

И. К. Журкович¹, А. О. Руденко¹, В. В. Человечкова¹, И. А. Меркушева¹,
Н. В. Луговкина¹, Н. Г. Коэров¹, М. В. Пчелинцев², Е. В. Вербицкая²,
Э. Э. Звартау²

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БУПРЕНОРФИНА И НАЛОКСОНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

¹ ФГБУН "Институт токсикологии" ФМБА России, 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1;

² ГБОУ ВПО "Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И. П. Павлова" Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6 – 8.

Разработана методика определения бупренорфина и налоксона в плазме крови пациентов с применением жидкостной хроматографии в комбинации с масс-спектрометрией высокого разрешения (LC-MS Q-TOF). При подготовке проб использована жидкостная экстракция с высаливанием аналитов в пробирках Toxi-Tubes A, предназначенных для определения нейтральных и основных веществ. Количественный анализ проведен методом внутреннего стандарта, в качестве которого выбран налтрексон, структурно близкий к анализируемым соединениям. Методика предназначена для клинических испытаний нового препарата "Бупраксон" — сублингвальных таблеток, содержащих бупренорфин и налоксон в дозе по 0,2 мг. Изучена биодоступность компонентов препарата при сублингвальном введении и произведена сравнительная оценка концентраций бупренорфина в крови пациентов при двух способах введения (внутривенном и сублингвальном) в дозе 0,4 мг.

Ключевые слова: бупренорфин; налоксон; плазма крови; ВЭЖХ; масс-спектрометрия.

Бупренорфин (17-циклопропилметил)-7,8-дигидро-7-[(1S)-2-гидрокси-3,3-диметилбутил-2]-6-метокси-О-метил-6,17-этано-17-норморфин гидрохлорид) — полусинтетический опиоид (рис. 1), является сильным наркотическим анальгетиком [1]. Широко применяется в медицине в качестве обезболивающего средства. По обезболивающему эффекту бупренорфин примерно в 30 раз сильнее морфина и отличается низкой токсичностью и высокой длительностью действия [2].

При внутривенном введении действие бупренорфина начинается менее чем через 1 мин, и примерно через 15 мин — при внутримышечном [2].

Зависимость к препарату вырабатывается гораздо реже, чем к другим опиатным агонистам, даже при длительном употреблении. Однако высокие дозы бупренорфина могут вызывать отравление. Наиболее эффективным антидотом при отравлении опиоидами является налоксон — типичный антагонист опиоидных рецепторов — особенно при внутривенном и внутримышечном введении в дозе 10 – 15 мг [2].

Определение опиоидов в плазме крови или моче является весьма трудоемкой задачей и требует нестандартных подходов. В частности, определение интактных форм морфина и его производных, в том числе бупренорфина, затруднено быстрым метаболизмом, связанным с образованием глюкуронидов. Производные морфина активно метаболизируют в печени и кишечнике до 3-глюкоронида и, в меньшей степени, до 6-глюкоронида [3]. Процесс метаболизма существенно снижает уровни интактной формы бупренорфина и его аналогов в организме. В плазме крови и моче они составляют не более нескольких нг/мл. В ряде случаев из-за недостатка чувствительности исследователи прибегают к определению так называемого "общего"

содержания аналита (суммы интактной формы и конъюгатов) [3 – 5]. Однако данный подход неприемлем при изучении фармакокинетики. Другой путь — ферментативный гидролиз пробы с помощью глюкуронидазы. Эта операция существенно увеличивает время анализа и его погрешность.

До недавнего времени наиболее распространенным методом определения морфина и его аналогов в биологических жидкостях являлась ВЭЖХ с электрохимическим и ультрафиолетовым детектированием [3 – 8]. Электрохимическое детектирование с использованием хлорсеребряного электрода позволяет достичь достаточно низких пределов обнаружения аналитов (до 0,3 нг в пробе) и обладает неплохой селективностью [6, 8]. Недостатками этих методик является нестабильность хроматографических систем в целом и невозможность использования градиентного режима элюирования. Более универсальное спектрометрическое детектирование [3, 5] характеризуется ограниченной чувствительностью определения производных морфина. Реже при ВЭЖХ-анализе указанных соединений применяют флуоресцентное детектирование [4] или используют газожидкостную хроматографию. В

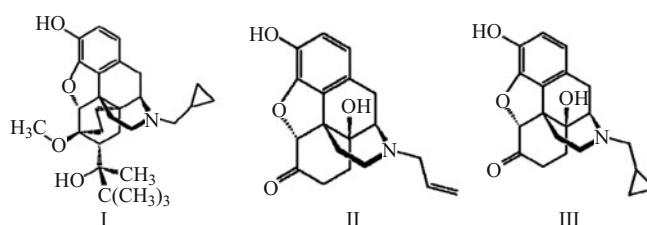


Рис. 1. Строение молекул: I — бупренорфин, II — налоксон и III — налтрексон.

