

УДК 615.214.32:543

DOI: 10.15587/2519-4852.2017.97922

ВИЗНАЧЕННЯ АГОМЕЛАТИНУ У СЕЧІ В ПРИСУТНОСТІ МЕТАБОЛІТІВ МЕТОДОМ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ ІЗ МАС-СПЕКТРОМЕТРИЧНИМ ДЕТЕКТУВАННЯМ (ГХ-МС)

© Н. М. Дармограй, І. Й. Галькевич

Мета дослідження: розробка та валідація методики кількісного визначення агомелатину в сечі в присутності його метаболітів за допомогою ГХ-МС.

Методи: Для виділення агомелатину із проб сечі проводили екстракцію хлороформом, після осадження сечових кислот кальцієм хлоридом. Ідентифікацію та кількісне визначення виділеного агомелатину проводили за допомогою хроматографа Agilent 6890 N із мас-спектрометричним детектором 5978 BMSD (Agilent technologies, USA). Розділення компонентів відбувалось на колонці Restek Rtx-5 (USA) із 5 % фенілсилоксану у метилсилоксані (30м×0,25мм;0,25мкм). Газ-носієм – гелій. Мас-детекцію виконували при електронній іонізації 70 eV і вольтажі 400 В. Сканування виконувалось в режимі Scan в межах 50-550 а.о.м.

Результати: Розроблена методика визначення агомелатину була валідована в лінійному діапазоні концентрацій агомелатину 40-6000 нг/мл з коефіцієнтом кореляції 0,99975. Метод є правильним та відтворюваним за всіма параметрами згідно вимог OECD/WHO з належної лабораторної практики та рекомендацій FDA, EMA і МОЗ України.

Висновки: Запропонованим методом можна виявити 15 нг та кількісно визначити 40 нг агомелатину в 1 мл сечі. Сумарний вміст виявлених метаболітів відносно концентрації агомелатину становив близько 35,0 %. Розроблений метод характеризується простотою виконання, точністю та відтворюваністю і може бути застосований при хіміко-токсикологічних дослідженнях агомелатину

Ключові слова: агомелатин, сеча, антидепресант, ідентифікація, кількісне визначення, екстракція, метаболіт, ГХ/МС, стандартний розчин, валідація

1. Вступ

Агомелатин – сучасний антидепресант із фармакотерапевтичної групи психоаналептики (інші антидепресанти, АТС-код N06AX22) [1]. За хімічною будовою це N-[2-(7-метоксинафтален-1-іл)етил]ацетамід (рис. 1).

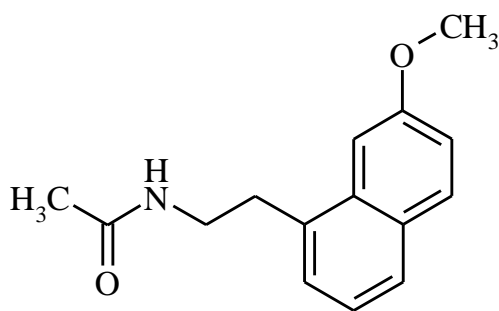


Рис. 1. Структурна формула агомелатину

У фармакологічному відношенні агомелатин проявляє антипсихотичний, антидепресивний та анксиолітичний ефекти, що дозволяє призначати його для фармакотерапії депресивних та біполярних розладів [2].

Агомелатин стимулює рецептори мелатоніну (MT1 та MT2) та блокує серотонінові 5-HT_{2C}-рецептори. Препарат не проявляє спорідненості до адренергічних, гістамінергічних, холінергічних, дофамінергічних та бензодіазепінових рецепторів [3].

Для лікування великого депресивного розладу у дорослих агомелатин призначають в дозі 25–50 мг на добу [4].

Після перорального прийому агомелатин швидко всмоктується в шлунково-кишковому тракті (до 80 %), до 95 % введеної кількості цього препарату зв'язується з білками крові. З організму агомелатин виводиться переважно з сечею (до 80 %) та у вигляді метаболітів. Період піввиведення агомелатину становить 1–2 год. [5, 6].

Метаболізм агомелатину відбувається за участю цитохрому P450 1A2 (90 %) та CYP2C9/19 (10 %). Основні шляхи метаболізму агомелатину – це 3-гідрокислювання, 7-деметилування та окислення [7, 8].

Крім безперечного терапевтичного ефекту при прийомі великої дози агомелатину спостерігаються побічні та токсичні ефекти [9], які іноді стають причиною смертельних отруєнь, особливо серед осіб похилого віку [10] та осіб з порушеною функцією печінки та серцево-судинними захворюваннями [11], за рахунок кардіо- та гепатотоксичної дії цього препарату [12].

2. Постановка проблеми у загальному вигляді, актуальність теми та її зв'язок із важливими науковими чи практичними питаннями

При передозуванні агомелатину спостерігаються токсичні прояви, в ряді випадків – летальні. Токсичність агомелатину посилюється при одночасному прийомі з трициклічними антидепресантами та селективними інгібіторами зворотного захоплення серотоніну [13]. Актуальність даного дослідження полягала в розробці простої, точної та чутливої методики визначення агомелатину в присутності метаболітів у сечі.

3. Аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання даної проблеми і на які спирається автор

Більшість публікацій присвячені розробці методик визначення рівня концентрації агомелатину в крові та плазмі. В основному опрацьовані умови визначення агомелатину методами високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) та ультраефективної рідинної хроматографії (УЕРХ). Детекцію агомелатину в досліджуваних пробах проводять УФ-спектрофотометрично та мас-спектрометрично.

