

## РАЗРАБОТКА УСЛОВИЙ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АТОМОКСЕТИНА ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Людмила Ю. Томаровская<sup>1</sup>, Светлана А. Карпушина<sup>1</sup>,  
Сергей В. Баярка<sup>1</sup>, Наталья Н. Космина<sup>2</sup>, Эльшан Ю. Ахмедов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный фармацевтический университет, Харьков, Украина

<sup>2</sup>Харьковский научно-исследовательский экспертно-криминалистический центр МВД Украины, Харьков, Украина

**Ключевые слова:** атомоксетин, газовая хроматография, идентификация, количественное определение

Атомоксетин ((3R)-N-метил-3-(2-метилфенокси)-3-фенилпропана-1-амина гидрохлорид) рассматривают как препарат выбора для коррекции широко распространенного неврологического расстройства – синдрома дефицита внимания с гиперактивностью (СДВГ) [1, 2]. Препарат не относится к психостимуляторам, обычно рекомендуемым в медикаментозной терапии СДВГ, и потому лишен нежелательного побочного действия последних. Несмотря на минимальные побочные эффекты атомоксетина, в ряде исследований отмечена возможность развития такого серьезного осложнения при его приеме как появление суицидальных мыслей и суицидального поведения [3]. В литературе описаны летальные отравления, аналитическая диагностика которых показала присутствие атомоксетина в биологических объектах в следующих концентрациях: печень – от 0,44 до 29 мг/кг, артериальная кровь – от 0,1 до 8,3 мг/л, желчь – от 1,0 до 33 мг/л [4, 5].

Большинство приведенных в литературе биоаналитических методик определения атомоксетина основаны на использовании ВЭЖХ с МС- [6], а также УФ-спектрофотометрическим и флуоресцентным детектированием [4]. В токсикологическом скрининге психоактивных веществ все большее применение находят tandemные методы анализа: ВЭЖХ-МС и ГХ-МС [4, 7], отличающиеся высокой специфичностью и селективностью. Согласно рекомендациям Международной ассоциации судебных токсикологов (The International Association of Forensic Toxicologists, TIAFT), результаты судебно-токсикологических исследований, полученные с помощью ГХ-МС и ВЭЖХ-МС, не требуют подтверждения другими методами ана-

лиза [4]. Несмотря на универсальность ВЭЖХ-МС, позволяющей анализировать нелетучие и термонеустойчивые вещества, при использовании указанного метода для определения микроколичества аналита в достаточно большом объеме биологической матрицы наблюдается нежелательный феномен ионной супрессии [8]. Данных об условиях определения атомоксетина в биосубстратах методом газовой хроматографии для целей судебной и клинической токсикологии в литературе не найдено.

Целью работы явилось установление условий идентификации и количественного определения атомоксетина методами ГХ-МС и ГХ с пламенно-ионизационным детектированием (ГХ-ПИД).

### Материалы и методы

Для исследования использовали субстанцию атомоксетина, которая была выделена из лекарственного средства Страттера® (7 капсул по 60 мг) производства «Lilly» (Чехия) по методике, описанной ранее [9].

Готовили стандартный раствор (СР) атомоксетина гидрохлорида в этаноле. 0,01140 г атомоксетина гидрохлорида (что в пересчете соответствовало 0,01000 г атомоксетина-основания) растворяли в указанном растворителе с использованием мерной колбы объемом 5,0 мл (концентрация полученного СР составляла 2000 мкг/мл атомоксетина-основания). СР фильтровали через бумажный фильтр (фильтр обеззоленный «синяя лента»). Разбавлением СР готовили 4 рабочих стандартных раствора (РСР) с концентрацией 1000 мкг/мл, 500 мкг/мл, 250 мкг/мл, 125 мкг/мл препарата, которые исследовали методом ГХ-МС. Для построения калибровочного графика разбавлением СР

готовилиб РСР с концентрацией 1000 мкг/мл, 100 мкг/мл, 40 мкг/мл, 20 мкг/мл, 10 мкг/мл и 2 мкг/мл препарата, которые исследовали методом ГХ-ПВД.

