

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

ТОМАРОВСЬКА ЛЮДМИЛА ЮРІЇВНА

УДК 615.065:54.061/062:547.712

ХІМІКО-ТОКСИКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ АТОМОКСЕТИНУ

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

**Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук**

Харків – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Національному фармацевтичному університеті Міністерства охорони здоров'я України

Науковий керівник: доктор фармацевтичних наук, професор
БАЮРКА СЕРГІЙ ВАСИЛЬОВИЧ
Національний фармацевтичний університет,
професор кафедри аналітичної хімії та аналітичної
токсикології

Офіційні опоненти: доктор хімічних наук, професор
СВЄЧНІКОВА ОЛЕНА МИКОЛАЇВНА
Харківський національний педагогічний університет
імені Г. С. Сковороди, професор кафедри хімії

доктор фармацевтичних наук, професор
ВАСЮК СВІТЛАНА ОЛЕКСАНДРІВНА
Запорізький державний медичний університет,
завідувач кафедри аналітичної хімії

Захист відбудеться «21» квітня 2021 р. о 13⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий «19» березня 2021 року.

В.о. вченого секретаря
спеціалізованої вченої ради,
професор

О. А. Рубан

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Отруєння лікарськими препаратами антидепресивної дії займають одне з перших місць у світі серед усіх груп психотропних препаратів. Це пов'язано зі значним поширенням захворювань на депресію, які за даними ряду міжнародних організацій, у тому числі й ВООЗ, у найближчі роки посядуть одне з перших місць у світі. Лікування депресії – це комплекс заходів, провідну роль серед яких відіграє фармакотерапія, яка полягає у призначенні антидепресантів останніх генерацій, до яких відноситься і атомoksetин. Вказаний антидепресант є одним з першочергових при лікуванні синдрому дефіциту уваги з гіперактивністю. Його також використовують у терапії резистентної до лікування депресії, психозів, біполярних розладів, епілепсії як самостійний засіб, так і при комплексному лікуванні з рядом інших препаратів антидепресивної та психотропної дії. За певних умов атомoksetин може проявляти побічну дію, пов'язану з кардіотоксичністю та його здатністю призводити до суїцидальних намірів, особливо у підлітків. У світі зареєстровані випадки хронічних передозувань, а також гострих та летальних отруєнь атомoksetином [Barker et al., 2004; Garside et al., 2006].

Аналітичні аспекти токсикології атомoksetину розроблені недостатньо. Наведені в літературі біоаналітичні методики визначення атомoksetину запропоновані для цілей фармакокінетичних досліджень, які передбачають різні види колонкової хроматографії з використанням мас-спектрометричного детектування, що на сучасному етапі розвитку вітчизняної судової токсикології є малодоступним для більшості установ, пов'язаних з виконанням експертних токсикологічних досліджень. Найбільш поширеними методами пробопідготовки при визначенні атомoksetину в екстрактах з біологічного матеріалу є рідинно-рідинна екстракція та твердофазна екстракція (ТФЕ). До недоліків методу ТФЕ, що обмежує його використання у практиці хіміко-токсикологічних досліджень, можна віднести високу собівартість матеріалів та трудомісткість оптимізації умов ізолювання.

Таким чином, актуальною є розробка умов виявлення та ідентифікації атомoksetину в присутності його фармакологічних та структурних аналогів з використанням доступних та ефективних методів аналізу: ТШХ, УФ-спектрофотометрії, екстракційної фотометрії, рідинної та газової хроматографії, які є основними інструментами токсикологічного скринінгу в вітчизняній практиці хіміко-токсикологічного аналізу. При цьому систематичний ТШХ-скринінг, рекомендований Міжнародною асоціацією судових токсикологів (TIAFT) передбачає використання для хроматографічних досліджень у судовій токсикології високовартісних пластин Merk, що також обмежує їх використання у вітчизняних бюро судово-медичної експертизи. Доцільним є встановлення параметрів хроматографічної рухливості атомoksetину на пластинах Сорбфіл, які є найбільш поширеними при токсикологічних дослідженнях у вітчизняних бюро судово-медичної експертизи.

Актуальне питання – розробка методів ізолювання атомoksetину з біологічних об'єктів та біологічних рідин, оскільки у вітчизняній літературі ці дані відсутні.

Таким чином, актуальним є систематичне хіміко-токсикологічне дослідження атомoksetину з урахуванням його фізико-хімічних властивостей та

токсикокінетичних характеристик із застосуванням сучасних методів аналізу та пробопідготовки, впроваджених у вітчизняну практику токсикологічних досліджень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертацію виконано у відповідності з планом науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету за темою «Хіміко-токсикологічний аналіз біологічно активних речовин та лікарських засобів», шифр держреєстрації 0114U000958 та Проблемної комісії «Фармація» МОЗ і НАМН України. Дисертантом особисто розроблені методи хіміко-токсикологічного аналізу атомoksetину.

Мета і завдання дослідження. Метою дослідження є розробка методів хіміко-токсикологічного аналізу нового антидепресивного засобу атомoksetину, який застосовується при лікуванні депресивних розладів різного походження, та на їх основі створення алгоритму проведення токсикологічного дослідження біологічних об'єктів та біологічних рідин на присутність атомoksetину, придатного для використання у вітчизняній практиці судово-токсикологічних досліджень та у клінічній токсикології.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

– розробити методикку ідентифікації атомoksetину методом тонкошарової хроматографії: визначити параметри хроматографічної рухливості атомoksetину та ряду інших антидепресантів, які призначаються сумісно з ним, встановити результати реакцій забарвлення досліджуваного препарату та його фармакологічних аналогів з хромогенними реактивами, що використовуються при систематичному токсикологічному скринінгу психотропних та наркотичних речовин;

– розробити умови ідентифікації та кількісного визначення атомoksetину в біологічних об'єктах з використанням методів УФ-спектрофотометрії, екстракційної спектрофотометрії на основі реакцій з метиловим оранжевим та з азобарвником – похідним теофілідину, високоефективної рідинної хроматографії з мультитхвильовим УФ-спектрофотометричним детектуванням, газової хроматографії з використанням полум'яно-іонізаційного та мас-спектрометричного детектування;

– вивчити умови екстрагування атомoksetину з водних розчинів органічними розчинниками в залежності від рН середовища та наявності висолувачів, розробити ефективні методики очистки екстрактів з біологічних об'єктів, що містять атомoksetин, від ендогенних компонентів біологічної матриці;

– встановити розрізняючу спроможність загальних методів ізолювання лікарських речовин з біологічного матеріалу з використанням гідрофільних та амфифільних розчинників відносно атомoksetину та опрацювати спеціальну методикку виділення атомoksetину з біологічних об'єктів за допомогою ліпофільного розчинника хлороформу;

– встановити оптимальні умови ізолювання атомoksetину з біологічних рідин (кров, сеча) методом рідинно-рідинної екстракції;

– вивчити можливість виявлення атомoksetину в сечі за продуктами його біотрансформації з використанням методу тонкошарової хроматографії та ідентифікувати основні та мінорні метаболіти атомoksetину, виділені з сечі, методом мас-спектрометрії;

– вивчити розподіл атомoksetину по органах і тканинах в умовах експерименту на лабораторних тваринах;

- вивчити умови та можливість виявлення атомоксетину в біологічному матеріалі, що піддався гнилісним змінам, у залежності від термінів зберігання;
- на основі проведених досліджень розробити алгоритм проведення токсикологічного дослідження біологічного матеріалу, крові та сечі на присутність атомоксетину, придатний для цілей судово-медичної токсикології та клінічної токсикології.

Об'єкт дослідження – хіміко-токсикологічний аналіз атомоксетину, препарату антидепресивної дії нової генерації, що використовується для лікування депресивних порушень.

Предмет дослідження – методи пробопідготовки, виявлення та ідентифікації, кількісного визначення атомоксетину в біологічному матеріалі та біологічних рідинах, розробка алгоритму проведення токсикологічного дослідження біологічних об'єктів на присутність атомоксетину.

Методи дослідження. У роботі було використано сучасні фізико-хімічні методи досліджень: тонкошарова хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія з мультихвильовим УФ-спектрофотометричним детектуванням (ВЕРХ-УФД), УФ-спектрофотометрія, екстракційна спектрофотометрія у видимій області спектра, газова хроматографія з мас-спектрометричним детектуванням (ГХ-МС), газова хроматографія з полум'яно-іонізаційним детектуванням (ГХ-ПІД), мас-спектрометрія для виявлення та кількісного визначення атомоксетину. Пробопідготовку біологічних рідин здійснювали методом рідинно-рідинної екстракції, біологічного матеріалу – методом екстракції з використанням гідрофільних розчинників та розчинників з амфіфільними властивостями згідно з загальноприйнятими у хіміко-токсикологічному аналізі методами ізолювання лікарських речовин: А. О. Васильєвої, Стаса-Отто, В. П. Крамаренка, В. А. Карташова, І. Сшедзінські, а також спеціальним методом ізолювання.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше науково обґрунтовано та експериментально проведено хіміко-токсикологічний аналіз атомоксетину.

Вперше встановлено параметри хроматографічної рухливості атомоксетину в присутності його фармакологічних аналогів у ТШХ-системах, які рекомендовані ТІАФТ, та деяких інших системах, що застосовуються у практиці вітчизняних бюро судово-медичної експертизи.

Вперше досліджена взаємодія атомоксетину з рядом хромогенних реактивів, які використовуються при систематичному ТШХ-скринінгу лікарських речовин. Вперше запропонована схема візуалізації атомоксетину у присутності його фармакологічних аналогів з використанням найбільш чутливих та специфічних хромогенних реактивів (патент України на корисну модель № 125417 від 10.05.2018 р.).