Ці методики характеризуються різною лінійністю та межею визначення в біологічному субстраті. За методикою ВЕРХ із УФ-детектуванням лінійність на градувальній кривій спостерігалась в межах концентрацій агомелатину 62,5–4000 нг/мл, межа виявлення агомелатину в плазмі щурів 0,33 нг/мл, межа кількісного визначення – 1 нг/мл [14]. Метод ВЕРХ-МС валідований в лінійному діапазоні концентрацій агомелатину в плазмі людини 0,05–8000 нг/мл [15]. Методом УЕРХ-МС можна виявляти та кількісно визначати в плазмі людини відповідно 15 та 50 нг/мл агомелатину, при цьому результати кількісного визначення були лінійними в діапазоні концентрацій агомелатину 50–800 нг/мл [16].

Ідентифікація метаболітів агомелатину в плазмі крові людини проводилась методом ВЕРХ-МС. Градувальні криві для агомелатину, 7-деметил-агомелатину та 3-гідроксіягомелатину в плазмі крові людини були лінійними в діапазоні концентрацій 0,0457–100 нг/мл, 0,1372–300 нг/мл та 0,4572–1000 нг/мл відповідно [17].

Ізолювання агомелатину та його метаболітів із плазми та крові проводиться із використанням рідинної екстракції за допомогою етилацетату та ацетонітрилу [15] та методом екстракції твердою фазою (ТФЕ) [16–18].

Основними недоліками описаних вище досліджень є багатостадійність етапів підготовки проб до аналізу та недостатня специфічність. Відсутні публікації щодо виявлення та визначення агомелатину в сечі методом ГХ-МС в присутності метаболітів.

4. Виділення невирішених раніше частин загальної проблеми, якій присвячена стаття

Рядом авторів описано методики визначення агомелатину методом ВЕРХ-МС переважно в плазмі. Проте для токсикологічної та патоморфологічної діагностики при гострих отруєннях для ідентифікації та кількісного визначення токсиканту доцільно використовувати сечу [19]. Використання з цією метою методу ГХ-МС дозволяє досягнути високої селективності та чутливості, а також можливості кількісного визначення сполук, присутніх у малих кількостях в біологічній матриці. Застосування мас-спектрометричного детектора дозволяє виявляти визначувані компоненти у багатокомпонентній матриці із вищою ймовірністю, оскільки за мас-спектром можна зробити висновок про молекулярну масу сполуки, її склад та структуру, а отже метод можна використовувати для визначення метаболітів агомелатину.

5. Формулювання цілей (завдання) статті

Підсумовуючи описані вище факти, основна ціль дослідження полягала в розробці та валідації методики ГХ-МС кількісного визначення агомелатину в сечі в присутності його метаболітів.

6. Виклад основного матеріалу дослідження (методів та об'єктів) з обґрунтуванням отриманих результатів

Експериментальна частина кількісного визначення агомелатину у сечі методом ГХ-МС, ідентифікація метаболітів агомелатину за мас-спектрами.

Реактиви:

Стандартний зразок агомелатину (Sigma-Aldrich) (вміст агомелатину $\geq 98\%$).

Розчинники, реактиви: метанол (HPLC grade, «Merck», Німеччина), хлороформ (HPLC grade, «Merck», Німеччина), кальцій хлорид (for analysis, $\geq 98,5\%$, «Merck», Німеччина), амонію гідроксид (25 % розчин, «Merck», Німеччина), амонію сульфат (for analysis Emsure, Merck, Німеччина). Для виготовлення розчинів реагентів використовували бідистильовану воду (Millipore, Austria).

Біологічна матриця – сеча щурів та сеча щурів, яким вводили парентерально агомелатин.

Інструментальний аналіз. Розробку умов ідентифікації та кількісного визначення агомелатину проводили на хроматографі Agilent 6890 N із мас-спектрометричним детектором 5978 BMSD (Agilent technologies, USA). Колонка капілярна Restek Rtx-5 (USA) із 5 % фенілсилоксану у метилсилоксані (30 м×0,25 мм; 0,25 мкм). Газ-носієй – гелій. Швидкість потоку газу-носія – 1,0 мл/хв. Початкова температура колонки 50 °С – 0,5 хв. Потім температуру підвищували зі швидкістю до 20 °С/хв до досягнення 280 °С/хв. Ізотермічний режим при 280 °С витримували впродовж 15 хв. Проби вводили в автоматичному режимі. Об'єм введеної проби – 1 мкл.

Мас-детекцію виконували при електронній іонізації 70 eV і вольтажі 400 В. Сканування виконувалось в режимі Scan в межах 40–550 m/z. Управління даними виконували за допомогою програмного забезпечення Agilent ChemStation (версія E.01.01.335). Обробку даних, отриманих після мас-спектрометричного аналізу, здійснювали з використанням бібліотек мас-спектрів (Nist 05, Wiley 7-th edition).