Условия хроматографирования атомоксетина на газовом хроматографе с масс-селективным детектором TRASEULTRAGC/ISQ/AS 3000 II: капиллярная колонка TG-5MS, длина – 30 м, диаметр 25 мкм с размером частиц фазы 0,25 мкм; тип газа – гелий, постоянный поток со скоростью 1,2 мл/мин; автоинжектор 7683, режим Split, деление потока 50:1; температура испарителя 220 °С, температура колонки: начальная – 100 °С (удерживание 2 мин), нагревание 10 град/мин, температура конечная 300 °С (удерживание 5 мин); детектор – масс-селективный, температура интерфейса 220 °С, ионизация электронным ударом, энергия ионизации – 70 эВ, температура ионного источника 200 °С, температура квадруполя 150 °С; объем пробы 1,0 мкл; общее время анализа – 30 мин.

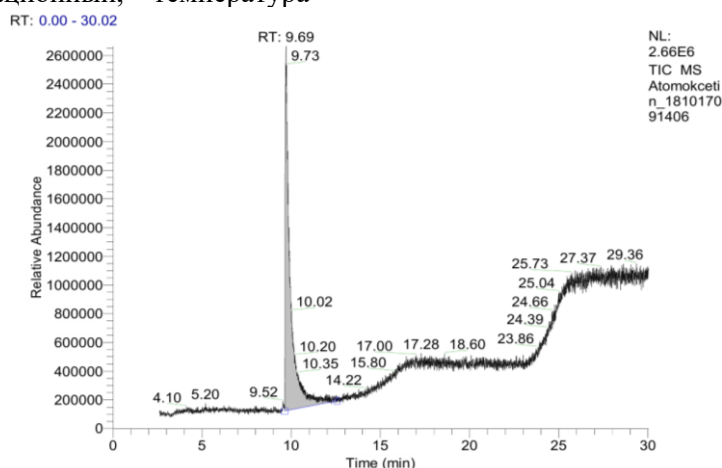
Условия хроматографирования атомоксетина на газовом хроматографе «Shimadzu GC-2010 Plus»: колонка – аналог Rxi-SmS\$, длина – 30 м, диаметр – 0,25 мм, фаза – 0,25 мкм; тип газа – гелий, постоянный поток со скоростью 1,13 мл/мин; автоинжектор, режим Split, деление потока 50:1; температура инжектора – 280 °С, температура колонки: начальная – 100 °С, конечная – 290 °С (удерживание 1 мин), скорость нагревания – 15 град/мин; детектор – пламенно-ионизационный, температура

детектора – 300 °С, расход водорода – 40 мл/мин, расход воздуха – 400 мл/мин; объем пробы 1,0 мкл; общее время анализа – 13,67 мин.

## Результаты и обсуждение

При выборе условий идентификации атомоксетина методом ГХ-МС детектирование проводили в режиме полного сканирования ионов (*full-scan*), который позволяет получить наиболее полную информацию о структуре аналита при проведении токсикологического скрининга. Следует отметить, что при количественном анализе, проводимом на приборах сканирующего типа, например квадруполях, возникает проблема искажения масс-спектра (*spectralskewing*), что может привести к неточным результатам [10]. Таким образом, условия количественного анализа атомоксетина нами были разработаны на основе метода ГХ-ПВД.

В условиях анализа методом ГХ-МС время удерживания атомоксетина (RT) составило  $9,64 \pm 0,06$  мин ( $n = 5$ ,  $P = 0,95$ ). Установлен предел обнаружения методики (LOD), который составил 250 мкг/мл (0,25 мкг в пробе) согласно критерию «отношение сигнал/шум»  $S/N \geq 3$ . Хроматограмма, соответствующая концентрации атомоксетина на уровне LOD, представлена на рис. 1. Для раствора атомоксетина с концентрацией 125 мкг/мл хроматографический пик не регистрировался.