Вперше запропоновано умови ідентифікації атомоксетину методами ВЕРХ-УФД та ГХ-ПІД. Розроблено методики кількісного визначення атомоксетину в біологічних об'єктах та біологічних рідинах методами УФ-спектрофотометрії, екстракційної спектрофотометрії у видимій області спектра з кислотним азобарвником метиловим оранжевим та азобарвником – похідним теофілідину, а також методами ВЕРХ-УФД та ГХ-ПІД.

Вперше встановлено ступінь екстракції атомоксетину з водних розчинів органічними розчинниками в залежності від рН водного середовища та наявності висолувачів.

Вперше встановлено ступінь ізолювання атомоксетину з біологічного матеріалу загальноприйнятими методами з використанням гідрофільних розчинників та розчинників, які проявляють амфіфільні властивості.

Вперше апробовано відносно атомоксетину спеціальний метод ізолювання ліпофільних лікарських речовин, що заснований на елююванні досліджуваної речовини ліпофільним розчинником хлороформом із зневодненого біологічного матеріалу з подальшою екстракційною очисткою отриманих елюатів з використанням пари неводних розчинників *n*-гексан – ацетонітрил.

Показана можливість виявлення атомоксетину в екстрактах з сечі людини за продуктами його метаболічних перетворень методом ТШХ; встановлено хроматографічну рухливість основного та мінорного метаболіту атомоксетину в тонких шарах сорбенту; встановлено результати забарвлення вказаних метаболітів з рядом хромогенних реактивів, які використовуються при проведенні токсикологічного скринінгу лікарських речовин; встановлено природу основного та мінорного метаболітів, екстрагованих з сечі, методом мас-спектрометрії.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблено методики виявлення та кількісного визначення атомоксетину у біологічному матеріалі та біологічних рідинах для використання при судово-токсикологічних дослідженнях на присутність атомоксетину на основі методів ТШХ, УФ-спектрофотометрії та екстракційної спектрофотометрії у видимій області спектра, ВЕРХ-УФД, ГХ-МС, ГХ-ПД, які можуть бути застосовані у практиці відділень судово-медичної токсикології обласних бюро судово-медичної експертизи, а також токсикологічних лабораторій лікарень для аналітичної діагностики гострих та хронічних отруєнь атомоксетином. Отримані результати з методів хіміко-токсикологічного аналізу атомоксетину впроваджено до практичної діяльності обласних бюро судово-медичної експертизи України (Харківського, Житомирського, Херсонського, Дніпропетровського), а також до наукових досліджень кафедри клінічної біохімії, судово-медичної токсикології та фармації Харківської медичної академії післядипломної освіти.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є завершеною науковою працею, виконаною здобувачем особисто під настановою наукового керівника. Дисертантом особисто здійснено літературний та патентно-інформаційний пошук, виконано експериментальні дослідження, статистичну обробку отриманих результатів, їх аналіз та систематизацію, розроблено структуру та зміст дисертаційної роботи, сформульовано висновки.

У співпраці з науковим керівником визначені мета та задачі дослідження, встановлено перелік питань, які необхідно вирішити, розроблено комплекс сучасних хімічних та фізико-хімічних методів дослідження атомоксетину в об'єктах біологічного походження, які запропоновано для хіміко-токсикологічного аналізу зазначеного антидепресанту.

Особистий внесок дисертанта щодо результатів експериментальних досліджень показано у наукових працях, опублікованих у співавторстві з Баюркою С. В., Карпушиною С. А. та наведено в анотації та в авторефераті.

Апробація результатів дисертації. Основний зміст дисертаційної роботи викладено та обговорено на Міжнародній науково-практичній конференції молодих

вчених та студентів «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (Харків, 2017, 2018), дистанційній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Інновации в медицине и фармации» (Мінськ, 2016, 2017), The international scientific conference «Science and life» (Karlovy Vary – Kyiv, 2017), республіканській науково-практичній конференції (з міжнародною участю) «Фармація: наука, образование, инновации и производство» (Ташкент, 2017), I Міжнародній (IX Українській) науковій конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Хімічні проблеми сьогодення» (Вінниця, 2018), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 80-річчю з дня народження доктора фармацевтичних наук, професора О.М. Гайдукевича (Харків, 2018), Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку», присвяченій 20-й річниці заснування Дня фармацевтичного працівника України (Харків, 2019).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 21 друковану роботу: 8 статей, з яких 3 у фахових виданнях України та 5 – у закордонних виданнях, у тому числі у періодичних виданнях, які включені до наукометричної бази Scopus – 1 наукова стаття, 12 тез доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях, а також патент України на корисну модель №125417 від 10.05.2018 р.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається із анотації, вступу, огляду літератури, 7 розділів експериментальних досліджень, загальних висновків, списку використаних джерел та 4 додатків. Загальний обсяг дисертації становить 258 сторінок. Основний текст дисертаційної роботи викладено на 161 сторінках друкованого тексту. У роботі представлено 52 таблиці, 40 рисунків та 2 схеми. Список використаних джерел складається з 202 літературних найменувань, з яких 73 – кирилицею та 129 – латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Фізико-хімічні і токсикокінетичні властивості, методи виявлення та визначення атомоксетину в біологічних об'єктах (Огляд літератури)

Проведено систематизацію та узагальнення даних літературних джерел стосовно поширеності депресивних захворювань, синдрому дефіциту уваги з гіперактивністю, для лікування якого застосовують атомоксетин, розглянуто причини отруєнь антидепресантами в Україні та світі. Дані з епідеміології отруєнь атомоксетином проаналізовано відносно до широти його застосування в сучасній фармакотерапії депресій, механізму та особливостей його фармакологічної дії, важкості побічних ефектів, токсичних властивостей, комбінованої терапії різними анксиолітиками та сумісного застосування їх з лікарськими препаратами інших груп. Систематизовано дані джерел літератури з фізико-хімічних властивостей, токсикокінетичних параметрів, біоаналітичних методів визначення атомоксетину. Розглянуто можливі шляхи метаболізму атомоксетину в організмі людини.

Розробка методів виявлення та ідентифікації атомоксетину

Обґрунтовано підхід до вибору біологічних об'єктів для проведення токсикологічного дослідження на присутність атомоксетину та розробки методів хіміко-токсикологічного аналізу вказаного антидепресанту, наведено реактиви та прилади, що були використані при розробці вказаних досліджень. Як біологічні об'єкти для судово-токсикологічного дослідження на присутність атомоксетину було

обрано печінку, кров та сечу, які містять найбільшу кількість вказаного антидепресанту та продуктів його біотрансформації, що підтверджено даними літератури з токсичних та летальних концентрацій атомоксетину в зазначених біологічних об'єктах.

Встановлено параметри хроматографічної рухливості атомоксетину та ряду його фармакологічних аналогів в тонких шарах сорбенту з використанням рухомих фаз, рекомендованих ПІАФТ для загального ТШХ-скринінгу лікарських речовин, а також деяких інших, що широко використовуються у хіміко-токсикологічному психотропних лікарських речовин основного характеру. Хроматографічну рухливість встановлено на п'яти типах хроматографічних пластин. Показано, що при проведенні ТШХ досліджень найбільш придатним для розділення досліджуваних антидепресантів є використання рухомих фаз: етилацетат – метанол – 25 % розчин амоній гідроксиду (85:10:5), циклогексан – толуен – діетиламін (75:15:10), толуен – ацетон – етанол – 25 % розчин амоній гідроксиду (45:45:7,5:2,5). Встановлено чутливі та специфічні хромогенні реактиви, які використовуються при систематичному токсикологічному скринінгу для ідентифікації атомоксетину в присутності інших антидепресантів. Для виявлення та ідентифікації атомоксетину в присутності його фармакологічних аналогів доцільно використання хромогенних реактивів у такій послідовності: УФ-світло, розчин нінгідрину, реактив Драгендорфа, реактиви Фреде, Маркі та модифікований реактив Манделіна. Визначено межі виявлення (LOD, мкг в пробі) реакцій взаємодії атомоксетину та його фармакологічних аналогів з хромогенними реактивами.

Опрацьовано умови ідентифікації атомоксетину в екстрактах з біологічних об'єктів УФ-спектрофотометричним методом за наявності специфічного світлопоглинання препарату в УФ-області спектра в 0,1 М розчині кислоти хлоридної при 270 та 277 нм (рис. 1). Розроблено методику ідентифікації атомоксетину методом ВЕРХ з мультисхвильовим УФ-спектрофотометричним детектуванням. Встановлено параметри утримування (t_R, V_R) та спектральні відношення атомоксетину. Час утримування препарату становив $4,4 \pm 0,1$ хв (рис. 2).