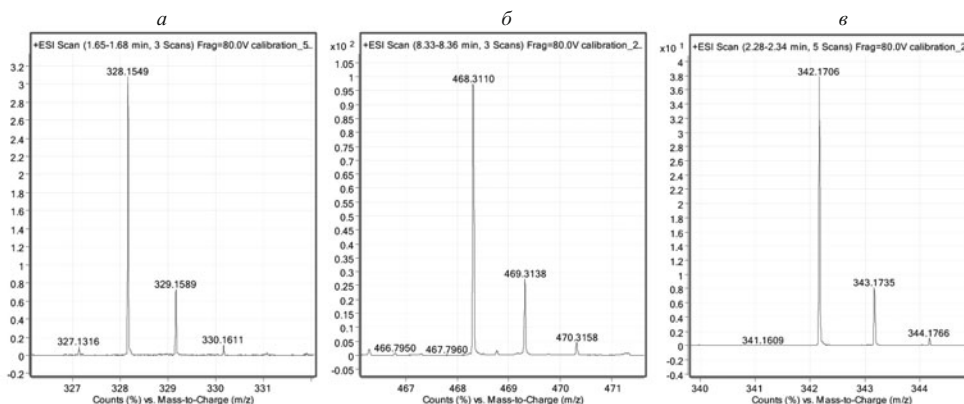


Рис. 2. Фрагменты масс-спектров анализируемых соединений: налоксон (а), бупренорфин (б), налтрексон (в).

последнем случае необходима дериватизация аналитов и наиболее предпочтительны детектор электронного захвата и масс-спектрометрический детектор [9, 10].

В настоящее время появилось немало работ, основанных на применении ВЭЖХ-масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI) [11 – 13]. Этот подход обеспечивает наиболее высокую чувствительность и селективность определения.

Дополнительное снижение пределов обнаружения производных морфина в биообразцах достигается выбором оптимальной стратегии подготовки проб. При этом в большинстве случаев используют твердофазную экстракцию на концентрирующих патронах типа Bond Elut, заполненных ионообменной смолой [4, 5].

Цель настоящего исследования — разработка методики определения бупренорфина и налоксона в плазме крови пациентов методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения и изучение хроноконцентрационных зависимостей, полученных для бупренорфина и налоксона при однократной внутривенной инъекции препарата бупранал, содержащего бупренорфин в дозе 0,4 мг/мл, и сублингвальном введении 2 таблеток препарата “Бупраксон”, содержащих налоксон и бупренорфин в дозе 0,4 мг.

Введение препаратов пациентам и отбор проб проводился сотрудниками Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова. Испытуемый препарат бупраксон произведен и предоставлен для исследования ФГУП “Московский эндокринный завод” (Москва).

Таблица 1

Режим хроматографического элюирования		
Время, мин	Состав подвижной фазы, %	
	А	В
0	5	95
8	80	20
10	80	20
12	5	95
22	5	95

Разрешение Минздрава № 234 на проведение клинических испытаний получено 04.07.2006 г. и продлено до 31.12.2012 г.

Экспериментальная часть

В клинических испытаниях принимали участие 12 пациентов. К исследованию привлекались пациенты, давшие информированное согласие, мужского и женского пола с болевым синдромом, лечившиеся в СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова и прошедшие клинико-физиологическое обследование.

Изучение фармакокинетики компонентов препаратов проводили в 2 стадии: сначала пациентам делали инъекцию бупранала (бупренорфина), а затем (через 48 ч) — давали 2 таблетки бупраксона. На каждом этапе пробы крови отбирали в гепаринизированные пробирки через интервалы, предусмотренные протоколом, центрифугировали при скорости 3000 об/мин в течение 15 мин. Отделенную плазму переносили в пробирки Эппендорфа и хранили до анализа при температуре – 40 °С.