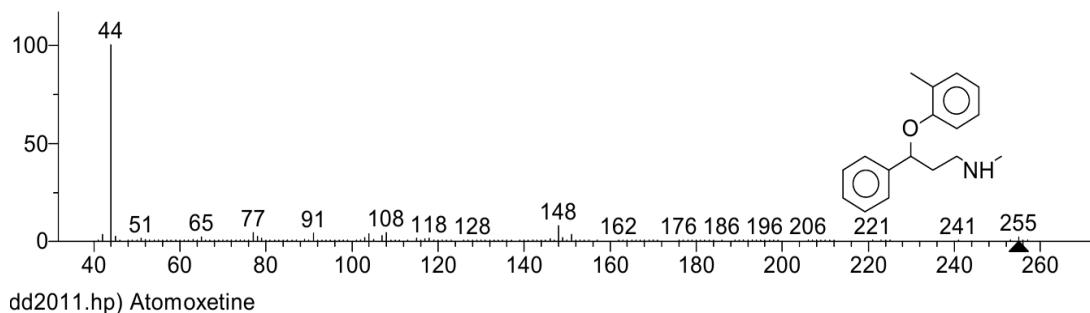
**Рисунок 1.** Хроматограмма раствора атомоксетина с концентрацией 250 мкг/мл (0,25 мкг в пробе) при анализе методом ГХ-МС

На рис. 2 представлен полученный нами масс-спектр атомоксетина. Как видно,

наиболее интенсивные пики соответствовали ионам с  $m/z$  44 и 148, наб-

людали также пик молекулярного иона при  $m/z$  255, что согласовалось с литературными

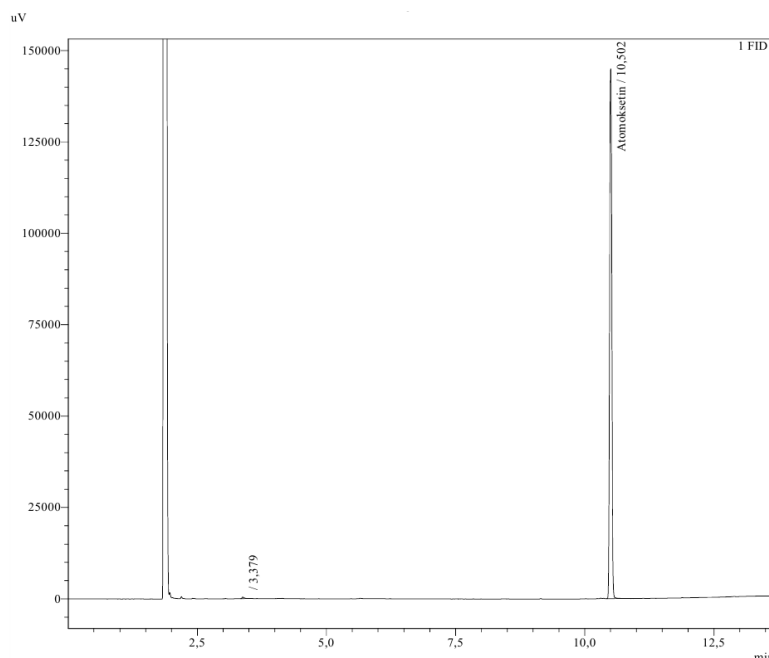
данными масс-спектрометрического анализа препарата [4].



