

О. Ю. Кравцова, И. И. Мирошниченко

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫЙ МОНИТОРИНГ ФЛУВОКСАМИНА

Научный центр психического здоровья (НЦПЗ) РАМН, Москва, Россия

Разработаны высокочувствительные и воспроизводимые методики количественного определения флувоксамина в биологических образцах с использованием ВЭЖХ в сочетании с разными типами детектирования (спектрофотометрия и тандемная масс-спектрометрия). Приведенные методики полностью взаимозаменяемы, корреляционный анализ выявил высокую степень совместимости данных, полученных разными способами детекции: коэффициент корреляции Пирсона — 0,982 ($p < 0,0001$), наклон линии регрессии близок к 1. Методики успешно апробированы при проведении рутинного терапевтического лекарственного мониторинга флувоксамина в сыворотке крови пациентов.

Ключевые слова: флувоксамин, ВЭЖХ-УФ, дериватизация, 1,2-нафтохинон-4-сульфоновой кислоты натриевая соль, хроматомасс-спектрометрия, тандемная ВЭЖХ-МС, терапевтический лекарственный мониторинг.

Флувоксамин (fluvoxamine) представляет собой (Е)-5-метокси-1-[4-(трифторметил)фенил]-1-пентанон-*o*-(2-аминоэтил)оксим (в виде малеата). Белый или почти белый кристаллический порошок без запаха, труднорастворимый в воде, легко растворимый в этаноле, метаноле и хлороформе, практически нерастворимый в диэтиловом эфире. Константа диссоциации флувоксамина (ФА) малеата — $pK_a 8,7$, коэффициент распределения в системе *n*-гептан — вода — $\log P 0,04$.

ФА по фармакологическому действию относится к группе антидепрессантов, специфически ингибирует обратный захват серотонина, относительно мало влияя на захват норадреналина и дофамина. Обладает слабой антихолинергической активностью. ФА используется в основном в терапии депрессий и обсессивно-компульсивных расстройств [1]. Сложность прогнозирования эффективности терапии депрессий в отношении каждого пациента обуславливает целесообразность проведения терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ) и индивидуализации дозирования ФА [2].

Проведение рутинного ТЛМ возможно лишь при наличии высокочувствительного и специфичного метода определения содержания исследуемого лекарственного вещества в биологических жидкостях. В связи с этим целью настоящего исследования являлась разработка высокочувствительных, воспроизводимых и полностью взаимозаменяемых методик количественного определения флувоксамина в биологических образцах с использованием ВЭЖХ с разными типами детектирования (спектрофотометрия и масс-спектрометрия).

Экспериментальная часть

Маточные растворы (1 мг/мл) ФА и внутреннего стандарта для хроматомасс-спектрометрии готовили в ацетонитриле, либо в метаноле. Маточные растворы стабильны при температуре + 4 °С в течение 1 мес.

Для извлечения ФА из биологического материала (сыворотка крови) использовали жидкостную экстракцию. К пробам сыворотки (0,5 мл) добавляли 50 мкл 1 М NaOH, перемешивали и экстрагировали 2 мл смеси *n*-гексан — изоамиловый спирт (98/2, по объему) в течение 10 мин на горизонтальном встряхивателе. Далее пробирки центрифугировали 10 мин при 5000 об/мин. Полученный супернатант (органический слой) переносили в чистые пробирки и выпаривали в токе азота при 45 °С досуха. Сухой остаток растворяли в соответствующей среде в зависимости от дальнейшей процедуры. Степень экстракции ФА из сывороточных образцов достигала $91,9 \pm 2,1\%$.