Таблица 2

Состав градуировочных проб плазмы крови						
Раствор	Концентрация компонентов, нг/мл		Объем плазмы, мкл	Объем раствора внутреннего стандарта, мкл	Объем растворов для внесения, мкл	
	Налоксон	Бупренорфин			Налоксон	Бупренорфин
1 этап						
1 – 1		0	975	25		0
1 – 2		0,25	974	25		1,0
1 – 3		0,5	973	25		2,0
1 – 4		1,0	971	25		4,0
1 – 5		5,0	955	25		20,0
1 – 6		25,0	875	25		100,0
2 этап						
2 – 1	0	0	995	5	0	0
2 – 2	0,25	0,25	993	5	1,0	1,0
2 – 3	0,5	0,5	991	5	2,0	2,0
2 – 4	1,0	1,0	987	5	4,0	4,0
2 – 5	2,5	2,5	975	5	10,0	10,0
2 – 6	5,0	5,0	955	5	20,0	20,0

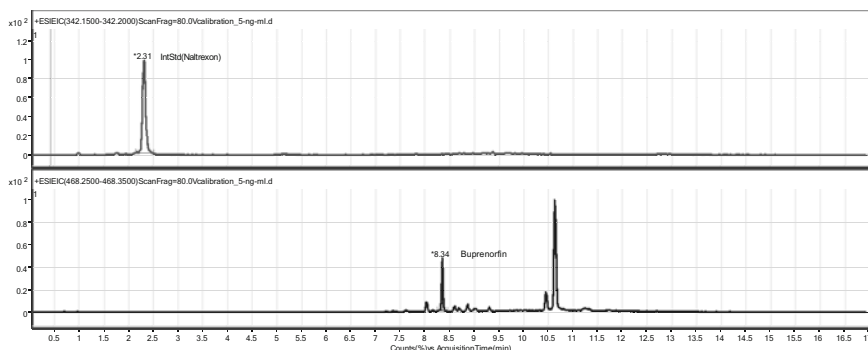


Рис. 3. Определение бупренорфина в плазме крови методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии при внутривенном введении.

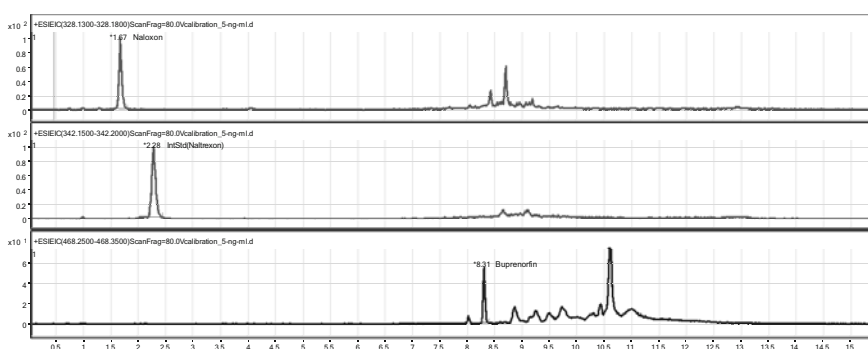


Рис. 4. Определение налоксона и бупренорфина в плазме крови методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии при сублингвальном введении.

В работе использовали деионизованную воду аналитической степени чистоты (не более 5 мкСим/см; Milli-Q^R Advantage A10, Millipore, Франция), ацетонитрил, ос.ч., сорт 0 (“Криохром”, Россия), муравьию кислоту (“Sigma”, США), а также в качестве стандартных образцов бупренорфина и налоксона препараты “Бупранал, раствор для инъекций 0,3 мг/мл” (сер. 10311, годен до 04.2013) и “Налоксон, раствор для инъекций 0,4 мг/мл” (сер. 02Bz0908, годен до 09.2012) соответственно. В качестве внутреннего стандарта была взята фармакопейная субстанция налтрексона — N-циклопропилметил-14-оксинордигидроморфина гидрохлорида (1-№ П N012076/01, Diosynth, Нидерланды, 99,74 % — HPLC), который, как и определяемые вещества, является производным морфина.

