні величини рКа становлять 9,1 (для основи препарату) та 3,0 (для сольової форми).

В літературі наведено дані про зафіксований випадок умисного перорального приймання всередину 250 мг брінтелліксу. Спостереження в умовах стаціонару за основними показниками життєдіяльності постраждалого пацієнта показало, що всі вони практично перебували в межах нормального функціонування. Результати опублікованих досліджень, пов'язаних із з'ясуванням показника токсичності разової дози брінтелліксу стосовно до піддослідних лабораторних тварин, засвідчили, що «органами-мішенями» для вказаного препарату-тимолептика були жовч (жовчний міхур) та тканини печінки (для мишей та щурів), також депонування відбувалось в нирках (переважно для щурів чоловічої статі). Небезпечним проявом хронічної токсичності брінтелліксу є процес відкладання твердих кристалічних продуктів та твердих агломератів як у жовчних протоках, так і в каналцях нирок, що сприяло розвитку процесів запалення тканин нирок. З'ясовано, що такі кристалічні продукти ідентифіковані як продукти, що утворюються в процесі протікання метаболічних процесів брінтелліксу (глюкуроніди препарату).

Висновок до розділу 1

Вортіоксетину гідробромід («Брінтеллікс») – це тимолептичний лікарський засіб новітньої генерації, який має значне медичне використання

для монотерапії та комплексної фармакологічної корекції ендогенних депресивних порушень та захворювань різноманітної етіології та ступеню важкості. Зазначений тимолептик здатен викликати значні побічні ефекти як наслідок терапії ним, а за певних умов може призвести до важких інтоксикацій, і, відповідно, брінтеллікс за певних умов може стати об'єктом для токсикологічних досліджень. Біоаналітичні методики для проведення хіміко-токсикологічного аналізу брінтелліксу в тканинах секційного біологічного матеріалу, що є простими та доступними у виконанні, а також достатньо чутливими до передбачуваної кількості аналіту в досліджуваному об'єкті, які застосовуються експертними аналітичними службами нашої країни, є практично не розробленими.

РОЗДІЛ 2

МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ВОРТІОКСЕТИНУ. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВОРТІОКСЕТИНУ В БІОЕКСТРАКТАХ

Розроблення біоаналітичних методів виявлення та кількісного визначення вортіоксетину для використання на етапі підтверджуючих скринінгових досліджень біоекстрактів з тканин секційного матеріалу ми пов'язували з застосуванням методу хроматографії в тонкому шарі сорбентів (окису алюмінію та силікагелю), методу експресних хромогенних реакцій, методу ультрафіолетової спектрофотометрії та зворотнього варіанту проведення екстракційно-спектрофотометричного визначення у видимій ділянці спектру.

2.1 Матеріали та методи

До усіх проведених досліджень було залучено субстанцію гідроброміду брінтелліксу, що виділена нами з таблеток «Brintellix» (12 шт. (10 мг), виробник «Лундбек LTD», Данія).

Оптимізована методика виділення брінтелліксу з таблеток. 10 таблеток «Brintellix LTD» переносили до порцелянової чашки та додавали 30 мл абсолютного метанолу. Оболонки таблеток після набухання знімали скляною паличкою, очищені залишки таблеток злегка підсушували та ретельно перетирали в чашці з 75 мл 96 % теплового етилового спирту. Далі вміст порцелянової ступки фільтрували крізь беззольний (попередньо змочений етанолом) паперовий конусний фільтр («жовтої смужки») та обережно переносили отриманий фільтрат до кварцової чашечки і повільно випаровували органічний розчинник на водяній бані (40 С) до видалення спирту етилового. Залишок в чашечці обережно розтирали, поступово додаючи до нього 25-30 мл діетилового етеру. Суміш відфільтровували крізь паперовий конусний фільтр, що попередньо був змочений етером. Шар діетилового етеру не використовували, а отриманий таким чином залишок субстанції брінтелліксу на паперовому фільтрі висушували та зважували.

До проведення досліджень нами було залучено органічні розчинники «S. Aldrich, USA», ЧДА: хлороформ (трихлорметан), метанол (метиловий спирт), ацетон, етиловий спирт (етанол) 96%, (*n*-; *i*-бутанол), толуен, етилацетат (етиловий естер кислоти ацетатної), діетиламін, хлористий метилен, бензен та діоксан.

Реактиви: кваліфікація ХЧ та ЧДА: амоній гідроксид 25 %-й розчин, амоній ванадієвокислий водний, амоній молібденовокислий водний, кислота нітратна (97-98,5 %), кислота хлоридна (37,5 %), кислота сульфатна (96,3 %), кислота перхлоратна (70,2 %), кислота ацетатна (98,2%).

Хроматографічні пластини:

Скляні, Естонія, КСКГ, фракція 5,7 мкм, шар 135 мкм. (I);

Сорбфіл, ПЕТФ, фракц. 8,5 мкм, шар 120 мкм. (II);

Silufol, СГ, алюм., крохмаль. (III);

Armsorb, СГ, фракц. 9,5 мкм, шар 115 мкм. (IV);

Merck, Німеччина, G. Sil. F₂₅₄. (V).

Випромінювач ультрафіолетовий 365/254 UV.

Колби мірні місткістю 10,00; 25,00; 50,00, 100,00 та 200,00 мл.

Спектрофотометр SFM (195-1100 нм).

Хромогенні реактиви:

1. Реактив Драгендорфа в модифікації Мун'є.
2. Маркі реактив.
3. Манделіна реактив.
4. Фреде реактив.
5. Лібермана реактив.
8. Ердмана реактив.

2.2 Детектування гідроброміду вортіоксетину за допомогою кольорових експрес-реактивів та осадових реакцій

При розробці умов експрес-скринінгових спрямованих досліджень біовитягів на вміст брінтелліксу було досліджено взаємодію вказаного тимолетику з рядом деяких хромогенних реагентів, що рекомендовані

Міжнародною асоціацією токсикологів для виконання загального аналітичного скринінгу на базі тонкошарово-хроматографічного методу. Було встановлено утворення забарвлень продуктів взаємодії брінтелліксу з скринінговими кольоровими (хромо-) реактивами для стандартного розчину досліджуваного тимолептику в спирті етиловому (1-2 мг/мл гідрохлориду брінтелліксу).

Методика проведення детектування брінтелліксу з експрес-реагентами. По 5,0-10,0 мкл (станд. розч.) брінтелліксу в абсолютному спирті етиловому каліброваним кварцевим капіляром наносили на хроматографічну пластинку та обережно додавали відповідні хромореактиви, одразу відмічаючи появу забарвлення та зміну його протягом декількох хвилин.