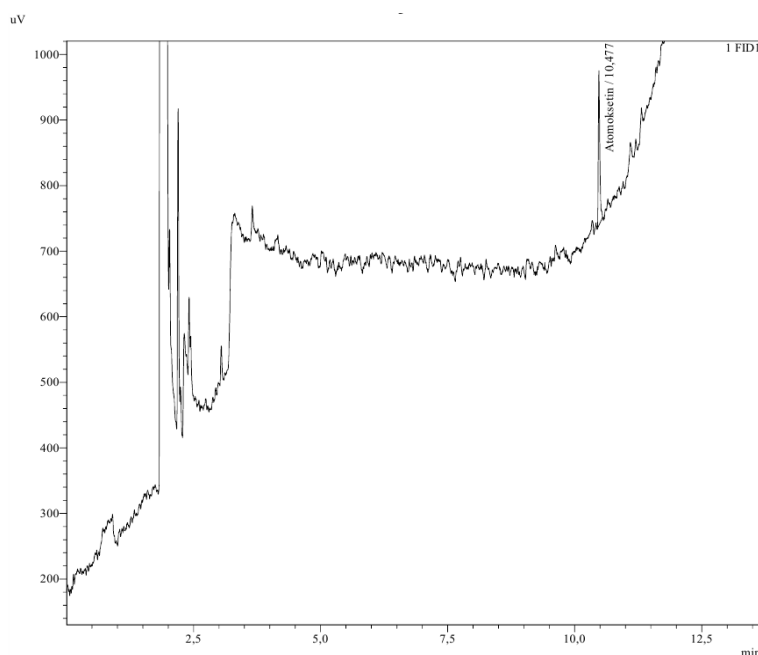
**Рисунок 2.** Масс-спектр электронного удара атомоксетина

Время удерживания атомоксетина при анализе методом ГХ-ПИД составило  $10,49 \pm 0,01$  мин ( $n = 5$ ,  $P = 0,95$ ) (рис. 3, 4). Для количественного определения использовали площадь хроматографического пика. Уравнение калибровочного графика, полученное методом наименьших квадратов, описывалось уравнением:  $y = (215,7 \pm 0,1)x$  ( $r = 0,999$ ;  $S_a = 51,4$ ;  $S_b = 0,003$ ). Линейность наблюдали в диапазоне концентраций препарата 2,0 – 2000 мкг/мл. Значения LOD и LOQ (предел количественного определения) были

рассчитаны исходя из величины стандартного отклонения свободного члена в уравнении калибровочного графика ( $S_a$ ) по формулам:  $LOD = 3,3S_a/b$  и  $LOQ = 10S_a/b$ . Они составили, соответственно, 0,8 мкг/мл (0,8 нг в пробе) и 2,4 мкг/мл (2,4 нг в пробе). Значение LOQ, установленное согласно критерию «отношение сигнал / шум»  $S/N \geq 10$ , составило 2 мкг/мл (2 нг в пробе). Хроматограмма, соответствующая концентрации атомоксетина на уровне LOQ представлена на рис. 4.



**Рисунок 3.** Хроматограмма раствора атомоксетина с концентрацией 2000 мкг/мл (2 мкг в пробе) при анализе методом ГХ-ПИД



**Рисунок 4.** Хроматограмма раствора атомоксетина с концентрацией 2 мкг/мл (2 нг в пробе) при анализе методом ГХ-ПИД

## Выводы

Разработаны условия идентификации атомоксетина методом ГХ-МС электронного удара в режиме *full-scan*, предел обнаружения методики составил 250 мкг/мл или 0,25 мкг препарата в пробе.

Разработана методика количественного определения атомоксетина методом ГХ-ПИД, величины LOD и LOQ составили,

соответственно, 0,8 мкг/мл (0,8 нг в пробе) и 2 мкг/мл (2 нг в пробе).

Определены основные валидационные характеристики разработанных методик. Установлено, что выбранные условия анализа атомоксетина методами ГХ-МС и ГХ-ПИД пригодны для идентификации и количественного определения препарата в количествах, предполагаемых при исследовании объектов клинической и судебной токсикологии.