Определение проводили на жидкостном хроматографе — тандемном масс-спектрометре высокого разрешения Agilent 6530 Q-ToF LC/MS (США) в режиме

ионизации электрораспылением (ESI) и оборудованном квадрупольно-времяпролетным масс-анализатором (Q-TOF). Разделение компонентов проб осуществляли на хроматографической колонке Agilent (50 × 2,1 мм), заполненной сорбентом Zorbax Extend C18 зернением 1,8 мкм.

В качестве элюента использовали смесь ацетонитрила (А) и 0,1 % муравьиной кислоты (В). Пробы анализировали в градиентном режиме при расходе элюента 0,125 мл/мин и температуре колонки 30 °С. Режим хроматографического элюирования представлен в табл. 1.

Условия масс-спектрометрического детектирования

Режим источника ионизации	Положительная ионизация электростатическим распылением при атмосферном давлении
Режим детектирования	Детектирование в режиме полного ионного тока от 100 до 1000 Da с разрешением 15000
Полярность детектируемых ионов	Детектирование положительных ионов
Температура газа-осушителя	350 °С
Скорость потока газа-осушителя	8 л/мин
Скорость потока вспомогательного газа	11 л/мин
Напряжение на капилляре	3,5 кВ
Температура на распылителе	300 °С
Температура капилляра	350 °С

Подготовка проб. 1 мл плазмы помещали в пробирку Vacuette, прибавляли водный раствор внутреннего стандарта с концентрацией 1 мкг/мл (25 мкл на

Таблица 3
Масс-спектрометрическое детектирование производных морфина

№ п/п	Компонент	Брутто-формула	Масса, Да		Точность определения масс, ppm
			Измеренная	Вычисленная	
1	Налоксон	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	327,1463	327,1471	2,5
2	Бупренорфин	C ₂₉ H ₄₁ NO ₄	467,3023	467,3036	2,8
3	Налтрексон	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	341,1628	341,1627	0,3

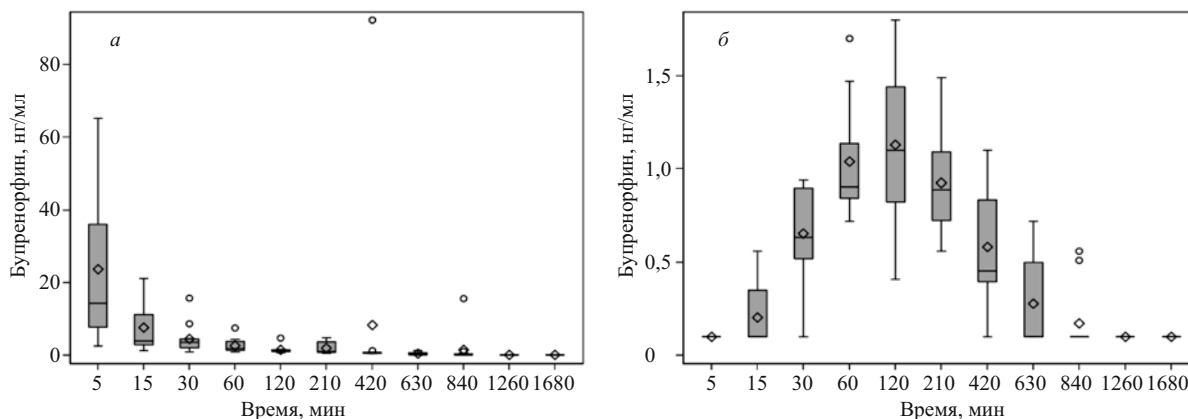


Рис. 5. Изменение концентрации бупренорфина в плазме крови пациентов при внутривенном введении препарата “Бупранал” (а) и сублингвальном введении препарата “Бупраксон” (б).

1-м этапе исследования и 5 мкл — на 2-м этапе) и 1 мл ацетонитрила. Пробы встряхивали на аппарате при скорости 400 колебаний в 1 мин в течение 10 мин. Осажденные белки отделяли центрифугированием при скорости 5000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант декантировали в пробирки Toxi-Tubes A, предназначенные для определения нейтральных и основных веществ, проводили экстракцию на аппарате при скорости 400 колебаний в 1 мин в течение 10 мин и вновь центрифугировали при скорости 3000 об/мин в течение 5 мин. 2 мл экстракта переносили в алюминиевые колпачки для концентрирования проб и упаривали до суха при комнатной температуре. Сухой остаток растворяли в 0,3 мл смеси ацетонитрила и 0,05 % раствора трифторуксусной кислоты в соотношении 5:95, пробу переносили в пробирку Эппендорфа, центрифугировали при скорости 7000 об/мин и 8 мкл вводили в хроматомасс-спектрометр.