З'ясовували чутливість хромореактивів по відношенню до брінтелліксу наступним чином: проби приготованого РСР (об'єм 0,05-20,0 мкл наносили на обрані шматочки хроматографічних пластинок із вмістом брінтелліксу від 1,0 до 30,0 мкг в пробі, що досліджується). З метою валідації величин меж виявлення препарату Detection Limit чинили так, як вказано про те в рекомендаціях Управління Організації Об'єднаних Націй по наркотиках та кримінальній злочинності). Було досліджено проби п'яти робочих стандартних розчинів досліджуваного тимолептику (відповідний вміст брінтелліксу гідрохлориду $1,25 \times DL - 2,0 \times DL$). Кількість (загальна) негативних недостовірних результатів складала не більше, як один з п'яти виконаних нами дослідів (де величина відносного стандартного відхилення $RSD \leq 25\%$). Результати виявлення брінтелліксу з хромореактивами та визначені величини DL (чутливості), у мкг) наведено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Результати виявлення гідроброміду вортіоксетину з хромогенними реактивами

Реактив	Забарвлення, (DL, мкг в досліджуваній пробі)
1	2

Кислота нітратна концентрована	Жовте, що знебарвлюється (4,0)
Кислота сульфатна концентрована	Червоно-оранжеве, поступово змінюється на темно-коричневе (17,5)
Фреде	Оранжеве, змінюється на жовте, потім на зеленувато-синє (2,5)
Манделіна	Зеленувато-синє, змінюється на буре (2,5)
Лібермана	Оранжево-коричневе, змінюється на вишнево-зелене (1,5)

Як видно з даних, що отримані нами, та наведених у табл. 2.1, найбільшу чутливість щодо детектування (виявлення) брінтелліксу виявив реактив Лібермана, чутливість склала 1,5 мкг препарату в досліджуваній пробі.

Вортіоксетин проявляє виражені властивості органічної основи, через це для його попереднього виявлення можливо використовувати загальноалкалоїдні реактиви (реактиви групового осадження алкалоїдів). Для цієї мети спочатку були приготовлені стандартні розчини препарату в хлороформі із різним вмістом вортіоксетину, а потім і хлороформні біоекстракти з тканин об'єкту, які по краплі (близько 0,05 мл) послідовно наносили на ряд предметних пластинок та видаляли розчинник випаровуванням. Залишки на склі розчиняли в краплі 0,1 М роз-ну кислоти хлоридної (також паралельно виконували дослід з певним обраним реактивом). Осади та помутніння, що утворювались на предметних скельцях, розглядали одразу візуально (темний фон) у світлі, що проходить, а за 15-25 хв їх розглядали під мікроскопом. Результати реакцій взаємодії вортіоксетину з застосованими реактивами для групового осадження алкалоїдів, у стандартному розчині препарату та виділеного з тканини біологічного матеріалу та вортіоксетину-стандарту повною мірою співпадали (таб. 2.2).

Таблиця 2.2

Осадіві реактиви на вортіоксетин та їх чутливість

Реактив	Колір осаду	Чутливість	
		Межа виявлення, мкг	Граничне розведення
Реактив Марме	Білий, аморфний	1,5	1:33 333
Реактив Майєра	Білий, аморфний,	1,0	1:50 000
Реактив Зонненшейна	Жовтий, аморфний	5,0	1:10 000
Реактив Вагнера	Червоно-бурий, аморфний	2,0	1:25 000
Розчин таніну	Коричневий, аморфний	4,0	1:12 500
Розчин меркурій (II) хлориду насичений	Білий, аморфний	2,5	1:20 000
Реактив Леґе	Оранжевий, аморфний	1,0	1:50 000
Реактив Штока	Білий, аморфний	3,0	1:16 666
Реактив Деніже	Білий, аморфний	2,0	1:25 000
Реактив Гаґера	Жовтий, аморфний	5,0	1:10 000
Реактив Гізеля	Коричневий, аморфний	3,0	1:16 666
Реактив Вальзера	Білий, аморфний	3,5	1:14 286
Реактив Скотта	Синій, аморфний	1,0	1:50 000
Йодоплатинатний реактив	Фіолетовий, аморфний	0,5	1:100 000
Реактив Івона	Темно-синій, аморфний	2,0	1:25 000
Реактив Бертрана	Білий, аморфний	7,5	1:6 667
Реактив Драгендорфа	Цегляно-червоний, аморфний	1,0	1:50 000

Наведені у таблиці 2.2 дані свідчать, що вортіоксетин утворює аморфні осадки різного забарвлення з досліджуваними нами загальноалкалоїдними

реактивами. Найбільш чутливими серед них виявились йодоплатинатний реактив, реактиви Майєра, Леґе, Скотта та Драгендорфа.

2.3 Виявлення гідроброміду вортіоксетину методом тонкошарової хроматографії

Рутинні біоаналітичні методи визначення при виконанні хіміко-токсикологічних досліджень біовитягів з секційного матеріалу та з біорідин переважним чином базуються на використанні методу тонкошарової хроматографії – ефективному та експресному методі детектування різноманітних отруйних речовин в галузі судової токсикології. Тонкошарово-хроматографічний метод являє собою варіант площинної хроматографії, а фракціонування та розділення досліджуваних аналітів базується на процесах переносу фронту рухомих фаз вздовж тонкого прошарку нерухомої фази з такою її швидкістю, що є відповідною коефіцієнтам розподілів досліджуваних компонентів (аналітів чи їх сумішей) між цими двома фазами.

На початковому етапі досліджень нами ми з'ясовано хроматографічну рухливість брінтелліксу в системах рухомих фазах різної полярності, що на практиці застосовуються у випадку проведення систематичного скринінгу (аналітичного токсикологічного) лікарських речовин та рекомендовані комітетом з наркотиків, та також у деяких рухомих фазах з високою диференціюючою здатністю, що достатньо широко використовуються у вітчизняній практичній аналітичній діяльності.

Методика виявлення брінтелліксу методом ТШ-хроматографії: на окреслену лінію старту певного типу пластинки для хроматографії, на відстані близько 2,5 см від кожного з країв, попередньо відкаліброваним кварцевим капіляром до однієї обраної точки наносили різні за вмістом проби (по 5–25 мкл) досліджуваного СР брінтелліксу (розчин – етанольний). Такі хроматографічні пластини з кількісно нанесеними пробами аналітів переносили до хроматографічних скляних камер (об'єм – 1500 см³), до яких заздалегідь, за 10 хв до хроматографування, було вміщено по 20-25 мл відповідних типів рухомих фаз. Значення довжин шляху, що проходить

рухомий розчинник від «ліній старту» до «ліній фінішу» становила від восьми до десяти сантиметрів, у залежності від розміру певного типу пластинок. Після розвитку хроматограм їх підсушували в потоці теплого повітря, а потім виявляли (детектували) плями брінтелліксу опроміненням їх УФ-світлом: світлофільтр з 254 нм – фіолетова флуоресценція тимолептика; обробка реактивом Драгендорфа-Мун'є – оранжево-коричневі плями брінтелліксу.

Результати, що ми отримали в процесі з'ясування хроматографічної рухливості (поведінки) брінтелліксу в обраних нами рухомих (аналітичних скринінгових) фазах представлено у табл. 2.3 (середнє (з п'яти) значення показників R_f брінтелліксу для кожного типу певної фази та виду хроматографічних пластинок).