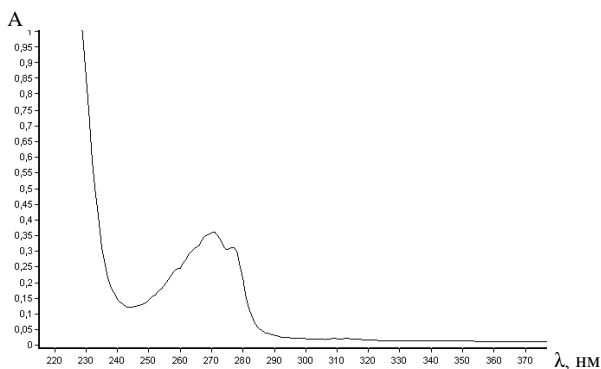


Рис. 1 УФ-спектр світлопоглинання атомоксетину в 0,1 М розчині кислоти хлоридної ($c_{ат} 3 \cdot 10^{-4}$ моль·л⁻¹)

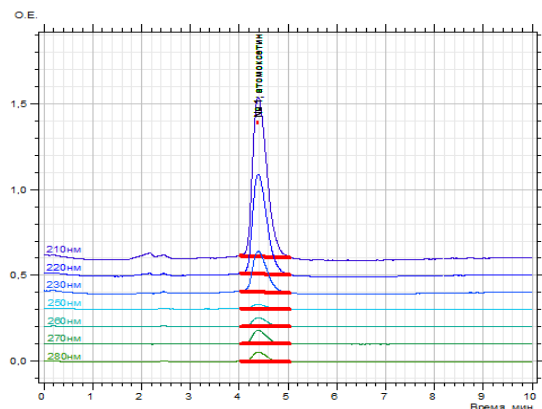


Рис. 2 ВЕРХ-хроматограма стандартного розчину атомоксетину в метанолі ($c_{ат} 100$ мкг·мл⁻¹)

Кількісне визначення атомоксетину

Кількісне визначення атомоксетину проводили методами УФ-спектрофотометрії та екстракційної спектрофотометрії у видимій області спектра з кислотним азобарвником метиловим оранжевим та азобарвником – похідним теофілідину, методами ВЕРХ-УФД та ГХ-ПД. Валідацію розроблених методик було проведено за параметрами лінійності, межі виявлення та кількісного визначення, селективності, правильності та прецизійності на трьох концентраційних рівнях (низькому, середньому та високому) в межах діапазону лінійності відповідної аналітичної методики (табл. 1)

Умови екстракції атомоксетину з водних розчинів

Наведено результати досліджень щодо визначення ступеню екстракції (R) атомоксетину в залежності від величини рН водного середовища різними органічними розчинниками та у присутності висолювачів. Встановлено, що в лужному середовищі ступінь екстракції досліджуваного антидепресанту значно зростає. Найвищий ступінь екстракції атомоксетину з водних розчинів спостерігався при екстрагуванні його хлороформом, тетраклорметаном та толуеном (при рН 13) (ступінь екстракції дорівнював 20,1–28,2 %). Найменше значення ступеню екстракції спостерігалось при рН 1–2 при екстрагуванні препарату 1,2-дихлоретаном, бенzenом, і особливо, діетиловим етером (ступінь екстракції дорівнював 0,2 – 1,6 %), що дозволило рекомендувати останній екстрагент для проведення додаткової екстракційної очистки екстрактів з біологічного матеріалу від співекстрактивних домішок. Показано також, що найбільш оптимальним органічним екстрагентом атомоксетину є хлороформ при рН 12 у присутності висолювачів. При цьому при використанні як висолювача натрій хлориду ступінь екстракції атомоксетину підвищувався до 83,3%, а при використанні амоній сульфату – до 88,9 %.

Ізолювання атомоксетину з біологічного матеріалу

Представлено результати досліджень щодо встановлення ефективності ізолювання атомоксетину з біологічного матеріалу загальноприйнятими у хіміко-токсикологічному аналізі методами з використанням гідрофільних та амфільних розчинників (табл. 2).

Ступінь ізолювання атомоксетину загальними методами не перевищував 32%, за виключенням методу І. Сшедзінські (ступінь ізолювання препарату становив близько 50%), що обумовлено ліпофільними властивостями досліджуваного антидепресанту, про що свідчать його високі значення коефіцієнту ліпофільності ($\log P$ 4,66) та об'єму розподілу (V_d 0,85 л · кг⁻¹).

Досліджено можливість використання ліпофільного розчинника хлороформу для елюювання атомоксетину з біологічного матеріалу, з наступним видаленням співекстрактивних речовин екстракційною очисткою в системі *n*-гексан – ацетонітрил. Кількісне визначення атомоксетину в екстрактах проводили методами УФ-спектрофотометрії та ВЕРХ-УФД. Ступінь ізолювання складав 70,3±3,9 % та 69,8±4,0 % препарату, відповідно, що свідчить про значне підвищення ефективності ізолювання препарату хлороформом у порівнянні з загальними методами.

Таблиця 1

Рівняння калібрувальної прямої $y = bx + a$ ($y = b'x$), її метрологічні характеристики та деякі валідаційні параметри методи кількісного визначення атомоксетину

Метод визначення	Лінійність, мкг·мл ⁻¹	$y = bx + a$ ($y = b'x$)	r	S_0^2	S_a	$\Delta b'$ (Δb)	Δa	LOD , мкг·мл ⁻¹	LOQ , мкг·мл ⁻¹
УФ- спектрофотометрія λ 270 нм	15,0 – 210	$y = 0,00455x + 0,016$	0,999	$3 \cdot 10^{-5}$	$2,49 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-5}$	0,005	1,8	5,5
Екстракційна спектрофотометрія (з метиловим оранжевим)	15,0 – 150	$y = 0,00808x$	0,999	$7 \cdot 10^{-5}$	$3,50 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-5}$	0	1,4	4,3
Екстракційна спектрофотометрія (з азобарвником – похідним теофілідину)	20,0 – 200	$y = 0,00513x$	0,999	$7 \cdot 10^{-5}$	$3,30 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-5}$	0	2,1	6,4
ВЕРХ-УФД λ 270 нм	10,0 – 1000	$y = 0,0000524$	0,999	$1,0 \cdot 10^{-7}$	$9,5 \cdot 10^{-5}$	$4 \cdot 10^{-7}$	0	6	18
ГХ-ПІД	2,0 – 2000	$y = 215,616x$	0,999	$2,6 \cdot 10^5$	51,36	0,131	0	0,8	2,4

Таблиця 2

Результати кількісного визначення атомоксетину УФ-спектрофотометричним методом в екстрактах, отриманих при ізолюванні загальними методами

Метод ізолювання	Додано атомоксетину до 20 (5 *) г печінки, мкг	Виділено атомоксетину, %	Метрологічні характеристики (n = 5; P = 0,95)					
			∑	SD	RSD, %	∑ _{x²}	Δ _∑	ε, %
А.О. Васильєвої (водою, підкисленою кислотою сульфатною)	2000	33,4	31,6	3,181	10,1	1,422	3,0	9,6
		35,7						
		31,7						
		27,6						
		29,5						
Стаса-Отто (етанолом, підкисленим кислотою оксалатною)	2000	26,2	25,6	3,090	12,1	1,382	2,9	11,5
		29,8						
		21,3						
		24,5						
		26,3						
В.П. Крамаренка (водою, підкисленою кислотою оксалатною)	2000	24,1	26,8	2,904	10,8	1,299	2,8	10,4
		28,5						
		30,5						
		23,7						
		27,3						
І. Шпедзінські (підкисленим ацетонітрилом)	2000	45,5	48,2	2,623	5,4	1,173	2,5	5,2
		48,6						
		51,6						
		50,4						
		46,2						
В.А. Каргашова (ацетоном)	500*	28,8	28,1	2,204	7,8	0,986	2,1	7,5
		26,6						
		31,4						
		25,7						
		27,9						

Встановлено межу виявлення та межу кількісного визначення УФ-спектрофотометричного методу визначення атомоксетину в біологічному матеріалі після пробопідготовки елююванням хлороформом на основі величин світлопоглинання «холостих» дослідів, які становили $6,2 \text{ мкг}\cdot\text{г}^{-1}$ та $11,4 \text{ мкг}\cdot\text{г}^{-1}$ відповідно.

Межі виявлення та кількісного визначення атомоксетину в біологічному матеріалі з використанням методу ВЕРХ-УФД після вказаної пробопідготовки становили, відповідно, $10 \text{ мкг}\cdot\text{г}^{-1}$ та $25 \text{ мкг}\cdot\text{г}^{-1}$, що відповідає очікуваному вмісту антидепресанту в тканинах печінки при летальних отруєннях.

На рис. 3 наведено хроматограму елюату, що містив атомоксетин, та хроматограму «холостого» дослідів (маса модельної проби печінки 5 г).

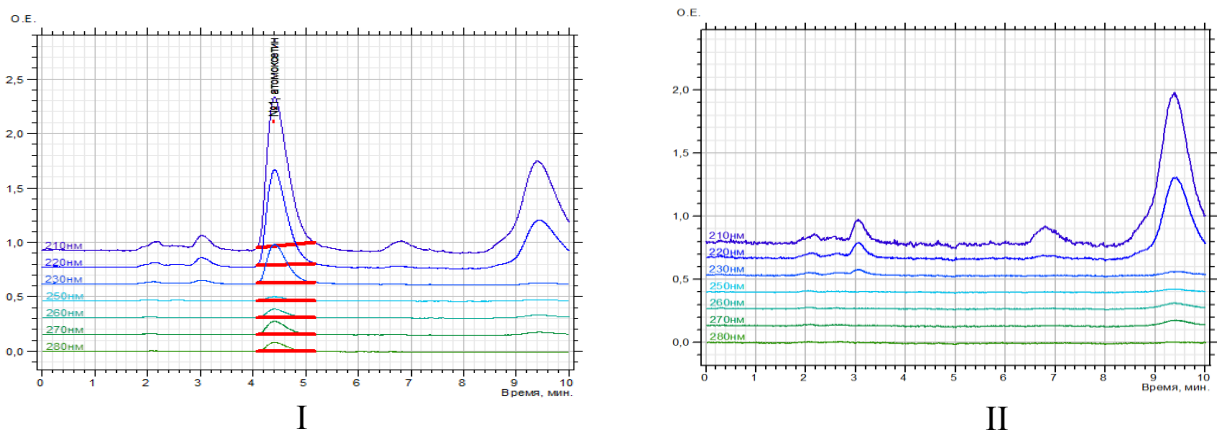


Рис. 3 Хроматограма елюату при ізолюванні атомоксетину хлороформом з модельної проби печінки, що містила 250 мкг препарату (I), хроматограма «холостого» дослідів (II)

Розроблено методики виділення атомоксетину з крові та сечі методом рідинно-рідинної екстракції. Ізолювання препарату з біологічних рідин проводили екстракцією хлороформом при рН 11–12 в присутності амоній сульфату як висолювача. Пробопідготовка додатково включала екстракційну та ТШХ-очистку. Формені елементи крові осаджували за допомогою кислоти трихлорацетатної. Біологічні домішки екстрагували діетиловим етером з кислого середовища при рН 1–2.