Для дослідження виготовляли основні стандартні розчини агомелатину в метанолі із концентраціями 20,0 мкг/мл (розчин А) та 100,0 мкг/мл (розчин Б). Для цього відповідну точну кількість чистого аналіту розчиняли в метанолі (HPLC grade). Для приготування робочих стандартних розчинів агомелатину в метанолі із концентраціями 40 нг/мл та 100 нг/мл за допомогою градувальної піпетки відміряли відповідно 10,0 мкл та 25,0 мкл основного стандартного розчину агомелатину із концентрацією 20,0 мкг/мл в колби на 5,0 мл і доводили метанолом до позначки. Для приготування робочих стандартних розчинів агомелатину в метанолі із концентраціями 500 нг/мл, 1000 нг/мл, 3000 нг/мл та 6000 нг/мл відміряли по 25,0 50,0, 150,0 та 300,0 мкл стандартного розчину агомелатину із концентрацією 100,0 мкг/мл в колби на 5,0 мл і дово-

дили метанолом до мітки. Одержані розчини зберігали при температурі від +2 °С до +8 °С. Стабільність стандартного та робочих стандартних розчинів була верифікована в процесі валідації методики.

Для проведення експериментальних досліджень використовували групу із двадцяти лабораторних щурів масою 230–250 г (10 щурів – досліджувана група і 10 щурів – контрольна група). Тварини в процесі дослідження отримували їжу і мали вільний доступ до води.

Протягом трьох днів збирали добову сечу щурів контрольної групи. Цю сечу об'єднували і зберігали при +4 °С.

Досліджувана група щурів отримувала агомелатин із розрахунку 100 мкг/г (за три прийоми). Для цього готували водний розчин шляхом розчинення 1 таблетки агомелатину (25 мг) в 10 мл дистильованої води. Відповідний об'єм цього розчину вводили тваринам перорально через зонд у три прийоми. Інтервал між повторними введеннями препарату – 4 год. Вибір дози для моделювання гострого отруєння обумовлений даними літератури [20]. Сечу збирали протягом першої доби після введення препарату. Об'єм добової сечі становив в середньому 12–16 мл. Протягом всього дослідження сечу зберігали при +4 °С.

Із кожної порції добової сечі щурів, які отримували агомелатин, відбирали по 5,0 мл біологічної рідини. В проби вносили по 1,0 мл 20 % розчину кальцію хлориду, і через 10 хв центрифугували (15 хв при 10000 об/хв). У центрифугати вносили 25 % розчин аміаку до рН 8. Значення рН контролювали потенціометрично за допомогою рН-метра моделі РН-200 (HM Digital, USA) з функцією автоматичної термокомпенсації.

Екстракцію агомелатину та його метаболітів проводили хлороформом. Об'єм хлороформу, взятий для одноразової екстракції, був вдвічі більшим за об'єм сечі, доведеної до рН 8,0. Тривалість екстракції – 20 хв.

Хлороформні розчини кількісно відокремлювали, випаровували досуха в потоці повітря і розчиняли в 5,0 мл метанолу. Дані розчини застосовували для ідентифікації та кількісного визначення агомелатину методом ГХ-МС.

Для ідентифікації та кількісного визначення агомелатину методом ГХ-МС використовували по 1,0 мл метанольних розчинів сухих залишків.

Ідентифікували агомелатин у пробах за часом утримування та мас-спектром, які порівнювали зі стандартним розчином агомелатину. Після запису хроматограм визначали площі піків агомелатину.

Вміст досліджуваного препарату в пробах сечі визначали за допомогою рівняння прямої регресії.

З метою проведення валідації методики кількісного визначення агомелатину у сечі методом ГХ-МС готували модельні суміші. З цієї метою в мірні колби ємністю 5,0 мл вносили відповідні об'єми робочих стандартних розчинів агомелатину в метанолі (розчин А чи розчин Б) з концентраціями 40, 100, 500, 1000, 3000 та 6000 нг/мл і довели чистою сечею щурів до позначки. Паралельно готували контрольні проби, які містили по 5,0 мл сечі.

Валідацію методики кількісного визначення агомелатину у сечі методом ГХ-МС проведено згідно вимог OECD/WHO з належної лабораторної практики [21] та згідно рекомендацій FDA [22], ЕМА [23] і МОЗ України [24, 25] за такими параметрами, як специфічність, лінійність, ефект матриці, правильність і прецизійність, відтворюваність і стабільність.

Специфічність. Для визначення специфічності досліджували 6 контрольних зразків сечі та зразки сечі, в які вносили робочі стандартні розчини у кількостях, що відповідають нижній межі кількісного визначення агомелатину (40 нг/мл), застосовуючи відповідну методологію виконання дослідження.

Лінійність методу вивчали на модельних сумішах в діапазоні концентрацій агомелатину від 40 до 6000 нг/мл. Межу виявлення визначали по 5-ти зразках модельних проб із співвідношенням сигнал-шум щонайменше 3:1. Межу кількісного визначення визначали як найнижчу концентрацію агомелатину, яка може бути точно виміряна, і визначається по 5-ти незалежних від цієї кривої зразках модельних сумішей.

Правильність і прецизійність (на рівні збіжності) методики оцінювали по ходу аналізу однієї серії та між серіями кожної із трьох проб сечі, в які вносили агомелатин у кількостях, які відповідали нижній межі кількісного визначення препарату – 40 нг, середній концентрації (що відповідає терапевтичному рівню в біологічній пробі) – 500 нг та верхньому рівню концентрації (що відповідає 3000 нг). Проби аналізували в три різні дні (зразки зберігали при 4 °С).