Таблиця 2.3

Значення величини R_f вортіоксетину в різних рухомих фазах (середнє з п'яти визначень)

Значення R_f					
Системи рухомих розчинників (спеціальні скринінгові)	Тип обраної пластини*				
	I	II	III	IV	V
Етилацетат–метанол–25% розчин амоній гідроксиду (8,5:1:0,5) (1)	0,89	0,69	0,45	0,53	0,41
Циклогексан–толуен–діетиламін (30:6:4) (2)	0,22	0,24	0,29	0,23	0,20
Метанол–25% розчин амоній гідроксиду (100:1,5) (3)	0,78	0,55	0,48	0,56	0,43
Системи рухомих розчинників (застосовують при біоаналітичних дослідженнях) (4)	Тип обраної пластини*				
	I	II	III	IV	V
Гексан–толуен–етанол–25% розчин амоній гідроксиду (20:15:15:3) (5)	0,66	0,57	0,49	0,52	0,45
Етилацетат–етанол–діетиловий етер (15:10:5) (6)	0,16	0,12	0,10	0,26	0,18
Хлороформ–ацетон–25% розчин амоній гідроксиду (30:10:2) (7)	0,34	0,31	0,26	0,27	0,20

*Примітки: I – Скляні пластинки (для ВЕТШХ); II – Пластинки «Сорбфіл»; III – Пластинки «Силуфол»; IV – Пластинки «Армсорб»; V – Пластинки алюмінієві «Merck».

У відповідності до показників хроматографічної рухливості брінтелліксу, які нами наведено у табл. 2.3 видно, досліджуваний тимолептик має достатньо низьку кореляцію обчислених величин R_f у системах: етилацетат–метанол–25 % р-н амоній гідроксиду (8,5:1:0,5) (з R_f 0,41–0,89) та метанол–25 % р-н амоній гідроксиду (100:1,5) (з R_f 0,43–0,78).

2.4. Ідентифікація гідроброміду вортіоксетину методом УФ-спектрофотометрії

Нами було застосовано метод УФ-спектрофотометричного детектування брінтелліксу у біовитях з тканин секційного біологічного матеріалу та для кількісного оцінювання вмісту вказаного тимолептичного засобу в отриманих біоекстрактах.

УФ-спектрофотометричне визначення брінтелліксу в МСР (моделнь. станд. розч.). Приготовували РСР (робоч. станд. розч.) в метиловому алкоголі (конц-я 1×10^{-4} моль/л). Точну наважку брінтелліксу гідроброміду 0,00500 г кількісно вносили до каліброваної мірної колби (об'єм 100,00 мл), розчиняли в невеличкій кількості зазначеного розчинника, а потім доводили до зазначеної позначки.

Ультрафіолетовий спектр поглинання розчину брінтелліксу вимірювали на приладі СФ-46 (діапазон робочих довжин хвиль становив 190-380 нм, кювета – 10 мм (розчин порівняння «нольовий розчин» – метанол).

В УФ-спектрі брінтелліксу спостерігали наявність максимум абсорбції при довжині хвилі 232 нм ($A_1^1=294$, $\epsilon=9027$).

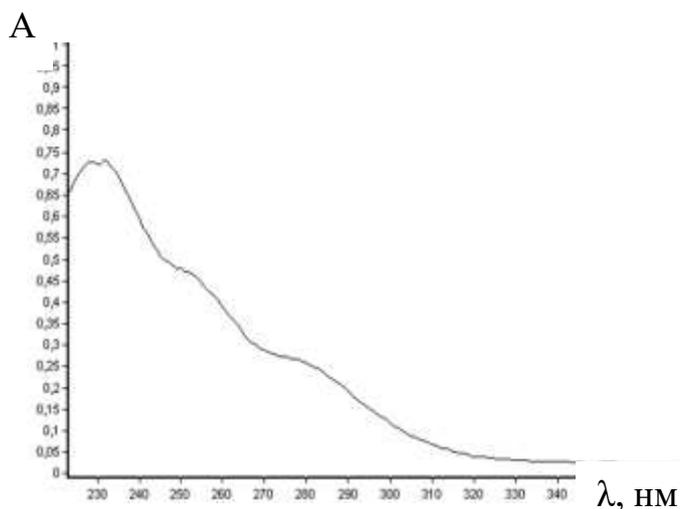


Рис. 2.1. УФ-спектр світлопоглинання розчину вортиоксетину у метанолі (концентрація $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л)

2.5 Ідентифікація вортиоксетину методом ВЕРХ

Вортиоксетин є полярною речовиною, тому, оптимальними умовами його дослідження методом вискоєфективної рідинної хроматографії будуть умови зворотньо-фазного процесу.

Ідентифікацію вортиоксетину при його дослідженні ВЕРХ-методом проводили за абсолютним часом утримування.

Час утримування аналіту (t_R) – це час, що необхідний для елюювання речовини з хроматографічної колонки за постійних умов процесу хроматографування.

Хроматографічний аналіз досліджуваного препарату проводили на мікроколоночному рідинному хроматографі «Міліхром А-02» з ультрафіолетовим детектором, чутливість якого становила 0,05 од. оптичної густини на шкалу. Визначення оптичної густини проводили при довжині хвилі 276 нм. Хроматографічні дослідження проводили на металевій мікроколонці розміром 2×75 мм, що була наповнена сорбентом з прищепленою та хімічно зв'язаною вуглеводневою фазою C_{18} (Nucleosil 100-5 C_{18}) з розміром частинок 5,0 мкм; ефективність розділення колонки

становила $N \approx 5000-6000$ теоретичних тарілок. Як елюент використовували ацетонітрил класу «для рідинної хроматографії», який перед застосуванням був відповідно до вимог для ВЕРХ підготовлений (профільтрований крізь мембрану МФА-МА-№2 (ТУ6-05-1903-81) з розміром пор 0,15-0,25 мкм та дегазований в умовах вакууму). Швидкість потоку елюенту складала 180 мкл/хв.

Для вибору хвилі детектування було записано УФ-спектр 0,05% розчину вортіоксетину в метанолі (обсяг проби, що аналізується, 2,0 мкл). При цьому спостерігали максимум світлопоглинання при 232 нм, який і було обрано для детектування досліджуваного препарату.

У зазначених умовах детектування параметри утримування вортіоксетину становили: $t_R = 2,21$ хв (час утримування); $\omega = 0,19$ мл/хв (швидкість подачі елюента); $N = 2311,72$ (ефективність).

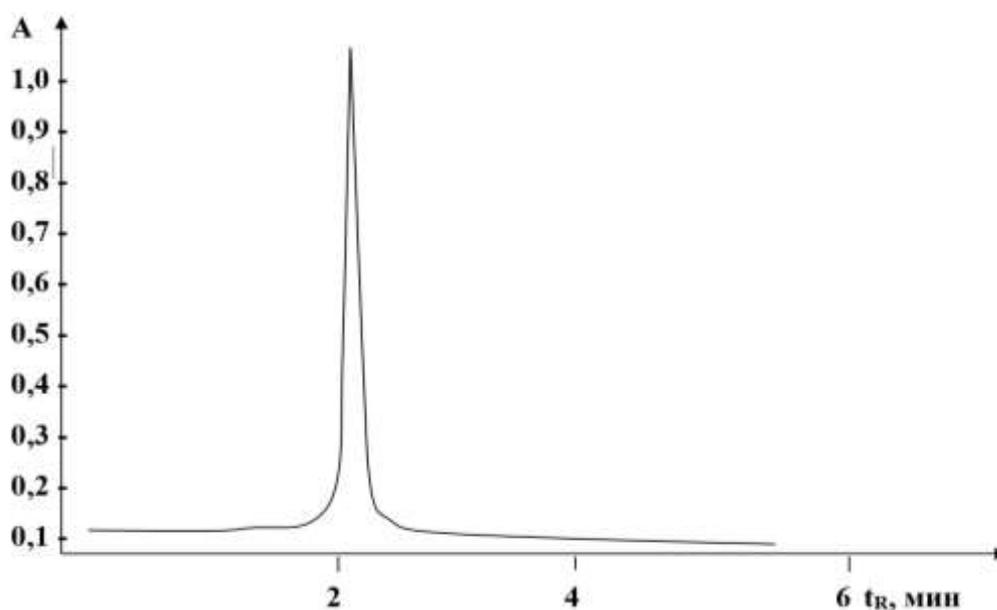


Рис. 2.2 Хроматограма стандартного розчину вортіоксетину

2.6 Кількісне визначення гідроброміду вортіоксетину методом ультрафіолетової спектроскопії