Кількісне визначення атомоксетину в екстрактах з крові проводили методами УФ-спектрофотометрії та ВЕРХ-УФД, ступінь ізолювання препарату складав $35,8 \pm 1,7 \%$ та $32,7 \pm 3,3 \%$ відповідно. Межі виявлення та кількісного визначення атомоксетину в біологічному матеріалі УФ-спектрофотометричним методом, розраховані на основі величин світлопоглинання «холостих» дослідів, становили $5,8 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$ та $8,9 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$ відповідно. Межа виявлення ($S/N \geq 3:1$) та межа кількісного визначення ($S/N \geq 10:1$) атомоксетину в крові методом ВЕРХ-УФД становили, відповідно, $5 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$ та $10 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$, що відповідало літературним даним стосовно очікуваних летальних концентрацій препарату в указаній біологічній рідині.

Вивчено умови детектування атомоксетину в екстрактах з крові для застосування при проведенні токсикологічного скринінгу методом ГХ-МС. Ідентифікацію досліджуваного антидепресанту проводили на основі сполучення часу утримування (RT) досліджуваної речовини та МС-спектра її хроматографічного

піку. Характеристичні фрагментні іони m/z 44, 148 та 255 (молекулярний іон) для атомоксетину спостерігали при дослідженні модельних проб крові (10 мл), що містили 200 та 100 мкг препарату (рис. 4). Таким чином, при проведенні скринінгу методом ГХ-МС найнижча концентрація атомоксетину в крові, яку можливо ідентифікувати, складала $10 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$.

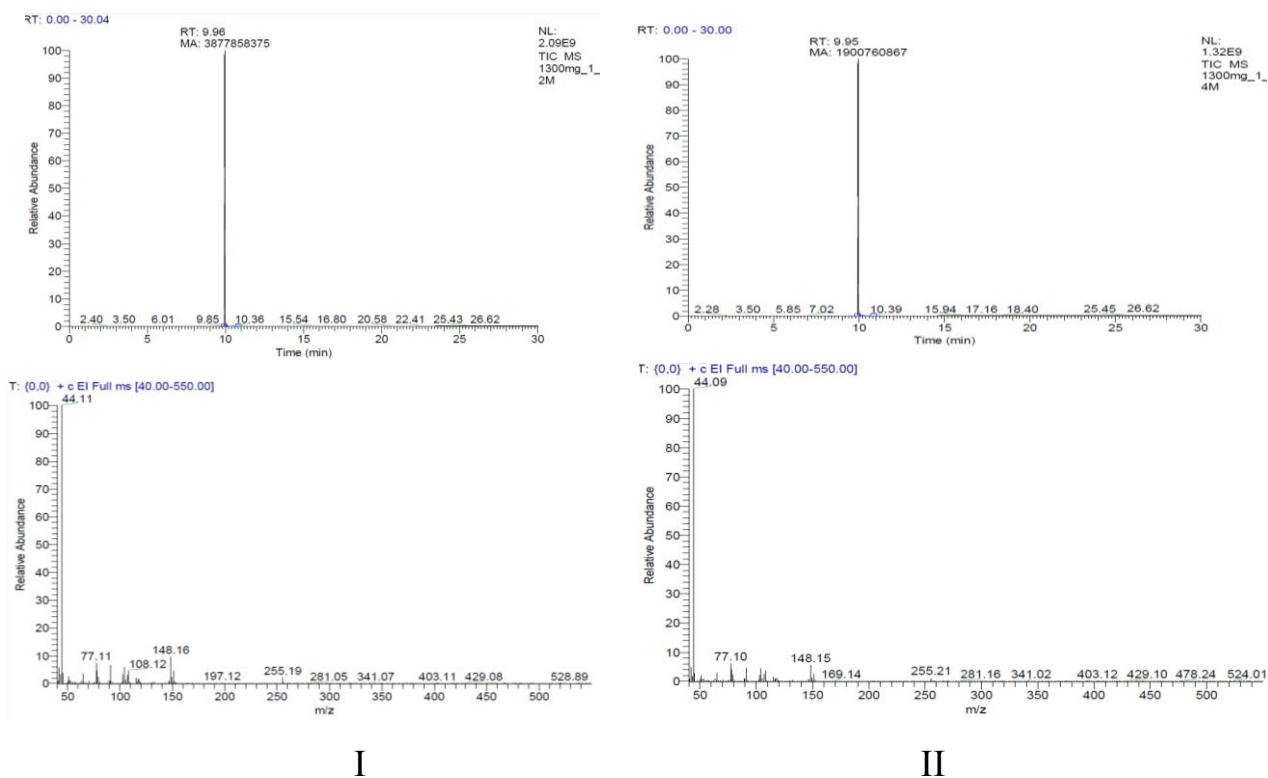


Рис. 4. Хроматограма та мас-спектр хроматографічного піку модельних проб крові (кінцевий об'єм екстракту 100 мкл), що містили 200 мкг препарату (I), 100 мкг препарату (II)

Кількісне визначення атомоксетину в екстрактах з крові проводили методом ГХ-ПД. Значення RT атомоксетину, виділеного з крові, становило 10,325–10,335 хв, що співпадало з RT антидепресанту в стандартному розчині у межах похибки визначення вказаного параметру утримування ($\pm 2\%$). Величини LOD ($S/N \geq 3$) (рис. 5) та LOQ ($S/N \geq 10$) (рис. 6) становили, відповідно, $1,0 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ та $5 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$. Об'єм проб крові в дослідженні становив 10 мл.

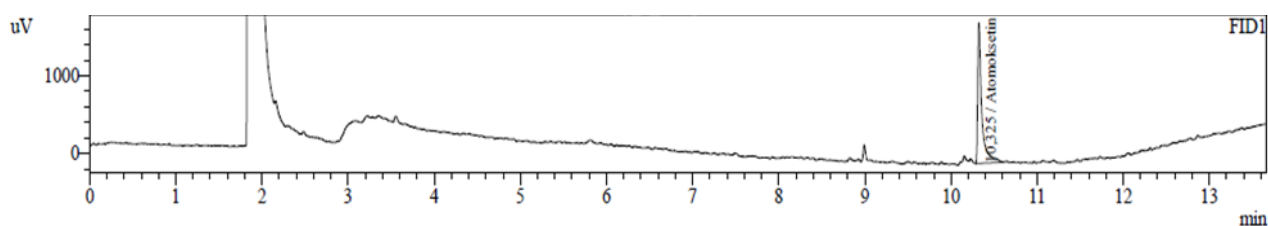


Рис. 5 Хроматограма модельних проб крові (кінцевий об'єм екстракту 1,0 мл), що містили 50 мкг препарату, при дослідженні методом ГХ-ПД

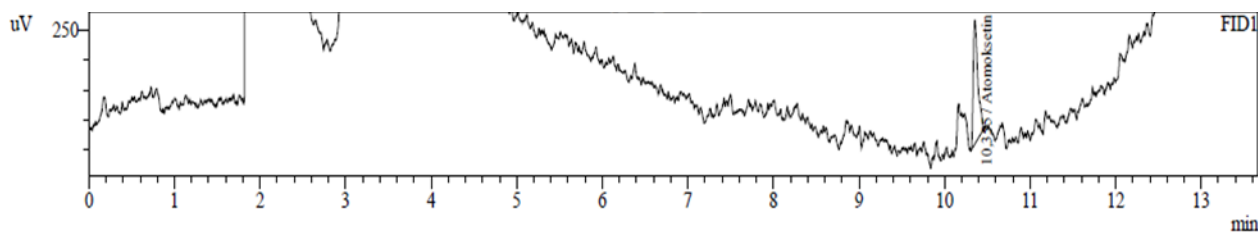


Рис. 6 Хроматограма модельних проб крові (кінцевий об'єм екстракту 1,0 мл), що містили 10,0 мкг препарату, при дослідженні методом ГХ-ПД

Розроблено методику ізолювання атомоксетину з сечі за допомогою рідинно-рідинної екстракції (умови наведено вище), яка дозволила виділити 69,3 % досліджуваного антидепресанту. Кількісне визначення атомоксетину в екстрактах з сечі проводили методом УФ-спектрофотометрії. Межі виявлення та кількісного визначення розробленої методики, розраховані на основі величин світлопоглинання «хлостих» дослідів, становили $0,9 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$ та $2,7 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$, відповідно. Об'єм проб сечі в дослідженні становив 20 мл.

Досліджено розподіл атомоксетину в органах отруєних тварин. Встановлено, що при введенні лабораторним тваринам середньосмертельної дози атомоксетину найбільша кількість препарату міститься в шлунку та кишечнику із вмістом, серці, печінці, легенях та нирках. Зазначені вище органи можуть бути рекомендовані як об'єкти судово-токсикологічного дослідження на наявність атомоксетину.

Досліджено умови зберігання атомоксетину в біологічному матеріалі при його гнилісному розкладанні. В екстрактах з біологічного матеріалу, що піддався гнилісним змінам, виявлення препарату проводили методом ТШХ. Кількісне виявлення атомоксетину виконували екстракційно-спектрофотометричним методом за реакцією з метиловим оранжевим. Показано, що при зберіганні біологічного об'єкту протягом 4 місяців можливо виділити до 15 % атомоксетину.