Ефект матриці – пряма або непряма зміна (інтерференція) у відгуку приладу через присутність інших речовин у зразку. Досліджували 6 зразків сечі, у які не вносили робочі стандартні розчини. Після підготовки проб у сухі залишки метанольних розчинів біологічних зразків вносили по 200 мкл стандартного розчину агомелатину з концентрацією 100 мкг/мл. Проводили запис хроматограм і визначали площі піків проб із внесеним стандартним розчином препарату та площу піку чистого стандартного розчину. Розраховували значення ефекту матриці шляхом відношення площі піку проби із внесеною сполукою після її підготовки до аналізу до площі піку стандартного розчину.

Короткотермінову та довготермінову *стабільність* агомелатину в біологічних пробах визначали на модельних сумішах із вмістом агомелатину 3000 нг/мл. Для цього зразки сечі із внесеним препаратом зберігали при –20 °С протягом 30, 60 та 150 днів. Після цього проби довели до кімнатної температури і витримували при кімнатній температурі 24 год., після чого проби аналізували. Для оцінки стабільності використовували 10 % критерій деградації.

Результати та їх обговорення. В наведених умовах газохроматографічного аналізу час утримування агомелатину становить $12,190 \pm 0,05$ хв та співпадає із часом утримування стандартного розчину агомелатину. Також співпадають мас-спектри агомелатину. При аналізі контрольних зразків сечі на хроматограмах були відсутні піки з часом утримування агомелатину та його метаболітів.

Хроматограми контрольної проби сечі та сечі щурів, які отримували агомелатин (рис. 2, 3).

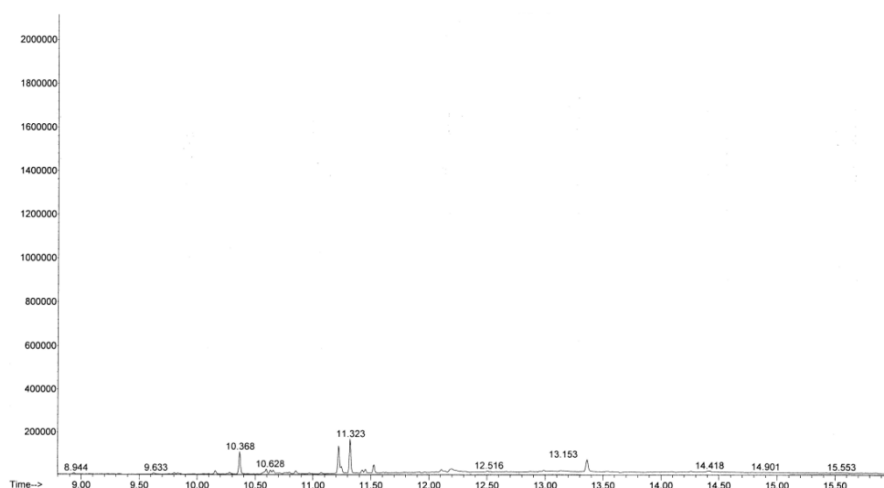


Рис. 2. Хроматограма контрольної проби сечі щура

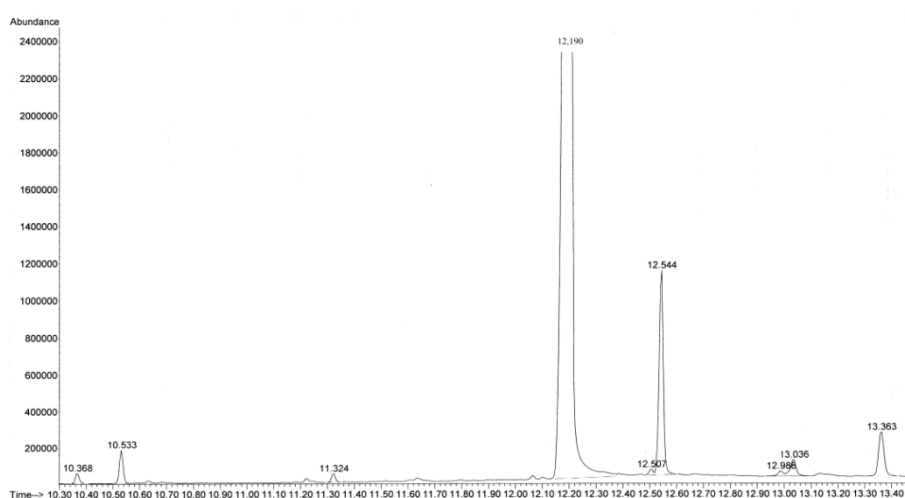


Рис. 3. Хроматограма проби сечі щура, який отримував агомелатин

Мас-спектр агомелатину, виділеного із сечі, відповідає мас-спектру стандартного зразку агомелатину. Для агомелатину на мас-спектрі характерними є сигнали із 184, 173, 128, **243**, 153, 169, 114, 142 та 102 m/z (рис. 4).

Порівнюючи результати хроматограм, та враховуючи особливості сигналів заряджених іонів відповідних сполук, на отриманих мас-спектрах у сечі ідентифіковано у сечі ідентифіковано ряд метаболітів агомелатину, які характерні II фазі біотрансформації.

У пробах сечі щурів, які отримували агомелатин, виявлено також чотири метаболіти цього препарату, час утримування яких відповідно становить $12,507 \pm 0,004$ хв, $12,542 \pm 0,004$ хв, $12,990 \pm 0,05$ хв та $13,135 \pm 0,02$ хв. При детальному аналізі мас-спектрів розшифрована будова цих метаболітів. Серед метаболітів виявлено деметилагомелатин, 3-гідроксиагомелатин, ацетильований деметилагомелатин та діацетильований 3-гідроксидеметилагомелатин (рис. 5).