Кількісне визначення гідроброміду вортіоксетину в серії досліджуваних розчинів виконано за довжини хвилі поглинання

ультрафіолетового випромінювання 232 нм. Обчислено деякі наступні валідаційні параметри для опрацьованої методики: лінійність (діапазон), межа виявлення та межа кількісного визначення, відповідно Detection Limit DL та Quantification Limit QL, правильність (розраховано протягом одного дня «Intra day» та значення прецизійності у відповідності до вимог у судовій аналітичній токсикології).

Калібрувальний графік. Нами було приготовлено стандартний розчин гідроброміду вортіоксетину, для чого розчиняли в метанолі 0,00500 г досліджуваного лікарського засобу в колбі (об'єм 100,00 мл, конц-я 50 мкг/мл). Робочі стандартні розчини гідроброміду вортіоксетину: до колб (об'єм 10,00 мл) відмірювали послідовно (шаг – 1,00 мл): 1,00 – 9,00 мл станд. р-ну та доводили вміст колби до позначки метанолом. Отримували роб. ст. р-ни 1–9 з концентрацією гідроброміду вортіоксетину від 5,00 до 45,00 мкг/мл та вимірювали для них світлопоглинання (тричі, при 232 нм).

Виміряні показники відповідних величин світлопоглинання брінтелліксу в ультрафіолетовій ділянці для 9 роб. ст-х розч-в (де $m=9$; $n=3$) оброблено (метод лінійної регресії), вигляд якої описується рівнянням: $y = bx + a$ (перевірка значущості параметру a в рівнянні за критерієм Фішера показала неможливість переходу до рівняння вигляду: $y = b'x$, а калібрувальний графік описувався рівнянням: $y = 0,0165x + 0,024$ (рис. 2.2).

Обраховані нами метрологічні характеристики калібрувального графіку наведені у табл. 2.4.

Лінійність, «діапазон лінійності». Запропонована методика лінійна в діапазоні меж концентрацій брінтелліксу 5,0 – 50,0 мкг/мл.

Показники меж виявлення та кількісного визначення ми обчислювали за стандартним відхиленням вільного члену у рівнянні калібрувального графіку S_a за відповідними такими формулами $DL = 3,3 \times S_a/b$, $QL = 10 \times S_a/b$ (S_a – ст. відх. вільн. чл. у рівн. калібр-го граф.; b – кут. коеф. у рівн. калібр-го граф), при цьому DL та QL склали 0,7 мкг/мл та 2,2 мкг/мл.

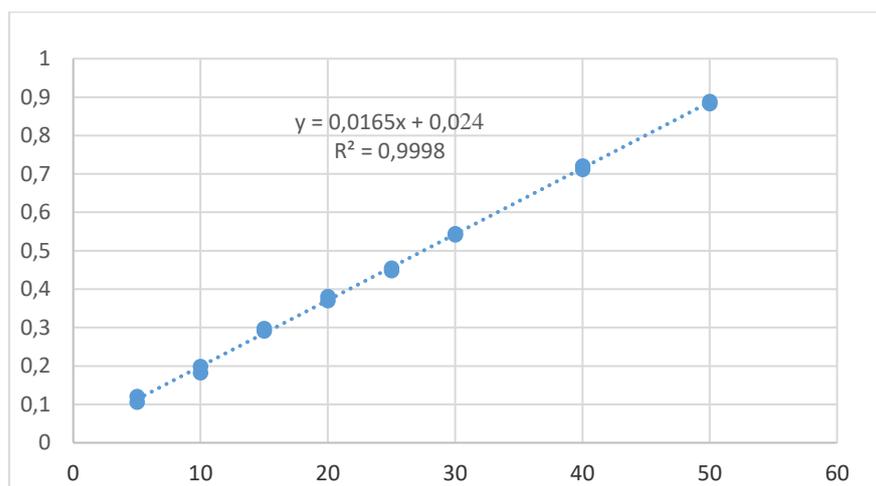


Рис. 2.3. Калібрувальний графік для кількісного визначення гідроброміду вортиоксетину методом ультрафіолетової спектроскопії

Таблиця 2.4

Метрологічні характеристики калібрувального графіку для кількісного визначення гідроброміду вортиоксетину методом УФ-спектроскопії

Параметр	r	b	a	S^2	Δb	Δa	S_a	S_b
Значення	0,999	0,0165	0,024	$5,772 \times 10^{-5}$	0,0004	0,008	0,0043	0,0002

Правильність і прецизійність запропонованої нами методики також було встановлено для всіх рівнів концентрацій (для одного дня «*intra day*»), (середнє з трьох вимірів) (табл. 2.5).

Таблиця 2.5

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

Взято вортіоксетину, мкг/мл	Знайдено вортіоксетину		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
5,0	5,05	101,0	$\bar{x} = 100,12;$ $S = 2,0;$ $RSD = 2,01\%;$ $S\bar{x} = 0,6;$ $\Delta\bar{x} = 1,9;$ $\epsilon = 1,9;$ $\bar{x} \pm \Delta\bar{x} =$ $100,12 \pm 1,9$
10,0	9,7	97,0	
20,0	19,7	98,5	
25,0	25,8	103,2	
30,0	30,4	101,3	
40,0	40,6	101,5	
45,0	44,3	98,4	

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

Правильність та прецизійність протягом одного дня (intra day) опрацьованої методики для усіх концентрацій (низька, середня та висока) становили 100,12% ($RSD = 2,01\%$).

2.7 Кількісне визначення гідроброміду вортіоксетину методом зворотної екстракційної спектрофотометрії

Іонні асоціати брінтелліксу з метиловим оранжевим при рН 4,6 екстрагуються хлороформом та забарвлюють його на жовтий колір. Світлопоглинання таких розчинів є слабоінтенсивним, тому для збільшення чутливості його розкладали при додаванні до отриманого продукту асоціації 1 % розчину кислоти сульфатної в абсолютному метиловому чи етиловому спирті (спостерігалось вивільнення барвника, а розчин набував червоного забарвлення, що підвищувало чутливість фотометричних визначень).

Калібрувальний графік. 0,01715 г гідроброміду брінтелліксу (0,01500 г основи) вміщували до мірної колби (100 мл), розчиняли у дистильованій воді,

доводили об'єм до позначки (150 мкг/мл). До ділильних ліжок вносили 5 мл ацетатного буферу при рН 4,6; 5 мл 0,05 % р-ну метилоранжу, по 0,05 – 0,80 мл р-ну гідроброміду вортиоксетину та по 15 мл хлороформу (дотримувались співвідношення фаз). Суміші струшували 5 хв, залишали на 5 хв. Відокремлювали 14,5 мл хлороформу та додавали 2 мл 1 % розчину к-ти сульфатної в абсолютному етанолі (метанолі). Вимірювали світлопоглинання розчинів на спектрофотометрі при 530 нм, розчин порівняння – холостий дослід.