Дослідження продуктів біотрансформації атомоксетину методами тонкошарової хроматографії та мас-спектрометрії

Дослідження щодо встановлення умов виявлення атомоксетину та його метаболітів проводили з сечею при надходженні до організму терапевтичної дози атомоксетину. Зразки біологічної рідини збирали, враховуючи дані джерел літератури стосовно фармакокінетичних параметрів досліджуваного антидепресанту. Ізолювання нативної сполуки та метаболітів атомоксетину виконували методом рідинно-рідинної екстракції після попереднього руйнування кон'югатів шляхом кислотного гідролізу, якому піддавали проби сечі.

Ідентифікували атомоксетин та його метаболіти, виділені з сечі, методом мас-спектрометрії при іонізації електронним ударом. В отриманих екстрактах було виявлено нативну сполуку, його основний та мінорний метаболіти. На рис. 7 наведено мас-спектр субстанції атомоксетину-основи. Спостерігали основні іони m/z 44, 148 та молекулярний іон m/z 255 (збіжність з базою мас-спектрів NIST 08 складала 87–89 %), що відповідало літературним даним з мас-спектрометричного аналізу атомоксетину.

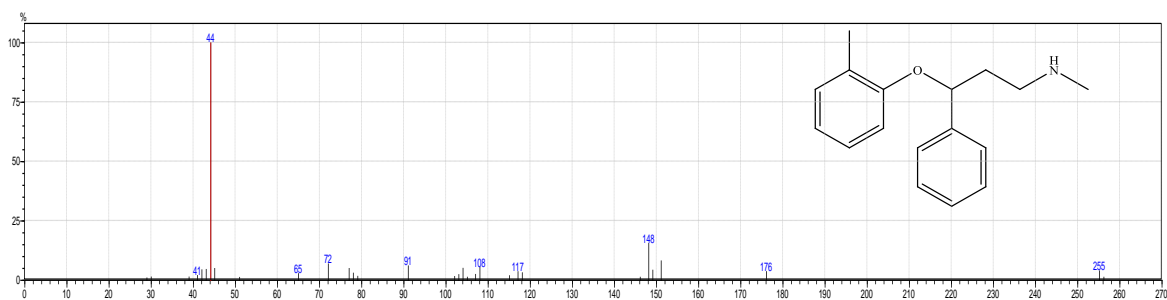
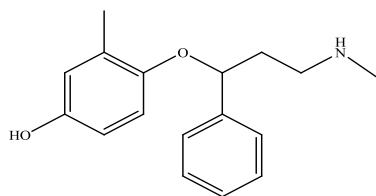
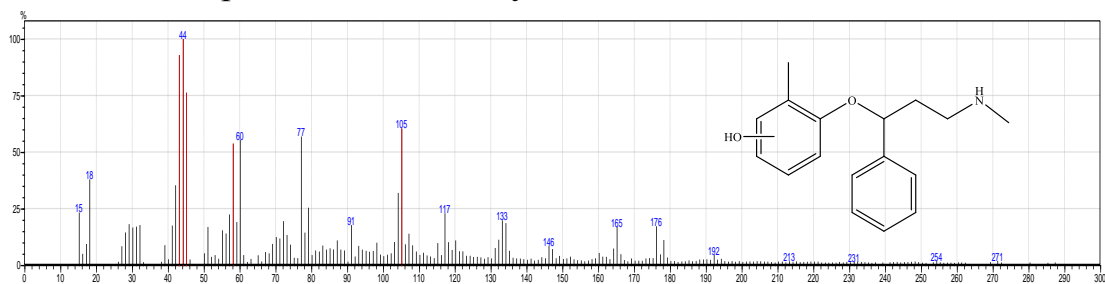


Рис. 7. Мас-спектр субстанції атомоксетину-основи (основні іони m/z 44, 148, 255)

Ідентифікацію метаболітів атомоксетину проводили за молекулярними масами, які визначали за положенням молекулярного піку в мас-спектрах. На рис. 8 наведено мас-спектр основного метаболіту атомоксетину (М 1) – гідроксиатомоксетину, при цьому основні іони спостерігали при m/z 44, 146 та молекулярні іони m/z 254 і 271, відповідно, для нативної сполуки та гідроксиатомоксетину, що узгоджується з літературними даними, згідно з якими передбачувана структура основного метаболіту М 1 відповідає 4-гідроксиатомоксетину.



4-гідроксиатомоксетин (М 1)

Рис. 8. Мас-спектр метаболіту М 1 – гідроксиатомоксетину (основні іони m/z 44, 105, 77, 60, 117, 133, 91, 176, 165, 146, 192, 213, 231, 254, 271) та передбачувана структура метаболіту М 1

Мас-спектр міnorного метаболіту (М 2) – дігідроксиатомоксетину, для якого основні іони спостерігали при m/z 44, 146 та молекулярні іони при m/z 254, 271 і 287, відповідно, для нативної сполуки, а також для гідроксиатомоксетину та дігідроксиатомоксетину (рис. 9).

Визначені параметри хроматографічної рухливості атомоксетину та його метаболітів у скринінгових ТШХ-системах (табл. 3). Встановлено забарвлення продуктів взаємодії метаболітів атомоксетину з хромогенними реактивами.

Розроблена методика ТШХ-скринінгу атомоксетину в сечі у присутності його метаболітів дозволяє рекомендувати сумісне застосування трьох малокорелюючих рухомих фаз з числа рекомендованих ТІАФТ № 4, 7 та 8 (або 6), а також р.ф.: №12 (15), 13 (17) та 16 з використанням хроматографічних пластин Сорбфіл та Мерк, які найчастіше використовуються при проведенні ТШХ-скринінгу наркотичних та психотропних речовин.

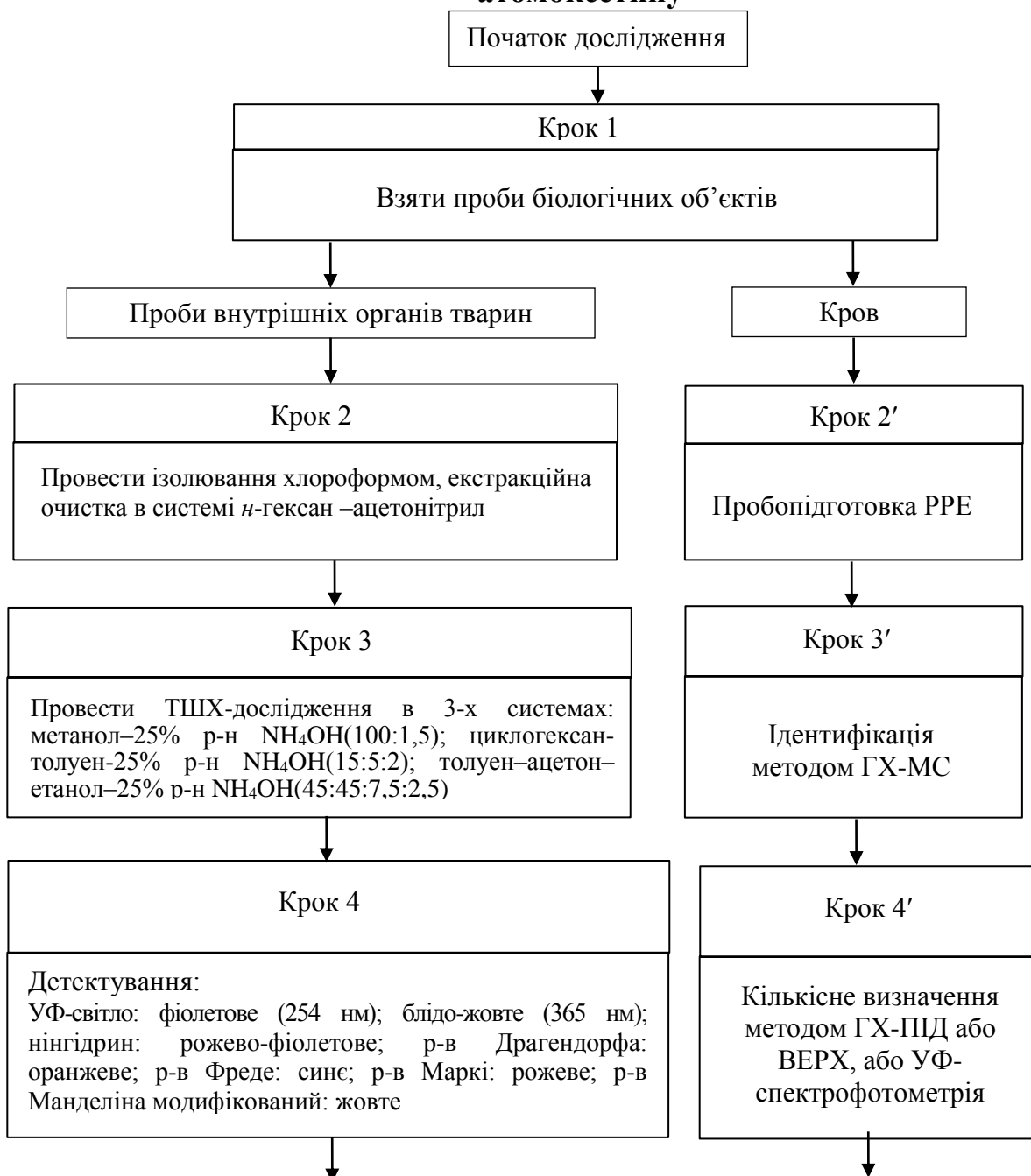
Найбільш характерні забарвлення метаболіти атомоксетину утворювали з реактивами Фреде, Лібермана, Ердмана, Маркі та H_2SO_4 (конц.).