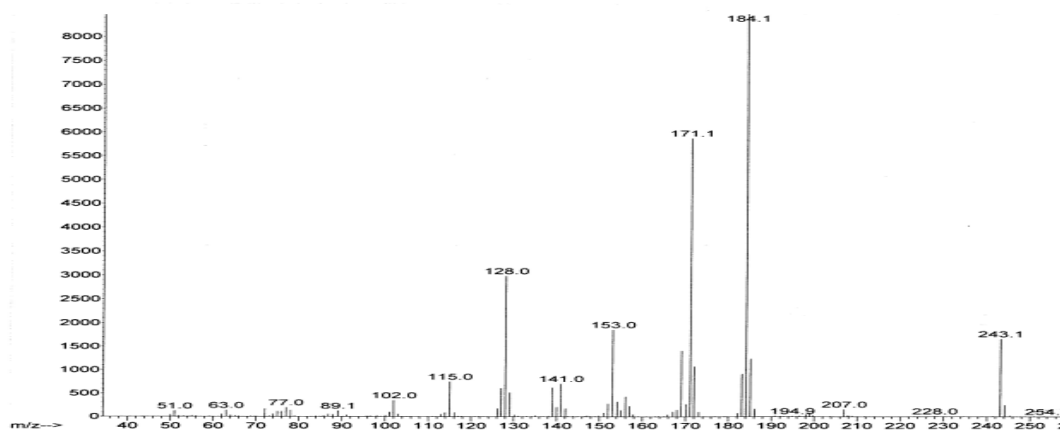
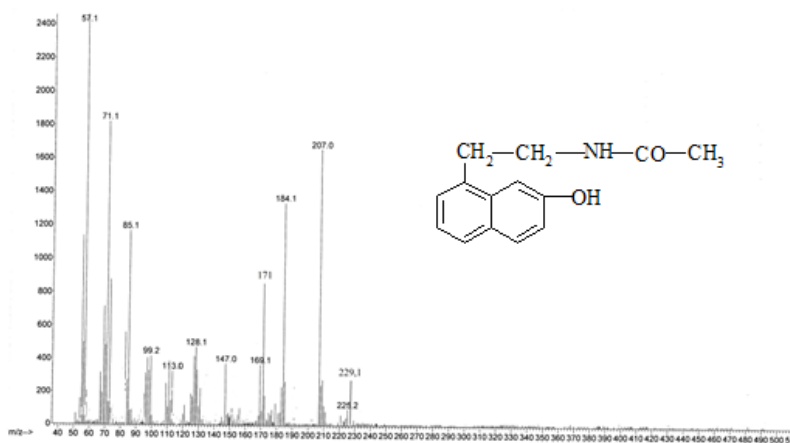
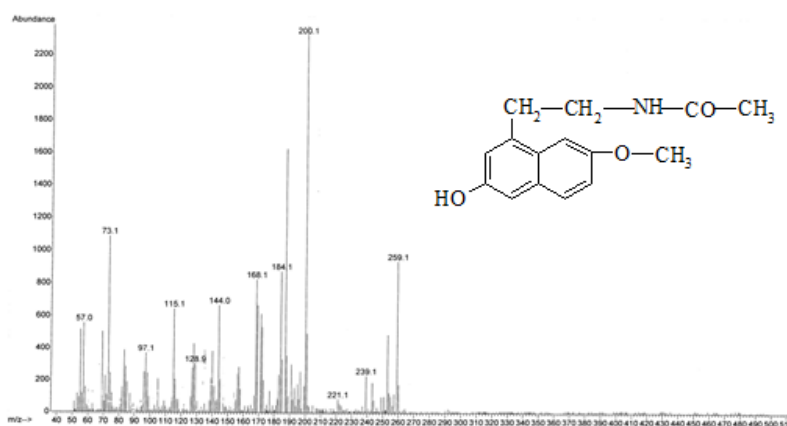


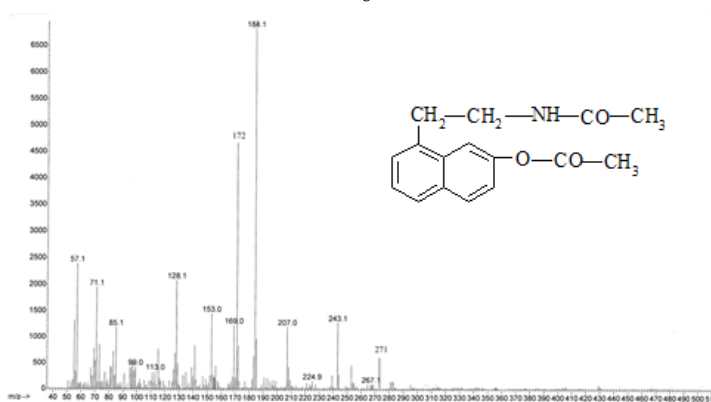
Рис. 4. Мас-спектр агомелатину, ізолюваного із сечі щурів