Построение градуировочных графиков. Количественную оценку содержания бупренорфина и налоксона в плазме крови проводили методом внутреннего стандарта. Поскольку работа подразумевала 2 этапа исследования (внутривенное и сублингвальное введение препаратов), строили две калибровочные зависимости: для бупренорфина на первом этапе, и для бупренорфина и налоксона — на втором. Градуировочные растворы готовили добавлением к плазме крови раствора внутреннего стандарта с концентрацией

1 нг/мкл и растворов для внесения бупренопфина и налоксона с концентрацией 0,25 нг/мкл. Последние получали добавлением к 10 мкл препаратов бупранал 0,3 мг/мл и налоксона 0,4 мг/мл соответственно 11,99 и 15,99 мл воды. Состав градуировочных растворов, используемых для построения градуировочных графиков на 1 и 2 этапах исследования, представлен в табл. 2. Полученные пробы плазмы крови обрабатывали вышеописанным способом.

Результаты и их обсуждение

Оптимизация подготовки проб и детектирование. Для того чтобы в биоорганическом анализе реализовать преимущества хроматомасс-спектрометрии, необходимо особое внимание уделять процедуре подготовки проб. Она предполагает максимальное удаление белков, липидов и прочих эндогенных компонентов плазмы, способных подавлять ионизацию целевых аналитов в условиях ESI и соответственно ухудшать чувствительность определения. Другая причина потери чувствительности анализа может быть связана с сорбцией аналитов на поверхности аналитической посуды. Учитывая эти обстоятельства, в качестве подготовки проб выбрана двухстадийная схема, включающая отделение белков плазмы посредством их осаждения ацетонитрилом с последующим центрифугированием и экстракцию аналитов из супернатанта в готовых пробирках Toxi-Tubes A. Последние содержат подщелачивающие и высаливающие реагенты в виде суспензии в смеси органических растворителей. Выбранный способ обеспечивает высокую степень удаления белков плазмы крови (более 96 %) и сводит к минимуму потерю аналитов в процессе их выделения за счет миниатюризации процесса и применения ограниченного набора специальной химической посуды. В опытах *in vitro* коэффициент извлечения каждого аналита составил не менее 70 %.

При масс-спектрометрическом детектировании существенного увеличения чувствительности удалось достичь, регистрируя хроматограммы в режиме ионного тока по заданным ионам (Extracted Ion

Таблица 4
Метрологические характеристики определения бупренорфина и налоксона в плазме крови (*in vitro*) методом LC-MS

Компонент	Введено, нг/мл	Объем выборки	Найдено, нг/мл	Относительное стандартное отклонение, %	Коэффициент Стьюдента ($P = 95$)	Относительная погрешность, %	Степень обнаружения, %
Бупренорфин	1,0	5	0,96	6,1	2,78	7,6	96,0
	5,0	5	4,90	3,2	2,78	4,0	98,0
Налоксон	1,0	5	0,95	5,6	2,78	7,0	95,0
	5,0	5	4,80	3,3	2,78	4,1	96,0

Chromatogram, EIC). Высокое разрешение tandemного квадрупольно-времяпролетного масс-спектрометра позволило определить точные значения масс анализируемых соединений, регистрируемых в виде однозарядных ионов $[M + H]^+$ (рис. 2). Данные табл. 3 показывают, что точность определения масс не превышает 5 ч/млн.

Полученные хроматограммы представлены на рис. 3, 4.

Метрологические характеристики метода. Метрологические характеристики методики определены в опытах *in vitro* в соответствии с рекомендациями IUPAC и ICH по показателям “Правильность”, “Воспроизводимость”, “Специфичность”, “Линейность” и “Предел обнаружения” (см. табл. 4 и 5) [14 – 16].

Специфичность анализа, определяемая точностью измерения масс, проверена на 6 независимых образцах плазмы.

Пределы обнаружения бупренорфина и налоксона в плазме крови составляют 0,25 и 0,15 нг/мл и соответствуют соотношению параметров “сигнал — шум” 3:1.