Алгоритм проведення токсикологічного дослідження біологічних об'єктів на вміст атомоксетину

Розроблений алгоритм проведення токсикологічного дослідження біологічних об'єктів на вміст атомоксетину відображено у вигляді схеми дослідження проб внутрішніх органів та крові на вміст вказаного токсиканту, який передбачає виявлення та визначення його в умовах неспрямованого судово-токсикологічного дослідження (схема 1), та схеми токсикологічного дослідження сечі на вміст атомоксетину та продуктів його біотрансформації (схема 2).

Схема 1

Схема судово-токсикологічного дослідження біологічного матеріалу на вміст атомоксетину



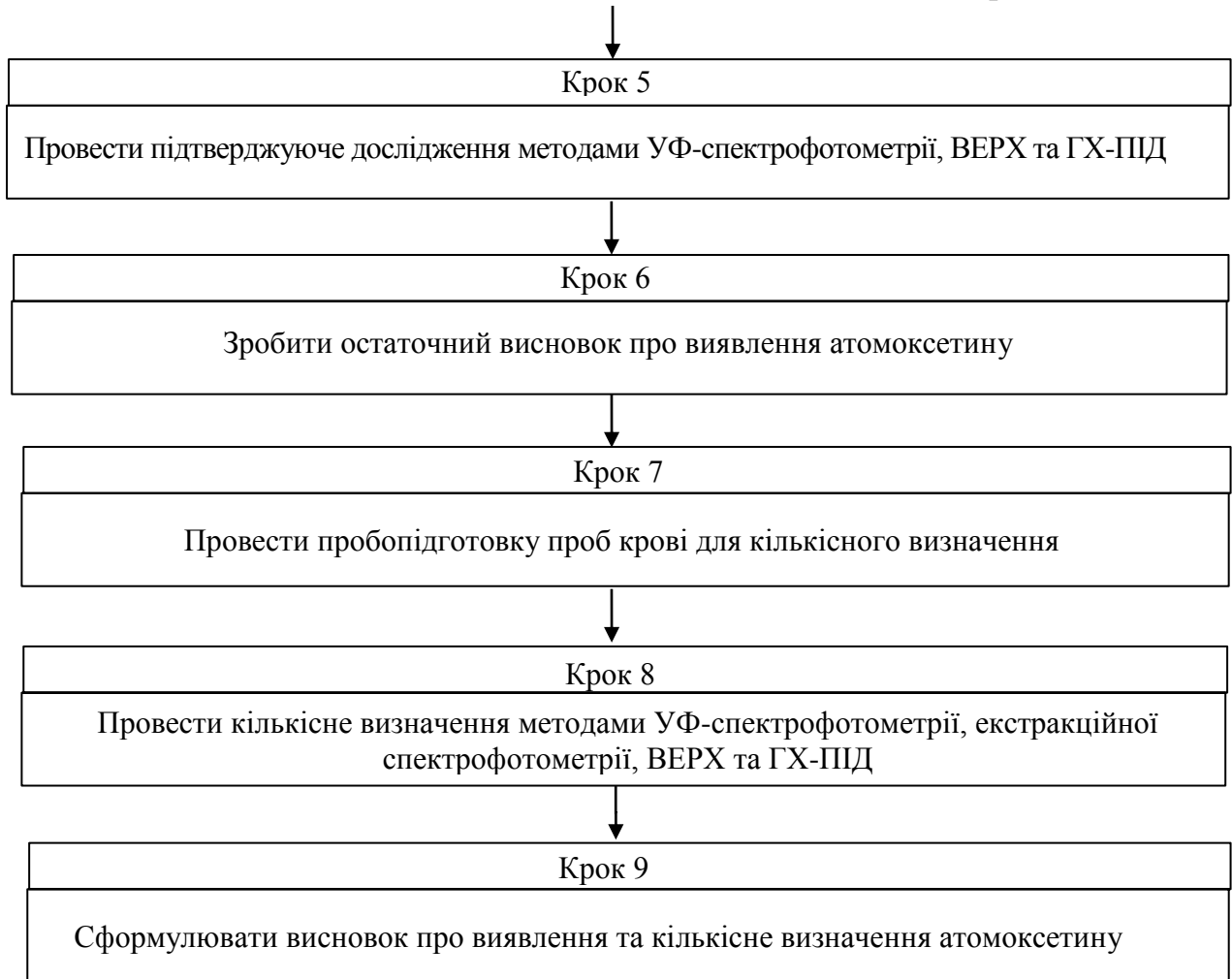
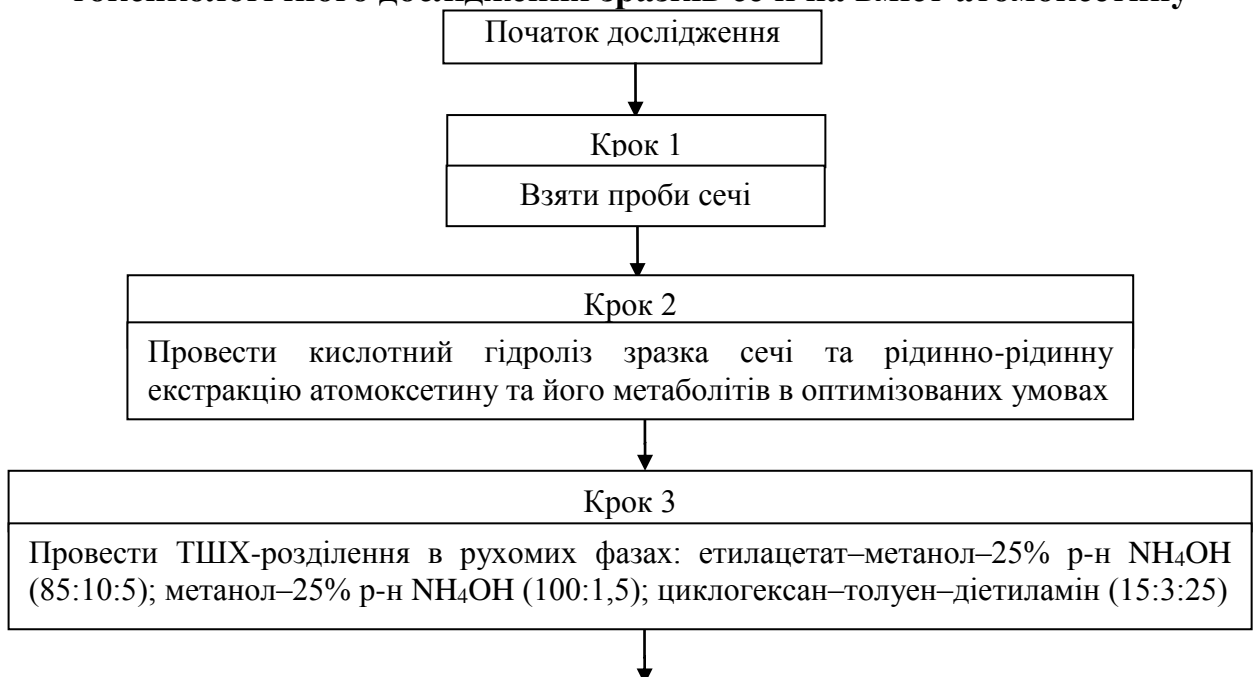
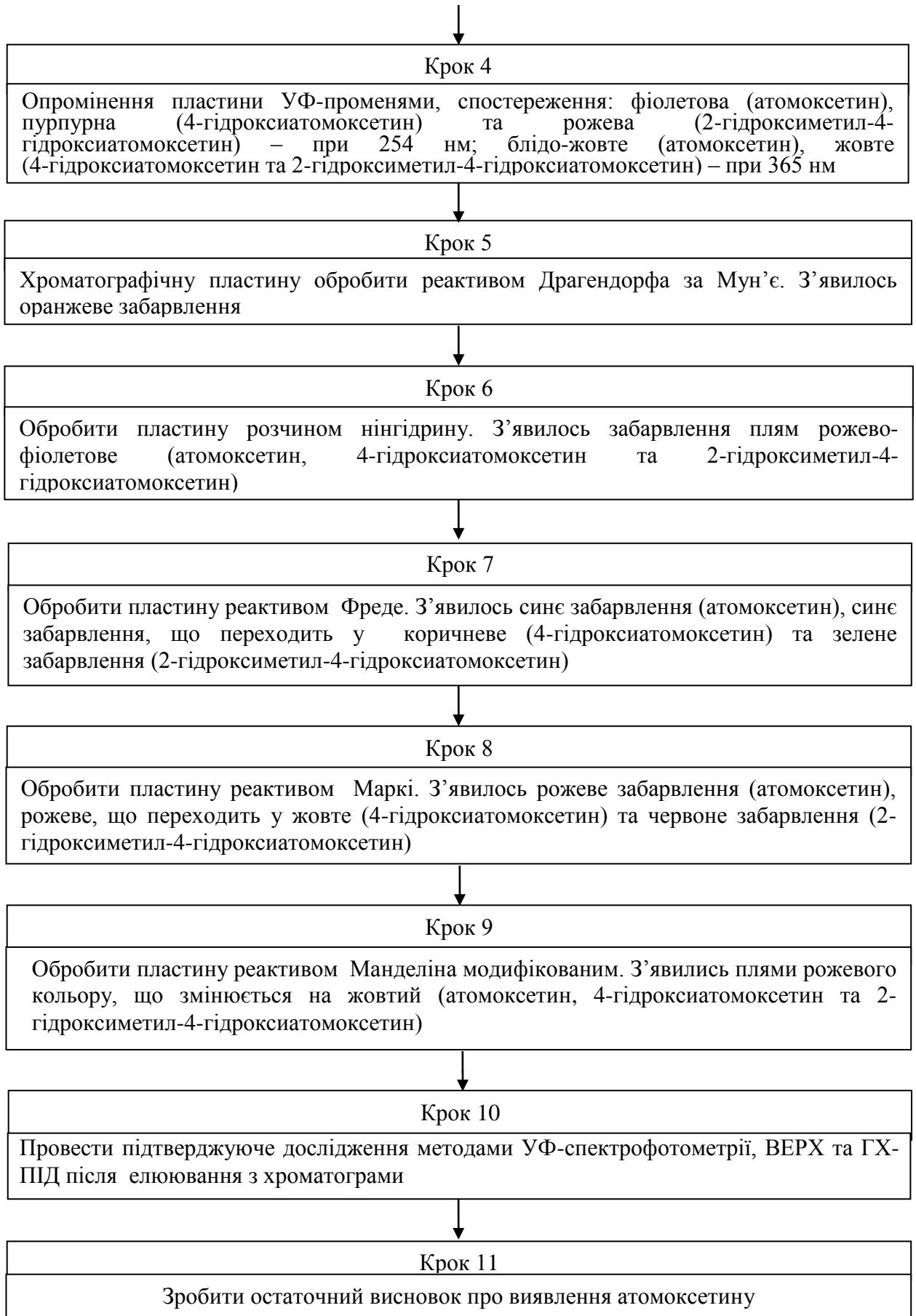