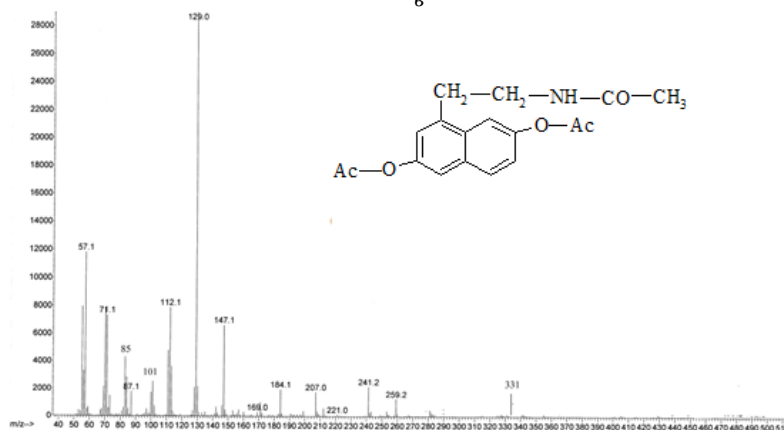
a



b



v



z

Рис. 5. Мас-спектри та структурні формули метаболітів агомелатину у сечі: a – деметилагомелатин; б – 3-гідроксіягомелатин; в – ацетильований деметилагомелатин; з – діацетильований 3-гідроксидеметилагомелатин

Для деметилагомелатину типовими є сигнали при 207, 71, 184, 85, 171, 128, 169, 147, 113 та **229** m/z ($t_R=12,990\pm 0,005$).

Характерними сигналами для 3-гідроксіягомелатину є m/z 200, 184, **259**, 168, 115, 144, 128, 239, 223 ($t_R=13,135\pm 0,002$).

Ацетильованому деметилагомелатину відповідає пік на хроматограмі із часом утримування $12,507\pm 0,004$ хв. Мас-спектру цього метаболіту властиві сигнали 184, 172, 128, 153, 169, 243, **271**, 225 та 256 m/z.

Хроматографічний пік із часом утримування $12,538\pm 0,002$ хв. відповідає діацетильованому 3-гід-

роксидеметилагомелатину. Для цього метаболіту характерними є сигнали із 129, 112, 147, 102, 184, 241, 259, **331**, 222 та 169 m/z.

При визначенні *специфічності* встановлено, що на хроматограмах контрольних проб не виписувались піки із часом утримування агомелатину ($t_R=12,190\pm 0,05$ хв).

Лінійність. Доведена лінійна залежність між співвідношенням концентрацій і площ хроматографічних піків агомелатину в інтервалі від 40 до 6000 нг/мл (рис. 6).

Параметри градувальної кривої для кількісного визначення агомелатину у сечі наведені в табл. 1.

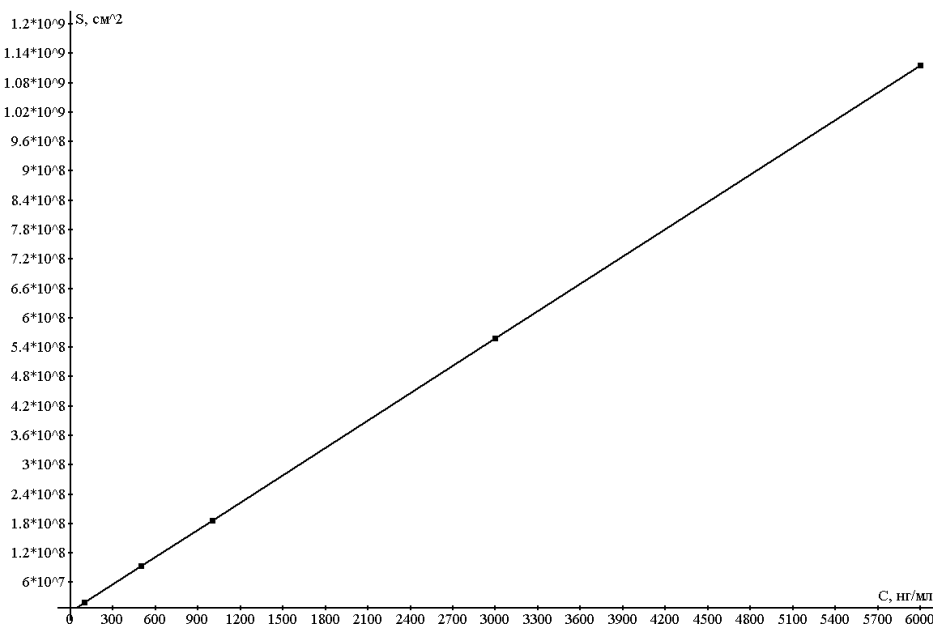


Рис. 6. Градувальна залежність визначення лінійності для агомелатину в пробах сечі методом ГХ-МС

Таблиця 1

Параметри градувальної кривої для кількісного визначення агомелатину у сечі

Діапазон концентрацій, нг/мл	Градувальна крива	Коефіцієнт кореляції, r	Межа виявлення, нг/мл	Межа кількісного визначення, нг/мл
40–6000	$y=1,89\times 10^6 X-2,06\times 10^7$	0,99975	15,0	40,0

Матричний ефект для 6 проб біологічного матеріалу в середньому становить $94,16\pm 2,8$. Коефіцієнт варіації матричного ефекту – 2,97 %. Згідно Рекомендацій FDA [22] коефіцієнт варіації матричного ефекту для 6 зразків сечі не повинен перевищувати 5 %. Отримані результати свідчать про відсутність значного впливу ендогенних компонентів сечі на ефективність іонізації агомелатину, і відповідно на кінцевий результат його кількісного визначення у сечі.

Результати вивчення *правильності та прецизійності* (на рівні збіжності) визначення агомелатину в сечі наведені в табл. 2.