Фармакокинетика. На рис. 5 представлены групповые средние концентрации бупренорфина в крови пациентов при внутривенном введении препарата бупранал и сублингвальном введении препарата бупраксон. Эти данные наглядно показывают, что концентрации бупренорфина в плазме крови значительно выше после внутривенного (в/в) введения бупранала, чем после сублингвального введения бупраксона.

На второй стадии исследования концентрация бупренорфина в плазме крови повышается относительно медленно. Максимальная концентрация после приема 0,4 мг бупренорфина достигается в интервале от 2 до 4 ч и составляет в среднем 0,5 нг/мл (от 0,32 до 0,63 нг/мл). Через 10 – 11 ч уровень препарата падает ниже 0,25 нг/мл и далее бупренорфин обнаруживается в виде следов. При этом биодоступность препарата колеблется около 50 – 55 %. Для сравнения хроноконцентрационные зависимости, полученные для бупренорфина и налоксона на данном этапе исследования, представлены на рис. 6.

В настоящем опыте удалось определить налоксон в крови только у части пациентов, принимавших участие в испытаниях. Абсолютные значения измеренных концентраций налоксона не превышают 0,47 нг/мл.

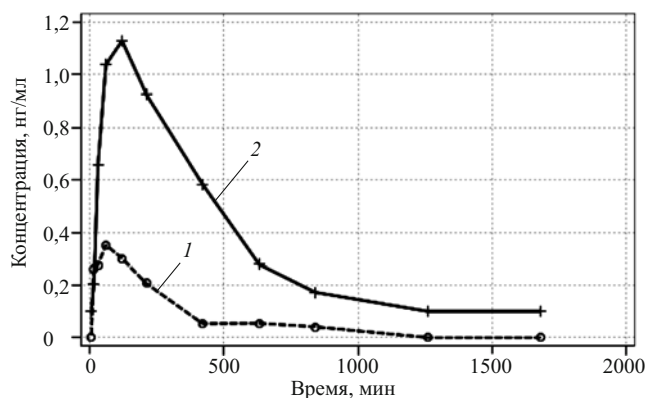


Рис. 6. Динамика средней концентрации бупренорфина и налоксона в крови пациентов после сублингвального приема препарата “Бупраксон”: 1 — налоксон AVG, 2 — бупренорфин AVG.

При этом в пробах, отобранных через 5 ч после введения, зарегистрированы лишь следовые количества препарата. Биодоступность налоксона при сублингвальном введении составляет всего 3 – 6 %. Быстрое снижение концентрации препарата свидетельствует о достаточно коротком периоде его полувыведения из плазмы крови.

Таким образом, при сублингвальном (с/л) введении препарата бупраксон в дозе 2 таблетки (0,4 мг бупренорфина и 0,4 мг налоксона) терапевтический уровень концентраций налоксона в плазме крови пациентов не достигается и, следовательно, он не может оказать существенного антагонистического действия по отношению к анальгетическому эффекту бупренорфина.

Параметры фармакокинетики препарата бупраксон в плазме были рассчитаны внемодельным методом:

$$AUC_{0-t} = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(C_{i+1} + C_i)}{2} (t_{i+1} - t_i)$$

В табл. 6 представлены средние показатели абсолютной биодоступности сублингвального введения бупренорфина.

Таблица 6

Средние показатели абсолютной биодоступности при сублингвальном введении бупренорфина в составе сублингвальных таблеток препарата “Бупраксон”

Параметр	AUC_{0-t} , в/в	AUC_{0-t} , с/л	F
Среднее	1207,2	484,8	0,50
СКО	757,2	153,4	0,24
Min	519,9	330,9	0,16
Max	3036,2	704,1	0,94
Медиана	966,2	428,6	0,58
95 % ДИ	Min	726,1	387,3
	Max	1688,3	582,2

AUC_{0-t} с/л и AUC_{0-t} в/в — площади под кривой при сублингвальном и внутривенном введении соответственно; F — биодоступность препарата ($F = AUC_{0-t}$ с/л / AUC_{0-t} в/в); ДИ — доверительный интервал.