Схема 2

**Схема
токсикологічного дослідження зразків сечі на вміст атомоксетину**





Представлені схеми рекомендовано для використання при проведенні судово-токсикологічних досліджень об'єктів біологічного походження на присутність атомоксетину.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі представлено теоретичне обґрунтування та практичне рішення наукової проблеми створення системного підходу до розробки методів хіміко-токсикологічного аналізу атомоксетину – препарату, що застосовується при лікуванні СДУГ, урахуванням його фізико-хімічних властивостей та токсикокінетичних характеристик, а також розробки алгоритму проведення хіміко-токсикологічного дослідження біологічних об'єктів на вміст атомоксетину та продуктів його біотрансформації з використанням методів аналітичної діагностики отруєнь препаратів психотропної дії, які придатні для використання у вітчизняній практиці судово-токсикологічної експертизи та в клінічній токсикології.

1. Визначено ступінь ізолювання атомоксетину з біологічного матеріалу загальними методами виділення лікарських речовин з використанням розчинників з гідрофільними та амфифільними властивостями. Встановлено, що загальні методи є малоефективними для виділення атомоксетину, ступінь ізолювання знаходився в межах 25 – 48 %. Показано, що низька ефективність ізолювання атомоксетину пов'язана з його ліпофільними властивостями, що обумовлює ускладнену екстракцію препарату з біологічних тканин та викликає суттєві втрати на етапі екстракційної очистки екстрактів в системі водна фаза – органічний екстрагент. Встановлено ефективність ізолювання атомоксетину з біологічного матеріалу шляхом його елюювання ліпофільним розчинником хлороформом з наступною екстракційною очисткою витяжок у системі неводних розчинників *n*-гексан – ацетонітрил. Ефективність методу стосовно атомоксетину склала 70 %, що відповідає підвищенню ступеню ізолювання препарату відносно до загальноприйнятих методів у 1,5 – 2,5 рази.

2. Розроблено оптимальні умови виділення атомоксетину з модельних проб крові та сечі з використанням методу рідинно-рідинної екстракції з урахуванням попереднього вивчення ефективності його екстрагування в залежності від природи органічного розчинника та рН водної фази. Ступінь ізолювання атомоксетину з крові та сечі складав 35, 8% та 69,3% відповідно, що задовольняє вимогам до хіміко-токсикологічних досліджень.

3. Вивчено умови екстракції атомоксетину з водних розчинів у залежності від природи органічного розчинника, рН водного середовища, природи висолювача та запропоновано ефективні методики екстракційної очистки біологічних витягів. Встановлено, що найбільш ефективним екстрагентом препарату є хлороформ при рН 12 водної фази у присутності амоній сульфату (ступінь екстракції складав 88,9 %). Найнижчий ступінь екстракції (0,2 %) атомоксетину відповідав діетиловому етеру при рН 1-2 водного розчину, що дозволило запропонувати вказані умови для екстракційної очистки біологічних витягів від ендогенних домішок. Підібрано оптимальні рухомі фази, що дозволили розділити атомоксетин та співекстрактивні ендогенні речовини на хроматографічній пластині, та запропоновано ефективну методику ТШХ-очистки екстрактів з біологічних об'єктів.

4. Розроблено умови ТШХ-скринінгу атомоксетину в присутності його фармакологічних аналогів. Встановлено параметри хроматографічної рухливості атомоксетину та ряду антидепресантів, що можуть використовуватися з ним сумісно, в рухомих фазах, запропонованих Міжнародною асоціацією судових токсикологів для систематичного токсикологічного скринінгу наркотичних та психотропних речовин, а також у ряді інших рухомих фаз, які використовуються при систематичному токсикологічному скринінгу. Встановлено результати реакцій забарвлення атомоксетину та ряду його фармакологічних аналогів з хромогенними реактивами, що рекомендовані для виявлення основних груп психотропних та наркотичних речовин при проведенні токсикологічного скринінгу. За результатами візуалізації встановлено послідовність використання хромогенних реактивів при проведенні підтверджуючого етапу токсикологічного скринінгу.

5. Розроблено ефективну методику виявлення атомоксетину та продуктів його метаболічних перетворень в сечі методом ТШХ з попереднім руйнуванням кон'югатів проведенням кислотного гідролізу. Встановлено параметри хроматографічної рухливості основного та міnorного метаболітів атомоксетину у ряді скринінгових ТШХ-систем. Встановлено забарвлення метаболітів атомоксетину з рядом хромогенних реактивів, що використовуються при проведенні токсикологічного скринінгу. Ідентифіковано основний та міnorний метаболіти атомоксетину, екстраговані з сечі, методом мас-спектрометрії. Виявлення основного метаболіту – 4-гідроксиатомоксетину та міnorного – 2-гідроксиметил-4-гідроксиатомоксетину узгоджується з літературними даними стосовно напрямків метаболічних перетворень зазначеного антидепресанту в умовах живого організму.

6. Розроблено методики ідентифікації та кількісного визначення атомоксетину в біологічному матеріалі та біологічних рідинах методами УФ-спектрофотометрії, екстракційної спектрофотометрії у видимій області спектра за реакціями з метиловим оранжевим та азобарвником – похідним теofilідину, ВЕРХ-УФД, ГХ-МС та ГХ-ПД. Придатність методик для використання у судовій та клінічній токсикології підтверджено рядом валідаційних параметрів: діапазоном лінійності, межами виявлення та кількісного визначення, селективністю, правильністю та прецизійністю.

7. Досліджено розподіл атомоксетину в органах і тканинах отруєних лабораторних тварин. Встановлено, що при пероральному надходженні середньосмертельної разової дози атомоксетин в найбільших кількостях розподіляється у вмісту шлунка та кишечника, серці, печінці, легенях та нирках.

8. Вивчено умови зберігальності атомоксетину в біологічному матеріалі, що піддався гнилісним змінам. Встановлено, що через чотири місяці з модельних проб печінки можливо виділити до 15 % атомоксетину.

9. Розроблено алгоритм дослідження проб внутрішніх органів та крові на присутність атомоксетину, який дозволяє виявити вказаний токсикант в умовах неспрямованого судово-токсикологічного дослідження та провести їх ідентифікацію в присутності деяких його фармакологічних аналогів. Розроблено схему токсикологічного дослідження сечі на присутність атомоксетину та його метаболітів, згідно з якою можна визначити терапевтичні, токсичні й летальні

концентрації атомоксетину та продуктів його біотрансформації. Схему рекомендовано використовувати для проведення судово-токсикологічної та наркологічної експертизи при дослідженні сечі на вміст психотропних речовин.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Tomarovska, L. Yu., Baiurka, S. V., Karpushyna, S. A. Development of the methods for atomoxetine identification suitable for the chemical and toxicological analysis. *Visnik Farmacii*. 2017. Vol. 90 №2. P. 13–20. (Особистий внесок: виконання експериментальних досліджень, обробка й узагальнення результатів, участь у написанні статті).
 2. Tomarovska, L. Yu., Baiurka, S. V., Karpushyna, S. A. Development of the UV-spectrophotometric and extractionspectrophotometric methods of the atomoxetine quantitative determination suitable for the chemical and toxicological analysis. *Visnik Farmacii*. 2017. Vol. 4, № 92. P. 15 – 19. (Особистий внесок: виконання експериментальних досліджень, обробка результатів, участь у написанні статті).
 3. Томаровська Л. Ю., Баюрка С. В., Карпушина С. А. Розробка умов аналітичної діагностики отруєнь атомоксетином. *Клінічна фармація*. 2019. № 1 (23). С. 37–43. (Особистий внесок: виконання експериментальних досліджень, обробка й узагальнення результатів, участь у написанні статті).
 4. Томаровская Л. Ю., Баюрка С. В., Карпушина С. А. Разработка биоаналитической методики определения атомоксетина методом ВЭЖХ. *Фармація Казахстана*. 2019. № 2. С.17–20. (Особистий внесок: виконання експериментальних досліджень, обробка й узагальнення результатів, участь у написанні статті).
 5. Томаровская Л. Ю., Баюрка С. В., Карпушина С. А. Изолирование атомоксетина из биологического материала амфифильными растворителями. *Вестник фармации*. 2019. № 1 (83). С. 85–91. (Особистий внесок: виконання експериментальних досліджень, обробка й узагальнення результатів, участь у написанні статті).
 6. Томаровская Л. Ю., Баюрка С. В., Карпушина С. А. Изучение распределения атомоксетина в тканях и органах крыс. *Вестник Южно-Казахстанской медицинской академии*. 2019. № 4 (88). С. 43–46. (Особистий внесок: виконання експерименту, обробка й узагальнення результатів, участь у написанні статті).
 7. Томаровская Л. Ю., Карпушина С. А., Баюрка С. В., Космина Н. Н., Ахмедов Э. Ю. Разработка условий определения атомоксетина для целей химико-токсикологического анализа. *Азербайджанский фармацевтический и фармакотерапевтический журнал*. 2019. № 2. С. 33-37. (Особистий внесок: виконання експериментальних досліджень, обробка й узагальнення результатів, участь у написанні статті).
 8. Liudmila Yu. Tomarovska, Sergii V. Baiurka, Svetlana A. Karpushina Study of Solvent extraction of Atomoxetine from Aqueous solutions and Biological fluids. *Research J. Pharm. and Tech*. 2020. Vol. 13(9). 4303-4309. www.rjptonline.org 0974-360X (Online) RESEARCH ARTICLE. (Особистий внесок: виконання експериментальних досліджень, обробка й узагальнення результатів, участь у написанні статті).
- Результати досліджень представлені також в 12 тезах, які наведено в дисертації.