Калібрувальний графік для кількісного визначення описувався рівнянням: $y = 0,00808x + 0,005$. Лінійність методики 7,5 – 120 мкг/мл. Метрологічні характеристики калібрувального графіку для зворотнього варіанту екстракційно-спектрофотометричного визначення гідроброміду вортиоксетину обчислено та представлено в табл. 2.6.

Значення меж виявлення кількісного визначення брінтелліксу розраховано за S_a та b , вони склали 1,1 та 3,7 мкг/мл відповідно.

Таблиця 2.6

Метрологічні характеристики калібрувального графіку для кількісного визначення гідроброміду вортиоксетину екстракційно-спектрофотометричним методом (зворотний варіант)

Пара-метр	r	b	a	S^2	Δb	Δa	S_a	S_b
Значення	0,9998	0,00808	0,007	3,9669 $\times 10^{-5}$	8×10^{-5}	0,004	0,0030	$3,851 \times 10^{-5}$

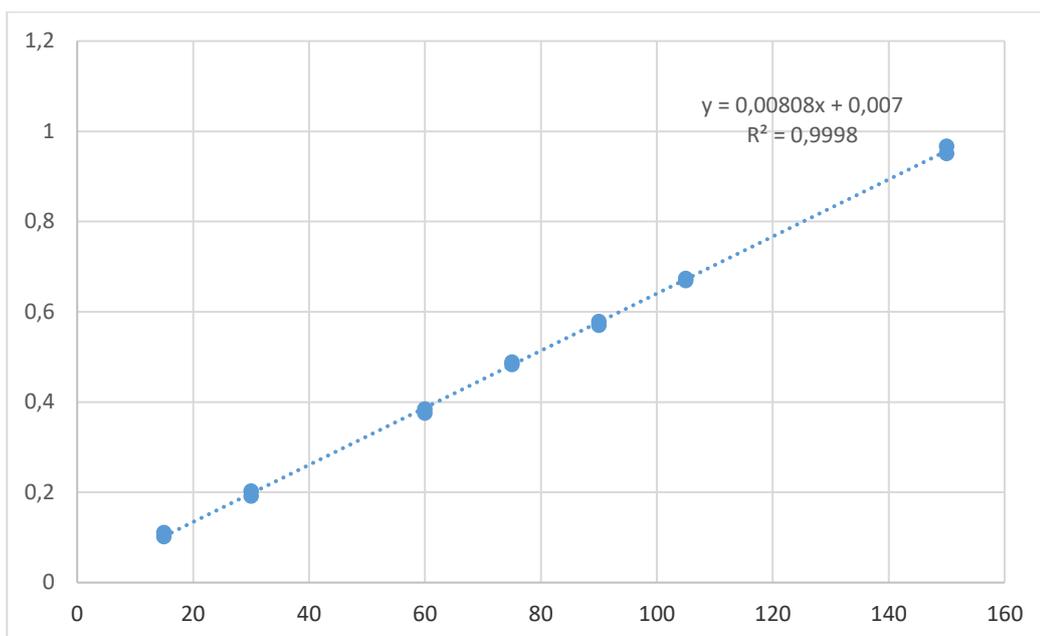


Рис. 2.4. Калібрувальний графік для кількісного визначення гідроброміду вортіоксетину зворотнім екстракційно-спектрофотометричним методом (реакція з метиловим оранжевим)

Правильність і прецизійність методики екстракційно-спектрофотометричного визначення (у зворотному варіанті) серії стандарт-розч-в розраховано протягом дня, результати нами наведено в табл. 2.7.

Таблиця 2.7

Правильність та прецизійність методики кількісного визначення гідроброміду вортіоксетину *intra day* екстракційно-спектрофотометричним методом (зворотний варіант)

Взято гідроброміду вортіоксетину, мкг	Знайдено гідроброміду вортіоксетину		Метрологічні характеристики*
	мкг	%	
15,0	14,5	96,7	$\bar{x} = 99,3;$ $S = 1,8;$ $RSD = 2,01%;$
30,0	29,7	99,0	
45,0	44,6	99,1	

60,0	60,7	101,2	$S\bar{x} = 0,5;$
75,0	74,5	99,3	$\Delta\bar{x} = 2,4;$
90,0	89,5	99,4	$\varepsilon = 2,6;$
105,0	105,6	100,6	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 99,3 \pm 2,4$
120,0	119,2	99,3	

*Середн. знач. для п'яти визначень: $P=0,95; t\alpha=2,132$

Правильність та прецизійність встановлено для діапазону концентрацій (від найменшої до найвищої) протягом одного дня *intra day* (тричі до концентраційного рівня).

Висновки до розділу 2

1. Встановлено умови детектування нового тимолептика вортіоксетину гідроброміду методом тонкошарової хроматографії із використанням у рухомих фаз, які рекомендовані Асоціацією судових токсикологів для непрямого скринінгу лікарських речовин, а також інших рухомих фаз, як застосовуються при проведенні біоаналітичних досліджень лікарських речовин основного характеру. Хроматографічні дослідження проведено на п'яти різних хроматографічних пластинках.
2. Запропоновані хроматографічні системи з низькою кореляцією R_f гідроброміду вортіоксетину, що підвищує достовірність ідентифікації вказаного тимолептика ТШХ-методом.
3. Досліджено взаємодію гідроброміду вортіоксетину з хромореактивами-візуалізаторами при скринінгових дослідженнях лікарських субстанцій методом тонкошарової хроматографії та встановлено їх чутливість.
4. Вивчено умови визначення вортіоксетину методом рідинної хроматографії в умовах зворотньо-фазного варіанту хроматографування, встановлено основні параметри утримування вказаного препарату.

5. Показано наявність специфічного світлопоглинання гідроброміду вортіоксетину в УФ-області спектру, що дозволяє ідентифікувати вказаний тимолептичний препарат.
6. Опрацьовано умови та запропоновано методики кількісного визначення гідроброміду вортіоксетину УФ-спектрофотометричним та зворотним варіантом екстракційно-спектрофотометричного визначення. Методики, що пропонуються, провалідовано за параметрами: діапазон лінійності (лінійність), правильність, прецизійність. Зазначені методики повністю відповідають вимогам до аналітичних методів судової токсикології.

РОЗДІЛ 3

ВИДІЛЕННЯ ВОРТІОКСЕТИНУ З ТКАНИН СЕКЦІЙНОГО БІОМАТЕРІАЛУ

Пробопідготовка та виділення ксенобіотиків з секційного матеріалу поєднуються з методами екстракції, оптимізація яких передбачає, насамперед, встановлення оптимального екстрагенту та рН водної фази.

3.1 Вивчення екстракції гідробромиду вортіоксетину

Попередньо ми досліджували умови екстрагування гідробромиду вортіоксетину універсальними екстрагентами залежно від природи розчинника та рН водного шару. Значення рН створювали універсальним буфером Бріттона-Робінсона (рН 2,0-12), кислотою хлоридною (0,1 М р-н з рН 1) та натрій гідроксидом (0,1 М р-н з рН 13), екстрагентами були обрані: тетрахлорметан, діетиловий етер, хлороформ, хлористий метилен, 1,2-дихлоретан.