Таблица 5
Характеристики градуировочных графиков определения бупренорфина и налоксона в плазме крови

Этап	Компонент	Диапазон концентраций, нг/мл	Уравнение первого порядка	Коэффициент корреляции
1	Бупренорфин	0,25 – 25,0	$Y = 1,318124X - 0,013362$	0,9988
2	Бупренорфин	0,25 – 5,0	$Y = 0,415943X - 0,004093$	0,9975
	Налоксон	0,25 – 5,0	$Y = 1,040095X - 0,041440$	0,9925

Как видно из таблицы, показатели отношения $F = AUC_{0-12} \text{ с/л} / AUC_{0-12} \text{ в/в} = 0,50$ (95 % ДИ: 0,36 – 0,66).

Таким образом, полученные показатели биодоступности бупренорфина в составе Бупраксона при сублингвальном введении соответствуют таковым для препаратов бупренорфина в форме сублингвальных таблеток (упренорфина гидрохлорид).

ЛИТЕРАТУРА

1. <http://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%91%D1%83%D0%BF%D1%80%D0%B5%D0%BD%D0%BE%D1%80%D1%84%D0%B8%D0%BD>.
2. <http://www.russlav.ru/narkotik/byprenorfin.html>.
3. F. Tagliaro and D. Franchi, and R. Dorizzi, et al., *J. Chromatogr.*, **488**(1), 215 – 228 (1989).
4. R. F. Venn and A. Michalkievicz, *J. Chromatogr.*, **525**(2), 379 – 388 (1990).
5. G. Chari, A. Gulati, R. Bhat, et al., *J. Chromatogr.*, **571**(1 – 2), 263 – 272 (1991).
6. R. S. Schwartz and K. O. David, *Anal. Chem.*, **57**(7), 1362 – 1366 (1985).
7. K. R. Bedford and P. C. White, *J. Chromatogr.*, **347**(3), 398 – 404 (1985).
8. J. G. Besner, C. Band, J. J. Rondeau, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **7**(12), 1811 – 1817 (1989).
9. P. O. Edlund, *J. Chromatogr.*, **206**, 109 – 116 (1981).
10. R. A. Tasker and K. Nakatsu, *Analyst*, **111**(5), 563 – 565 (1986).
11. D. French, and A. Wu, and K. Lynch, *Bioanalysis*, **3**(23), 2603 – 2612 (2011).
12. L. Couchman and P. E. Morgan, *Biomed. Chromatogr.*, **25**(1 – 2), 100 – 123, (2011).
13. H. H. Maurer, *Anal. Bioanal. Chem.*, **388**(7), 1315 – 1325 (2007).
14. *Номенклатурные правила IUPAC по химии*, Т. 1, полутом 2, Москва (1979), сс. 553 – 561.
15. ASEAN Guidelines for Validation of Analytical Procedures (2003).
16. U. P. Shah, K. K. Medha, S. V. Dighe, et al., *J. Pharm. Sci.*, **81**(3), 309 – 312 (1992).

Поступила 17.05.13

LIQUID CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY DETERMINATION OF BUPRENORPHINE AND NALOXONE IN HUMAN BLOOD PLASMA

I. K. Zhurkovich¹, A. O. Rudenko¹, V. V. Chelovechkova¹, I. A. Merkusheva¹, N. V. Lugovkina¹, N. G. Kovrov¹, M. V. Pchelintsev², E. V. Verbitskaya², and E. E. Zvartau²

¹ Institute of Toxicology, Federal Medico-Biological Agency of Russia, St. Petersburg, 192019 Russia

² Pavlov State Medical University, St. Petersburg, 197022 Russia

A method for determining buprenorphine and naloxone in human plasma using liquid chromatography and high-resolution time-of-flight mass spectrometry (LC-MS Q-TOF) has been developed. The sample preparation technique includes liquid extraction with salting-out of analytes in Toxi-Tubes A intended for the determination of neutral and basic substances. Quantitative analysis is carried out by the method of internal standard. Naltrexone, a compound structurally close to analytes, has been used as the internal standard. The proposed method has been developed for clinical tests of a new drug bupraxon, which represents a sublingual dosage form containing buprenorphine and naloxone in a dose of 0.2 mg each. Bioavailability of the drug components for sublingual administration has been studied and comparative evaluation of the buprenorphine concentration in human plasma upon administration at a dose of 0.4 mg via two routes (sublingual and intravenous) has been carried out.

Keywords: buprenorphine; naloxone; human blood plasma; high-performance liquid chromatography; high-resolution mass spectrometry