АНОТАЦІЯ

Томаровська Л.Ю. Хіміко-токсикологічне дослідження атомoksetину. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія. – Національний фармацевтичний університет, Харків, 2021.

Дисертаційна робота присвячена розробці алгоритму проведення токсикологічного дослідження біологічного матеріалу та біологічних рідин на присутність атомoksetину, придатного для використання в судово-токсикологічній експертизі та клінічній токсикології.

Визначено ступінь ізолювання атомoksetину з біологічного матеріалу загальноприйнятими методами. Розроблено метод ізолювання атомoksetину хлороформом з подальшою екстракційною очисткою у системі *n*-гексан – ацетонітрил. Встановлено оптимальні умови виділення атомoksetину з крові та сечі методом рідинно-рідинної екстракції. Розроблено методики ідентифікації та кількісного визначення атомoksetину в біологічних об'єктах методами ВЕРХ-УФД, ГХ-МС та ГХ-ПІД, УФ-спектрофотометрії та екстракційної спектрофотометрії у видимій області спектра з азобарвниками метиловим оранжевим та похідним теофілідину. Вперше розроблено умови виявлення атомoksetину та його метаболітів в сечі методом ТШХ. Проведено ідентифікацію метаболітів атомoksetину, виділених з сечі, методом мас-спектрометрії.

Ключові слова: атомoksetин, біологічний матеріал, біологічні рідини, ізолювання, ТШХ, ВЕРХ-УФД, ГХ-МС, ГХ-ПІД, УФ-спектрофотометрія, екстракційна спектрофотометрія, мас-спектрометрія, метаболіти.

АННОТАЦИЯ

Томаровская Л. Ю. Химико-токсикологическое исследование атомoksetина. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия. – Национальный фармацевтический университет, Харьков, 2021.

Диссертационная работа посвящена разработке алгоритма проведения токсикологического исследования биологического материала и биологических жидкостей на присутствие атомoksetина, пригодного для использования в судебно-токсикологической экспертизе и клинической токсикологии.

Определена степень изолирования атомoksetина из биологического материала общепринятыми методами. Разработан метод изолирования атомoksetина хлороформом с последующей экстракционной очисткой в системе *n*-гексан – ацетонитрил. Установлены оптимальные условия выделения атомoksetина из крови и мочи методом жидкостно-жидкостной экстракции. Разработаны методики идентификации и количественного определения атомoksetина в биологических объектах методами ВЭЖХ-УФД, ГХ-МС и ГХ-ПІД, УФ-спектрофотометрии и экстракционной спектрофотометрии в видимой области спектра с азокрасителями метиловым оранжевым и производным теофилидина. Впервые разработаны условия обнаружения атомoksetина и продуктов его биотрансформации в моче методом

ТСХ. Проведена идентификация метаболитов атомоксетина, выделенных из мочи, методом масс-спектрометрии.

Ключевые слова: атомоксетин, биологический материал, биологические жидкости, изолирование, ТСХ, ВЭЖХ-УФД, ГХ-МС, ГХ-ПИД, УФ-спектрофотометрия, экстракционная спектрофотометрия, масс-спектрометрия, метаболиты.

SUMMARY

Tomarovska L. Yu. Chemical-toxicological research of Atomoxetine. – A manuscript. Thesis for a Candidate of Pharmaceutical Science degree in the specialty 15.00.02 – Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy. – National University of Pharmacy, Kharkiv, 2021.

The dissertation deals with the problems of creating an algorithm for conducting toxicological research on the content of atomoxetine in biological material and biological fluids, which will be suitable for use in forensic toxicological examination and clinical toxicology.

The problem of prevalence of attention deficit hyperactivity disorder, which is treated with Atomoxetine, is considered. The mechanism of the drug action, the pharmacological properties, side effects, manifestations of the toxic action and causes of poisoning are given.

The parameters of the chromatographic mobility of Atomoxetine and some of its pharmacological analogs (Melipramine, Doxepin, Fluoxetine, Fluvoxamine, Amitriptyline and Venlafaxine) have been determined in thin layers of the sorbent using mobile phases recommended by TIAFT for the general TLC-screening, as well as some other ones that are widely used in the practice of chemical and toxicological studies of basic medicinal substances. The chromatographic mobility has been determined on five types of chromatographic plates.

The possibility of Atomoxetine detection in the urine by the products of its metabolic transformations using thin layer chromatography has been studied. The chromatographic mobility of two Atomoxetine metabolites in TLC screening systems, as well as staining of the main and minor metabolites of the antidepressant with a number of chromogenic reagents have been determined.

The degree of isolation of atomoxetine from biological material by conventional methods has been determined. Taking into account the lipophilic properties of atomoxetine, a method for its isolation by chloroform was developed, with subsequent extraction purification in the *n*-hexane-acetonitrile system. The quantitative determination of the drug in extracts from the blood was performed by UV spectrophotometry, HPLC-UV and GC-FID, in extracts from the urine – by the UV spectrophotometric method. Under the conditions proposed the degree of Atomoxetine isolation from the blood and urine was 35.8% and 69.3%, respectively.

The study of the conditions of Atomoxetine extracting from aqueous solutions by organic solvents depending on the pH medium. Chloroform in the alkaline medium (pH 12), in the presence of sodium sulfate as a salting-out agent, has been shown to be the optimal extractant for the extraction of Atomoxetine. The lowest values of the degree of

Atomoxetine extraction were at pH 1 – 2 when using 1,2-dichloroethane, benzene and diethyl ether (the degree of extraction for the latter was equal to 0.2 – 1.6 %) as extragents. Methods for the identification and quantitative determination of atomoxetine in biological objects by methods of HPLC-UVD, GC-MS and GC-FID, UV spectrophotometry and extraction spectrophotometry in the visible spectrum with azole dyes and orange theodolite are developed. The simultaneous use of three mobile phases: methanol – 25 % solution of ammonium hydroxide (100:1.5), cyclohexane – toluene – diethylamine (75:15:10), toluene – acetone – ethanol – 25 % ammonium hydroxide solution (45:45:7.5:2.5) can be considered the most appropriate to separate Atomoxetine from some of its analogs studied. Based on the studies conducted on the development of the procedure for Atomoxetine visualization in the TLC screening the use of the following sequence of chromogenic reagents has been proposed: UV-light, ninhydrin solution, Dragendorff's reagent, Fröhde reagent, Marquis reagent, modified Mandelin reagent.

Conditions for detection and identification of biotransformation products of this antidepressant in the human urine by TLC and mass spectrometry were established. Procedure of identification and the quantitative determination of Atomoxetine in the biological extracts using HPLC with multiwave spectrophotometric detection, UV spectrophotometry, extraction spectrophotometry in the visible region of the spectrum by the reaction with acid azo dyes, gas chromatography with flame ionization and mass spectrometric detection were developed. The highest selectivity of the UV-spectrophotometric method for determining Atomoxetine in the biological material in relation to matrix components was provided by chloroform isolation, the lowest one – by A. O. Vasilyeva method.

The storage of Atomoxetine in the biological material during its putrefactive decomposition has been studied depending on the shelf life. It has been shown that 15 % of Atomoxetine can be isolated from a putrefactive biological object in 4 months.

The possibility of detecting Atomoxetine in the urine by its biotransformation products was shown. The chromatographic mobility of the metabolites of Atomoxetine in screening TLC systems recommended by TIAFT have been determined. Based on the studies conducted the scheme for directed chemical and toxicological examination of the biological material and biological fluids on the presence of Atomoxetine has been developed.

Key words: atomoxetine, metabolites, biological material, isolation, TLC, HPLC with multiwave UVD, GC-MS, GC-FID, UV spectrophotometry, extraction spectrophotometry, mass spectrometry.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

TIAFT	– The International Association of Forensic Toxicologists
LOD	– Limit of detection
LOQ	– Limit of quantification
Log P (октанол/вода)	– коефіцієнт ліпофільності
R	– ступінь екстракції
R _f	– Rate of fraction
P.ф.	– рухома фаза
ТШХ	– тонкошарова хроматографія
УФ	– ультрафіолетовий (спектр)
УФД	– спектрофотометричне детектування за абсорбцією в ультрафіолетовій ділянці спектра
ВЕРХ	– високоефективна рідинна хроматографія
ВЕРХ – УФД	– високоефективна рідинна хроматографія з спектрофотометричним детектування за абсорбцією в ультрафіолетовій області спектра
ГХ-МС	– газова хроматографія з мас-селективним детектуванням
ГХ-ПД	– газова хроматографія з полум'яно-іонізаційним детектуванням
t _R	– Retention Time
V _d	– Volume of Distribution
VR	– Retention Volume
ТФЕ	– твердофазна екстракція

Підписано до друку 16.03.2021 р.
Формат 60x84/16 Ум.-друк. арк.