Методика. В ділильні лійки вміщували по 9 мл буферу, додавали водний розчин (1 мл) гідробромиду вортіоксетину (50,0 мкг/мл) та 10 мл екстрагенту. Суміші збовтували 5 хв та залишали на 5 хв. Органічний шар відокремлювали у фарфорову чашку та випаровували. Залишок ретельно розчиняли в 1 мл 0,1 М р-ну HCl і визначали гідробромід вортіоксетину кількісно (розд. 2.5).

Результати досліджень показують, що кращим розчинником для екстракції гідробромиду вортіоксетину є хлороформ там діетиловий етер при рН 9. Також діетиловий етер при рН 1 є найкращим екстрагентом для видалення ендогенних домішок (табл. 3.1). Для очистки біоекстрактів, які містять гідробромід вортіоксетину, їх випаровували, до залишків додавали 1 мл 0,1 М р-ну HCl та тричі в ділильній лійці збовтували з 10 мл етеру діетилового, екстрагент відкидали.

Таблиця 3.1

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

Екстрагент	рН середовища												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	Ступінь екстракції, R%												
Хлороформ	4	13	20	26	34	44	51	62	68	60	53	44	35
Тетрахлорметан	2	6	9	15	21	28	36	41	42	37	30	31	27
1,2-Дихлоретан	5	8	8	14	19	31	40	41	46	41	27	26	20
Дихлорметан	4	4	12	15	22	29	29	31	37	35	36	25	22
Діетиловий етер	1	6	15	22	30	30	38	52	61	56	47	47	31

Вміст лійки підлюговували 25 % р-ном NaOH до рН 9 та три рази збовтували зі свіжоперегнаним хлороформом (10 мл), біовитяги переносили до колби (50 мл) та доводили об'єм до позначки (V_1).

Отримані таким чином екстракти обережно випаровували до 0,03-0,05 мл та кварцовим капіляром смугою на «стартову» лінію пластинки Сорбфіл, поруч також – 5 мкл р-ну гідроброміду вортіоксетину (1,0 мг/мл) та 5 мл випареної до 0,03-0,05 мл «холостої» біовитяжки.

Хроматограми розвивали у хлороформі, висушували, та повторно – в рухомій фазі: метанол–25 % р-н NH_4OH (100:1,5) та виявляли гідробромід вортіоксетину (розд. 2.3). Величина R_f забарвлених (оранжевий колір) плям гідроброміду вортіоксетину (з секційного біоматеріалу) та розчину «свідку» співпадали (дорівнювали 0,55), а «холості» досліди не містили плям із вказаним R_f . Елюювали гідробромід вортіоксетину з усіх хроматограм 5 мл метанолу (знімали сорбент, переносили у мікропробірку, збовтували). Суспензію фільтрували до пікнометру (5 мл) і доводили до позначки (V_3) (ступінь елюювання гідроброміду брінтелліксу 98,4 %).

3.2 Ізолювання вортіоксетину з тканин секційного біоматеріалу водою, підкисленою кислотою ацетатною

До 20 г гомогенізованих тканин печінки додавали водний р-н гідроброміду вортіоксетину (1000 мкг), ставили «контрольні» досліди, залишали на одну добу.

Потім до тканини секційного біоматеріалу додавали воду та об'єкт підкислювали концентрованим р-ном кислоти ацетатної до рН 2 (по універс. інд-ру). Суміш дві години настоювали, отриманий кислий біовитяг зливали, проціджували. Гомогенат біоматеріалу повторно настоювали з підкисленою ацетатною кислотою водою протягом години, витяг зливали з об'єкту та приєднували до попередньо отриманого.

Біовитяги об'єднували, додавали насичений розчин натрій сульфату, центрифугували (15 хв, 3000 об/хв). Фазу (водну) відокремлювали, переносили до лійки та тричі екстрагували діетиловим етером (25 мл),

етерний шар відкидали, а кислий водний біовитяг підлугували 15 % р-ном NaOH (рН 9) та три рази екстрагували основу брінтелліксу хлороформом, а хлороформні біовитяги фільтрували (фільтр злегка змочений хлороформом) з 0,25 г Na₂SO₄ (безводн.), переносили у колбу (25 мл) і доводили її вміст до позначки. Біоекстракти очищували від наявних домішок (екстракція, тонкошарова хром-я, послідовно) (розд. 3.1).

Біовитяги, отримані при ізолюванні ацетатнокислою водою, містили ендогенні речовини з біоматриці, тому ми додатково їх піддавали очистці сполученням екстракції та ТШ-хроматографії (як навед. в розд. 3.1).

Кількісне визначення брінтелліксу в біовитягах проводили двома опрацьованими методами: УФ-спектрофотометрії (розд. 2.5), зворотного варіанту екстракційно-спектрофотометричного визначення (vision region), реакція з метилоранжем (розд. 2.6). Розрахунок вмісту брінтелліксу в одержаних біоекстрактах з секційного гомогенізованого матеріалу виконували, використовуючи для цього калібрувальний графік (див. як навед. у табл. 3.2–3.5).

Таблиця 3.2

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

Введено вортіоксетину до 20 г печінки, мкг	Виділено вортіоксетину		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
1000	54,4	544,0	$\bar{x} = 52,7;$ $S = 2,2;$ $RSD = 4,0\%;$ $S\bar{x} = 1,0;$ $\Delta\bar{x} = 2,8;$
1000	50,5	505,0	
1000	52,8	528,0	
1000	54,0	540,0	

1000	51,7	517,0	$\varepsilon = 5,3\%$; $\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 52,7 \pm 2,8$
------	------	-------	-----------------------------------------------------------------------

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

Таблиця 3.3

Результати зворотного варіанту екстракційно-спектрофотометричного визначення вортиоксетину, виділеного з печінки настоюванням з водою, підкисленою кислотою ацетатною (середнє з п'яти визначень)

Введено вортиоксетину до 20 г печінки, мкг	Виділено вортиоксетину		Метрологічні характеристики
	мкг	%	
1000	52,2	552,0	$\bar{x} = 52,3$; $S = 3,8$; $RSD = 7,2\%$; $S\bar{x} = 1,3$; $\Delta\bar{x} = 3,8$; $\varepsilon = 7,3\%$; $\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 52,3 \pm 3,8$
1000	49,8	498,0	
1000	53,5	535,0	
1000	51,6	516,0	
1000	54,6	546,0	

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

3.3 Ідентифікація гідроброміду вортиоксетину в біовитягах з тканин секційного матеріалу методом хроматографії в тонких шарах сорбенту та хромореагентами

Дослідження біоекстрактів з гомогенізованих тканин модельної печінки на наявність брінтелліксу виконували після очищення їх послідовним сполученням методів рідинно-рідинної та ТШ- хроматографії.

Методика виявлення вортиоксетину (ТШХ). На «старт» хроматографічної пластинки (розд. 2.3) (близько 2,0 – 2,5 см від її краю) кварцевим капіляром наносили різні кількості (від 10 до 20 мкл стандарту брінтелліксу (висхідна конц-я 1 мг/мл). Поруч, рівною смугою наносили частину біовитягу (випареного до 0,02-0,03 мл) з печінки (5,00 мл). Поруч –

наносили 2,00 мл випареного до 0,25 мл біоекстракту з гомогенізату «сліпого» контрольного дослідження.