Загалом метод є правильним та відтворюваним для повторних аналізів агомелатину за показниками внутрішньолабораторної та міжлабораторної прецизійності.

Ступінь відновлення екстракції ($n=6$) визначали шляхом розрахунку співвідношення кількості агомелатину, що виділяється із біологічної проби, до кількості, яку вносять в сухий залишок контрольної проби. В проби сечі вносили токсичні кількості агомелатину – 3000 нг/мл. При ГХ-МС визначенні ступінь виділення агомелатину – $93,24\pm 0,46$ %.

Результати визначення *стабільності* агомелатину при його зберіганні наведені в табл. 3.

Таблиця 2

Результати вивчення правильності та прецизійності (на рівні збіжності) визначення агомелатину в сечі у трьох серіях біологічної проби

Вміст агомелатину в 1 мл проби, нг	Визначено агомелатину в 1 мл проби, нг	RSD (в одній серії)	RSD (між серіями)	Правильність, RE %
40,0	39,86±0,39	1,39	1,58	-0,35
500,0	499,76±8,12	0,45	0,57	-0,05
3000,0	2994,7±71,75	0,28	0,42	-0,18

Таблиця 3

Результати визначення стабільності агомелатину при його зберіганні (n=3)

Стабільність	Концентрація препарату, нг	Виміряна концентрація препарату, нг	RSD, %	RE, %
30 днів при -20 °C	3000	3000,7±12,3	0,12	+0,02
60 днів при -20 °C	3000	3000,7±12,3	0,12	+0,02
150 днів при -20 °C	3000	3001,3±20,3	0,15	+0,04

Розчини агомелатину зберігали стабільність протягом 150 днів при зберіганні за температури -20 °C.

7. Висновки з проведеного дослідження і перспективи подальшого розвитку даного напрямку

Запропонована схема аналізу дозволяє визначати як терапевтичні, так і токсичні дози агомелатину, що дає можливість встановити точну концентрацію препарату при аналізі сечі з метою встановлення факту отруєння.

Запропонованим методом можна виділяти до 93,26±0,47 % агомелатину із сечі.

За допомогою методу ГХ-МС можна виявляти та кількісно визначати відповідно 15 нг/мл та 40 нг/мл агомелатину у сечі.

За мас-спектрами досліджено будову основних метаболітів агомелатину у сечі. Сумарний вміст виявлених метаболітів відносно концентрації агомелатину становив близько 35,0 % (18,3 % – диацетилдеметилагомелатин).

Оцінюючи валідаційні характеристики методики кількісного визначення агомелатину в пробах сечі методом ГХ-МС, можна зробити висновок, що вони повністю відповідають вимогам національних та міжнародних регламентуючих документів, а також показують низьку варіабельність таких показників, як ефект матриці, міжсерійна правильність та збіжність, ступінь вивільнення. Запропонований метод характеризується простотою виконання, точністю та відтворюваністю і може бути застосований при хіміко-токсикологічних дослідженнях агомелатину.

Література

- Michelle, N. L. Profile of agomelatine and its potential in the treatment of generalized anxiety disorder [Text] / N. L. Michele, M. Papellbaum, E. Nardi, A. // *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. – 2015. – Vol. 11. – P. 1149–1155. doi: 10.2147/ndt.s67470
- Woo, Y. S. Agomelatine: The Novel Antidepressant [Text] / Y. S. Woo, H. R. Wang, W. M. Bahk // *Korean Journal of Psychopharmacology*. – 2014. – Vol. 25, Issue 1. – P. 1–10.
- Llorca, P.-M. The antidepressant agomelatine improves the quality of life of depressed patients: implications for remission [Text] / P.-M. Llorca // *Journal of Psychopharmacology*. – 2010. – Vol. 24, Issue 2. – P. 21–26. doi: 10.1177/1359786810372978
- Loo, H. Determination of the dose of agomelatine, a melatoninergic agonist and selective 5-HT(2C) antagonist, in the treatment of major depressive disorder: a placebo-controlled dose range study [Text] / H. Loo, A. Hale, H. Dhaenen // *International Clinical Psychopharmacology*. – 2002. – Vol. 17, Issue 5. – P. 239–247. doi: 10.1097/00004850-200209000-00004
- Wang, X.-L. Inter- and Intra-individual Variability in the Pharmacokinetics of Agomelatine Tablets in Chinese Healthy Male Subjects [Text] / X.-L. Wang, A.-H. Du, D. Zhang, L.-J. Meng, M. Liu, L.-N. Zhang et. al. // *Drug Research*. – 2014. – Vol. 65, Issue 10. – P. 552–554. doi: 10.1055/s-0034-1394436
- Pei, Q. Evaluation of the Highly Variable Agomelatine Pharmacokinetics in Chinese Healthy Subjects to Support Bioequivalence Study [Text] / Q. Pei, Y. Wang, Z.-Y. Hu, S.-K. Liu, H.-Y. Tan, C.-X. Guo et. al. // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, Issue 10. – P. e109300. doi: 10.1371/journal.pone.0109300
- Australian Public Assessment Report for Agomelatine [Text]. – 2010. – P. 3–72. – Available at: <https://www.tga.gov.au/sites/default/files/auspar-valdoxan.pdf>
- Fornaro, M. A Systematic, Updated Review on the Antidepressant Agomelatine Focusing on its Melatonergic Modulation [Text] / M. Fornaro, D. Prestia, S. Colicchio, G. Perugi // *Current Neuropharmacology*. – 2010. – Vol. 8, Issue 3. – P. 287–304. doi: 10.2174/157015910792246227
- Cardinali, D. P. Agomelatine: Its Role in the Management of Major Depressive Disorder [Text] / D. P. Cardinali, M. F. Vidal, D. E. Vigo // *Clinical Medicine Insights: Psychiatry*. – 2012. – Vol. 4. – P. 1–23. doi: 10.4137/cmpsychy.s7989
- Freiesleben, S. D. A systematic review of agomelatine-induced liver injury [Text] / S. D. Freiesleben, K. Furczyk // *Journal of Molecular Psychiatry*. – 2015. – Vol. 3, Issue 1. – P. 4. doi: 10.1186/s40303-015-0011-7
- Stuhec, M. Agomelatine-induced hepatotoxicity [Text] / M. Stuhec // *Wiener klinische Wochenschrift*. – 2013. – Vol. 125, Issue 7-8. – P. 225–226. doi: 10.1007/s00508-013-0344-0
- Montastruc, F. Hepatotoxicity related to agomelatine and other new antidepressants [Text] / F. Montastruc, S. Scotto, I. R. Vaz, L. N. Guerra, A. Escudero, M. Sainz et. al. // *Journal of Clinical Psychopharmacology*. – 2014. – Vol. 34, Issue 3. – P. 327–330. doi: 10.1097/jcp.0000000000000094