## Литература

1. Reed V. A. The Safety of Atomoxetine for the Treatment of Children and Adolescents with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Comprehensive Review of Over a Decade of Research / V. A. Reed, J. K. Buitelaar, E. Anand et al. // *CNS Drugs*, 2016. Vol. 30, Issue 7, P. 603-628.
2. Childress A. C. A critical appraisal of atomoxetine in the management of ADHD / A. C. Childress // *Ther. Clin. Risk Manag.*, 2015, Vol. 12, P. 27-39.
3. Paxton G. A. Acute suicidality after commencing atomoxetine / G. A. Paxton, N. E. Cranswick // *J. Paediatr. Child Health*, 2008, Vol. 44, Issue 10, P. 596-598.
4. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material: 4-th edition / Ed. by A. C. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop. – London, Chicago: Pharmaceutical Press, 2011, 2736 P.
5. Garside D. Postmortem tissue distribution of atomoxetine following fatal and nonfatal doses – three case reports / D. Garside, J. D. Roper-Miller, E. C. Riemer // *J. Forensic Sci.*, 2006, Vol. 51 (1), P. 179-182.
6. A liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the analysis of atomoxetine in human plasma and in vitro cellular samples / D. I. Appel, B. Brinda, J. S. Markowitz et al. // *Biomed. Chromatogr.*, 2012, Vol. 26, Issue 11, P. 1364-1370.
7. Гладилович В. Д. Возможности применения метода ГХ-МС (обзор) / В. Д. Гладилович, Е. П. Подольская // *Масс-спектрометрия для биотехнологии*, 2010, Т. 20, № 4, С. 36-49.

8. Pitfalls and prevention strategies for liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the selected reaction-monitoring mode for drug analysis / F. L. Sauvage, J. M. Gaulier, G. Lachâtre et al. // Clin. Chem., 2008, V. 54(9), P. 1519-1527.

9. Томаровська Л. Ю. Розробка методів ідентифікації атомoksetину, придатних для хіміко-токсикологічного аналізу // Л.Ю. Томаровська, С.В. Баярка, С. А. Карпушина // Вісник фармації, 2017, № 2 (90), С. 13-20.

10. Samokhin A. Spectral skewing in gas chromatography-mass spectrometry: Misconceptions and realities / A. Samokhin // J. Chromatogr. A, 2018, Vol. 1576(16), P. 113-119.

## **ATOMOKSETİNİN KİMYA-TOKSİKOLOJİ ANALİZ MƏQSƏDİLƏ TƏYİNİ ÜÇÜN ŞƏRAİTİN MÜƏYYƏN EDİLMƏSİ**

**Lyudmila Y. Tomarovskaya<sup>1</sup>, Svetlana A. Karpuşina<sup>1</sup>, Sergey V. Bayurka<sup>1</sup>,  
Natalya N. Kosmina<sup>2</sup>, Elşən Y. Əhmədov<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Milli Əczaçılıq Universiteti, Xarkov, Ukrayna

<sup>2</sup>Ukrayna DİN-nin Xarkov Elmi-Tədqiqat Ekspertiza-Kriminalistika Mərkəzi, Xarkov, Ukrayna

**Açar sözlər:** atomoksetin, qaz xromatoqrafiyası, eyniliyinin təyini, miqdarı təyinat

Atomoksetinin eyniliyinin və miqdarı təyini üçün mass-spektrometrik və plazma-ionlaşdırıcı deteksiya ilə qaz xromatoqrafiya üsulunun şəraiti müəyyən edilmişdir. Təklif olunan üsulların məhkəmə- və kliniki-toksikoloji tədqiqatlar üçün yararlıdır bir sıra validasiya parametrləri ilə təsdiq olunmuşdur.

## **DEVELOPMENT OF CONDITIONS FOR DETERMINATION OF ATOMOXETINE FOR THE PURPOSES OF CHEMICAL-TOXICOLOGICAL ANALYSIS**

**Liudmila Yu. Tomarovska<sup>1</sup>, Svetlana A. Karpushina<sup>1</sup>, Sergii V. Baiurka<sup>1</sup>, Nataliya N. Kosmina<sup>2</sup>,  
Elshan Yu. Akhmedov<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup>Kharkov Scientific Research Forensic Center of the Ministry of Internal Affairs of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

**Keywords:** atomoxetine, gas chromatography, identification, quantitative determination

The conditions for the identification and quantitative determination of atomoxetine by gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection have been determined. The suitability of the developed methods for forensic and clinical toxicological studies was confirmed by a number of validation parameters.

© Müəlliflər kollektivi, 2019