Хроматограми з біопробами розвивали в наступних рухомих фазах послідовно: хлороформ (рухома фаза №1), в ній речовини-домішки переміщувались до «фінішу», а вортіоксетин залишався на «старті» пластинки.

Хроматограми підсушували в потоці теплого повітря та вносили до камери з рух. ф. етилацетат – метанол – 25 % р-н NH_4OH (8,5:1:0,5) (R_f брінтелліксу 0,41 до 0,89), чи метанол – 25 % р-н NH_4OH (100:1,5) (R_f від 0,48 до 0,78).

Плями брінтелліксу на отриманих хроматограмах проявляли реактивом Драгендорфа-Мун'є. Значення R_f плям брінтелліксу для біовитягів з гомогенізату ткани біоматеріалу та тимолептику-стандарту співпадали (у межах похибок). «Контрольні» біовитяги жодних забарвлених плям не утворювали.

Для детектування брінтелліксу за допомогою хромореактивів хлороформні біовитяги гомогенатів переносили на ТШХ-пластинку. До висушеного в потоці повітря залишку додавали хромореактиви (див. табл. 2.2) та відмічали їх характер забарвлень.

Спостерігаємі забарвлення плям тимолептику в біовитягах з гомогенізатів печінки та в стандартному розчині (свідок) є однаковими. Біовитяги зі «сліпих» контрольних дослідів забарвлень не утворювали.

3.4 УФ-спектрофотометричний метод виявлення та кількісного визначення гідроброміду вортіоксетину в екстрактах з гомогенізатів біоматеріалу

Кожен з елюатів-біовитягів з хроматограм обережним нагріванням випаровували, залишки розчиняли в 3-4 мл 0,1 М р-ну HCl та знімали світлопоглинання брінтелліксу (як опис. у розд. 2.3), а як компенсаційний р-н був обраний елюат-біовитяг з паралельного «сліпого» контрольного дослідів.

УФ-спектр елюату-біовитягу був аналогічним УФ-спектру стандарту-тимолептику в 0,1 М р-ні НСІ (λ_{\max} 232-233 нм).

Кількісна оцінка вмісту брінтелліксу у біоекстрактах з секційного гомогенізованого матеріалу методом УФ-спектрофотометрії (λ_{\max} 232 нм). 5 мл метанольного екстракту-елюату (5 мл, V_3) розчиняли в 0,1 М р-ні НСІ (5 мл), вимірювали оптичні густини (A) розчинів при 232 нм. Розрахунок концентрації брінтелліксу проводили за побудованим калібрувальним графіком. Кількість брінтелліксу (W , мкг), виділеного з гомогенізату тканин біоматеріалу (ступінь ізол-я) проводили методом «виділено» / «внесено» тимолептику, у %, обчислено за формулою:

$$W = \frac{C_6 \times V_1 \times V_3}{V_2}$$

де C_6 – концентрація брінтелліксу в екстракті-елюаті, мкг/мл;

V_1 – отримано ізольованням брінтелліксу об'єм біоекстракту з (після екстр-го очищ-я, (мл);

V_2 – взято для очищ-я м-дом ТШ-хроматографії об'єм біоекстракту, мл;

V_3 – отримано після доп-го очищ-я м-дом ТШ-хроматографії об'єм екстракту-елюату, мл;

Результати кількісного визначення брінтелліксу в біовитягах з гомогенату тканин при ізольованні водою, підкисленою кислотою ацетатною, приведено в табл. 3.2–3.3. Ступінь ізольовання брінтелліксу новим запропонованим методом виділення склала 52 %.

Висновки до розділу 3

1. Досліджені умови екстрагування тимолептику брінтелліксу з розчинів препарату в воді поширеними органічними екстрагентами у залежності від рН. Показано, що при цьому найвищій ступінь екстракції тимолептику спостерігається за умови використання екстрагентом хлороформу (рН 9). Для усунення впливу домішок з біовитягів екстракційним методом доцільно використовувати етер діетиловий (рН 2).

2. Розроблено новий індивідуальний метод виділення вортіоксетину з тканин біологічного матеріалу шляхом настоювання з водою, підкисленою кислотою ацетатною. Показано його високу розрізняючу спроможність щодо вортіоксетину, ступінь ізолювання якого склав 52 %, що відповідає вимогам до ефективності методик виділення ксенобіотиків з секційного матеріалу в судовій токсикології.

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

1. Досліджено взаємодію тимолептичного препарату новітньої генерації антидепресантів – брінтелліксу з рядом скринінгових хромореактивів та встановлена їх чутливість.
2. Досліджено хроматографічну поведінку брінтелліксу в окремих рухомих фазах (скринінгових), які рекомендує Асоціація судових токсикологів щодо проведення попередніх етапів скринінгових досліджень найбільш важливих груп та окремих представників психотропних і наркотичних препаратів на різних типах ТШХ-пластинок.
3. Розроблено умови ідентифікації вортіоксетину методом рідинної хроматографії (зворотньо-фазний варіант) з УФ-спектрофотометричним типом детектування та визначено основні параметри утримування досліджуваного антидепресантного препарату.
4. Для проведення кількісного визначення брінтелліксу в біовитягах з наважки гомогенізованих тканин модельної печінки запропоновано методи абсорбційної ультрафіолетової спектрофотометрії та зворотний варіант екстракційно-спектрофотометричного визначення речовини основного характеру (вказаний тимолептик) з кислотним азобарвником метилоранжем.
5. Встановлено показники ступеню екстракції брінтелліксу з водних розчинів залежно від рН водної фази та природи органічних екстрагентів, зокрема, аліфатичних галогенпохідних вуглеводнів та діетилового етеру, Обрано оптимальний органічний екстрагент – хлороформ при рН 9,0 (ступінь екстракції тимолептичного засобу дорівнював 68 %) для процесів екстрагування брінтелліксу з водних розчинів. Мінімальне значення показника ступеню екстракції зазначеного тимолептичного препарату спостерігалось при екстрагуванні етером діетиловим при рН 1,0 (близько 1–1,5 %).
6. Розроблено та опрацьовано нову ефективну методику проведення ізолювання вортіоксетину з наважки тканин гомогенізату секційного