13. Imboden, C. Agomelatine-Induced Akathisia with Concomitant Duloxetine Medication: A Case Report [Text] / C. Imboden, M. Hatzinger // Pharmacopsychiatry. – 2012. – Vol. 45, Issue 4. – P. 162–163. doi: 10.1055/s-0031-1297933
14. Janga, K. Y. Quantification of Agomelatine in Rat Plasma by Validated Bioanalytical Rapid RP-HPLC/UV Method [Text] / K. Y. Janga, S. Pasupunoot // Kakatiya Institute of Pharmaceutical Sciences. – 2013. – Vol. 45. – P. 215–221.
15. Patil, S. R. Validated LC-MS/MS method for quantification of agomelatine in human plasma and its application in a pharmacokinetic study [Text] / S. R. Patil, K. K. Nerurkar, A. M. Kalamkar, V. Pukale, K. V. Mangaonkar, S. G. Pingale // Journal of Mass Spectrometry. – 2012. – Vol. 47, Issue 1. – P. 23–28. doi: 10.1002/jms.2020
16. Rallis, G. N. Development and Validation of an UHPLC-UV method for the Determination of Agomelatine in Human Plasma and Serum Suitable for Routine Clinical Analysis [Text] / G. N. Rallis, P. Petrikis, V. A. Boumba // Annals of Chromatography and Separation Techniques. – 2016. – Vol. 2, Issue 2. – P. 1020–1026.
17. Li, M. Development and validation a LC-MS/MS method for the simultaneous determination of agomelatine and its metabolites, 7-desmethyl-agomelatine and 3-hydroxy-agomelatine in human plasma: Application to a bioequivalence study [Text] / M. Li, F. Tang, F. Xie, Y. Lv, P. Yu, Z. Liu, Z. Cheng // Journal of Chromatography B. – 2015. – Vol. 1003. – P. 60–66. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.09.018
18. Meghana, M. Development and Validation of Stability- Indicating RP-HPLC Method for the Estimation of Agomelatine in API [Text] / M. Meghana, T. Sridhar, R. K. K. Venisetty // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2014. – Vol. 5, Issue 1. – P. 621–628.
19. Improving Treatment for Drug-Exposed Infants. Appendix C – Urine toxicology Guidelines [Text]. – 1993. – 93 p.
20. Telles-Correia, D. Psychotropic drugs and liver disease: A critical review of pharmacokinetics and liver toxicity [Text] / D. Telles-Correia, A. Barbosa, H. Cortez-Pinto, C. Campos, N. B. Rocha, S. Machado // World journal of Gastrointestinal pharmacology and therapeutics. – 2017. – Vol. 8, Issue 1. – P. 26–38.
21. Guideline on bioanalytical method validation [Text]. – European Medicines Agency, 2011. – 23 p.
22. Guidance for Industry. Bioanalytical Methods validation. Food and Drug administration [Text]. – Center for Drug Evaluation and Research, 2001. – 25 p.
23. Good Laboratory Practice. OECD principles and guidance for compliance monitoring [Text]. – OECD, 2005. – 139 p.
24. Жукова, Н. А. Валидация биоаналитического метода [Текст]: метод. рек. / Н. А. Жукова, В. В. Либина, И. В. Кудрис, Н. Н. Падалко. – К., 2013. – 35 с.
25. Про затвердження документів з питань забезпечення якості лікарських засобів [Текст]. – Міністерство охорони здоров'я України, 2009. – № 95. – Режим доступу: <http://www.apteka.ua/article/242235>

*Рекомендовано до публікації д-р фарм. наук, професор Лесик Р. Б.
Дата надходження рукопису 19.01.2017*

Дармограй Наталя Миколаївна, аспірант, кафедра токсикологічної та аналітичної хімії, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, м. Львів, Україна, 79010
E-mail: snowfun@mail.ru

Галькевич Ірина Йосипівна, кандидат фармацевтичних наук, доцент, кафедра токсикологічної та аналітичної хімії, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, м. Львів, Україна, 79010
E-mail: galkirin@meduniv.lviv.ua