біоматеріалу за допомогою проведення настоювання зазначеного об'єкту з водою, підкисленою кислотою ацетатною, розрізняючи ефективність якої склала 52%, що значною мірою перевершує ефективність виділення досліджуваного тимолептика з використанням загальноприйнятих методик виділення лікарських «отрут» екстракцією полярними розчинниками. Досліджено та запропоновано прості та ефективні умови для виконання очистки біовитягів від наявних співекстрактивних ендогенних речовин на основі використання методів рідинно-рідинної екстракції.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Vortioxetine for Major Depressive Disorder in Adolescents: 12-Week Randomized, Placebo-Controlled, Fluoxetine-Referenced, Fixed-Dose Study / L. Robert Findling et al. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry*. 2022. Vol. 61(9). P. 1106-1118.
2. Wichniak A., Iwański M., Mitrić M. The use of vortioxetine in the treatment of depression following the failure of therapy with a selective serotonin reuptake inhibitor or a serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor. *Psychiatr. Pol.* 2025. Vol. 27:P. 1-14.
3. Chen G., Højer A. M., Areberg J., Nomikos G. Vortioxetine: Clinical Pharmacokinetics and Drug Interactions. *Clin. Pharmacokinet.* 2018. Vol. 57(6). P.673-686.
4. McIntyre R. S., Florea I., Pedersen M. M., Christensen M. C. Head-To-Head Comparison of Vortioxetine Versus Desvenlafaxine in Patients With Major Depressive Disorder With Partial Response to SSRI Therapy: Results of the VIVRE Study. *J. Clin. Psychiatry*. 2023. Vol. 84(4). P. 23m14780.
5. Antidepressants for the treatment of adults with major depressive disorder in the maintenance phase: a systematic review and network meta-analysis. / T. Kishi et al. *Mol. Psychiatry*. 2023. Vol. 28(1). P. 402-409.
6. Fagiolini A., Florea I., Loft H., Christensen M. C. Effectiveness of Vortioxetine on Emotional Blunting in Patients with Major Depressive Disorder with inadequate response to SSRI/SNRI treatment. *J. Affect. Disord.* 2021. Vol. 283. P. 472-479.
7. New generation antidepressants for depression in children and adolescents: a network meta-analysis. / Hetrick S.E. et al. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2021. Vol. 5(5). P. CD013674.
8. Gill H., McIntyre R. S., Christensen M. C. Analysis of reward behavior in patients with MDD and partial response to SSRI therapy treated with vortioxetine versus desvenlafaxine: Experience with the Effort-Expenditure for Rewards Task (EEfRT) in the VIVRE study. *J. Affect. Disord.* 2025. Vol. 388. P. 119563.

9. Vortioxetine in major depressive disorder: from mechanisms of action to clinical studies. An updated review. / J. De Diego-Adeliño et al. *Expert Opin. Drug. Saf.* 2022. Vol. 21(5). P. 673-690.
10. Czerwińska A., Pawłowski T. Cognitive dysfunctions in depression-significance, description and treatment prospects. / *Psychiatr. Pol.* 2020. Vol. 54(3). P. 453-466.
11. Greš A., Šagud M., Dickov A. Effect of vortioxetine on the quality of life in patients with schizophrenia. *Psychiatr. Danub.* 2024. Vol. 36(1). P. 47-57.
12. K. E. Towbin. Editorial: Not the Same as Adults: Vortioxetine in Adolescents With Major Depression. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry.* 2022. Vol. 61(9). P. 1081-1083.
13. Elsayed O. H., Ercis M., Pahwa M., Singh B. Treatment-Resistant Bipolar Depression: Therapeutic Trends, Challenges and Future Directions. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2022. Vol. 18. P. 2927-2943.
14. Long J. D. Vortioxetine for Depression in Adults. *Issues Ment. Health Nurs.* 2019. Vol. 40(9). P. 819-820.
15. Christensen M. C., Grande I., Rieckmann A., Chokka P. Efficacy of vortioxetine versus desvenlafaxine in the treatment of functional impairment in patients with major depressive disorder: Results from the multinational VIVRE study. *CNS Spectr.* 2024. Vol. 28. P. 1-10.
16. Pharmacological treatment in autism: a proposal for guidelines on common co-occurring psychiatric symptoms. Manter M. *BMC Med.* 2025. Vol. 23(1). P. 11.
17. Vortioxetine for Cognitive Impairment in Major Depressive Disorder During Post-COVID Syndrome: Real-World Evidence. / H. F Guillen-Burgos. *J. Clin. Psychiatry.* 2025. Vol. 86(2). P. 24m15387.
18. Vortioxetine versus SSRI/SNRI with Pregabalin Augmentation in Treatment-Resistant Burning Mouth Syndrome: A Prospective Clinical Trial. / D. Adamo et al. *Curr. Neuropharmacol.* 2025. Vol. 23(7). P. 800-819.

19. A retrospective analysis of vortioxetine utilization in children and adolescents with major depressive disorder in clinical practice. X. Luo et al. *BMC Psychiatry*. 2025. Vol. 25(1). P. 509.
20. Efficacy and tolerability of vortioxetine monotherapy in SSRI-resistant OCD: a retrospective multicenter study. / V. Martiadis et al. *Front Psychiatry*. 2025. Vol. 16. P. 1617345.
21. Verrienti G., Colonna I., Raccagni C. Use of vortioxetine in different neurological fields: a systematic review and future perspectives. *Neurol. Sci.* 2025. Vol. 46(5). P. 2055-2071.
22. Disease-Modifying Symptomatic Treatment (DMST): The Potential Role of Vortioxetine in the Treatment of Depression in Patients with Multiple Sclerosis. / E. Dolcetti et al. *Curr. Neuropharmacol.* 2025. Vol. 23(5). P. 493-502.
23. The efficacy of vortioxetine in the acute treatment of major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis. / I. Berardelli et al. *Psychopharmacol.* 2025. Vol. 39(2). P. 92-105.
24. Vortioxetine in children and adolescents with major depressive disorder: 6-month and 18-month open-label, flexible-dose, long-term extension studies. M. P. DelBello et al. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry*. 2025. Vol. 34(4). P. 1425-1434.
25. Vortioxetine Improves Brain Glymphatic System Function, Functional Connectivity, and Cognitive Functions in Major Depressive Disorder. Z. Guo et al. *Depress. Anxiety*. 2025. Vol. 30. P. 1990117.
26. Wang J., Wang J., Zhang C., Li G. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous determination of 23 antidepressants and active metabolites in human serum and its application in therapeutic drug monitoring. *Front Pharmacol.* 2025. Vol. 16. P. 1531496.
27. Shiroyama T., Fukuyama K., Okada M. Distinct Effects of Escitalopram and Vortioxetine on Astroglial L-Glutamate Release Associated with Connexin 43. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22(18). P. 10013.

28. Barbosa-Méndez S., Perez-Sánchez G., Salazar-Juárez A. Vortioxetine treatment decreases cocaine-induced locomotor sensitization in rats. *Physiol. Behav.* 2022. Vol. 257. P. 113989.
29. Fukuyama K., Motomura E, Shiroyama T., Okada M. Impact of 5-HT₇ receptor inverse agonism of lurasidone on monoaminergic tripartite synaptic transmission and pathophysiology of lower risk of weight gain. *Biomed. Pharmacother.* 2022. Vol. 148.P. 112750.
30. Pharmacokinetic and metabolic studies of Vortioxetine in rats using ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. / S. Guan et al. *J. Sep. Sci.* 2018. Vol. 41(24). P. 4469-4479.
31. Whole blood and oral fluid microsampling for the monitoring of patients under treatment with antidepressant drugs. / C. Marasca et al. *Pharm. Biomed. Anal.* 2020. Vol. 188. P. 113384.
32. Barbosa-Méndez S., Perez-Sánchez G., Salazar-Juárez A. Vortioxetine treatment decreases cocaine-induced locomotor sensitization in rats. *Physiol. Behav.* 2022. Vol. 257. P. 113989.
33. Lethal vortioxetine poisoning? A forensic investigation. / P. Zuccarello et al. *Leg. Med.* 2023. Vol. 65. P. 102314.

ДОДАТКИ

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



СЕРТИФІКАТ №354

Цим засвідчується, що

Толпигіна Вікторія

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» № 858 від 26.12.2024 р.

В. о. ректора НФаУ, проф.

Завідувач кафедри
 фармацевтичної хімії НФаУ, проф.



Олександр КУЧЕНКО

Вікторія ГЕОРГІЯНЦ