ВЭЖХ методика со спектрофотометрическим детектированием (ВЭЖХ-УФ)

Хроматографический анализ содержания ФА в сыворотке крови осуществляли на жидкостном хроматографе, оснащенный спектрофотометрическим детектором Spectromonitor D (LDC, США) и компьютерным интегратором Chromatorac C-R6A (Shimadzu, Europe GmbH, Германия). Условия хроматографирования: колонка “Nucleosil 100” (Supelco, США) с обращённо-фазным сорбентом C8 (4,6 × 150 мм; 5 мкм); элюент — смесь ацетонитрила и деионизированной воды (50:50; по объему); скорость элюирования — 1,5 мл/мин; детектирование на спектрофотометре при $\lambda = 450$ нм, соответствующей максимуму поглощения окрашенных продуктов дериватизации флувоксамина; разделение проводили при комнатной температуре. В качестве внутреннего стандарта использовали амлодипин (А). В этих условиях время удерживания ФА составило $9,2 \pm 0,2$ мин, S(-)-амлодипина — $6,7 \pm 0,3$ мин.

Для выделения препаратов (ФА и А) из подщелоченной сыворотки крови использовали жидкостную экстракцию, как описано выше. Далее выпаренные пробы подвергали дериватизации. В сухой остаток добавляли 200 мкл смеси ацетонитрила и фосфатного буфера с pH 7,75 (25:75, по объему), 50 мкл 0,1 % вод-

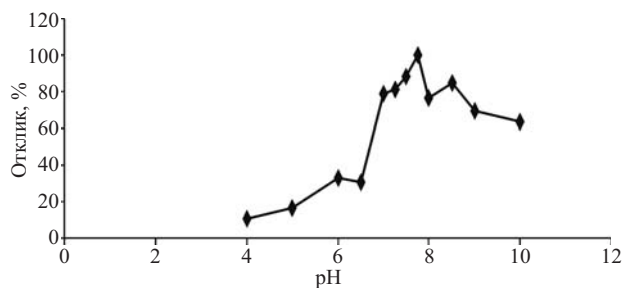


Рис. 1. Влияние pH реакционной смеси на величину хроматографического отклика ФА.

ного раствора натриевой соли 1,2-нафтохинон-4-сульфоновой кислоты (NQS), перемешивали и инкубировали в течение 15 мин при 55 °С на водяной бане. Затем пробы охлаждали и 100 мкл инжестрировали в хроматограф.

Количественную оценку содержания ФА в хроматографических фракциях проводили методом внутреннего стандарта.

ВЭЖХ методика с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС)

Анализ биопроб проводили на жидкостном хроматографе Agilent 1200 Series LC, совмещенном с квадрупольным масс-спектрометром Agilent 6410 – 2К Triple Quad (США). Условия хроматографического анализа: колонка “Zorbax Eclipse XDB-C18” (Agilent, США) с обращённо-фазным сорбентом C18 (150 × 4,6 мм; 5 мкм); элюент — смесь метанола и 5 мМ раствора NH₄CH₃COO в воде (75:25; по объему); скорость элюирования — 0,8 мл/мин; температура термостата колонки — 25 °С. В этих условиях время удерживания ФА составило 4,7 ± 0,3 мин.

Проводили жидкостную экстракцию ФА (см. выше), затем упаренные пробы перерастворяли в 250 мкл метанола и 20 мкл вводили в аналитическую систему.

Для сбора и обработки хроматографических данных использовали программный софт MassHunter V.01.04. (Agilent, США). Концентрацию ФА в образцах сыворотки крови вычисляли методом нормализации по данным абсолютной калибровки, построенной по площадям хроматографических пиков ФА.

Результаты и их обсуждение

ФА слабо поглощает как в ультрафиолетовой, так и в видимой областях спектра и не флуоресцирует. В то же время наличие аминогруппы обуславливает возможность дериватизации молекулы флувоксамина различными окрашивающими агентами, используемыми при анализе аминокислот [3, 4]. В нашем исследовании для детектирования был избран спектрофотометрический метод с предколонной дериватизацией, в качестве хроматофора использовали NQS [5] — чувствительный окрашивающий агент для флуоресцентного мечения первичных и вторичных аминов, широко применяющийся для анализа аминокислот [6, 7]. NQS

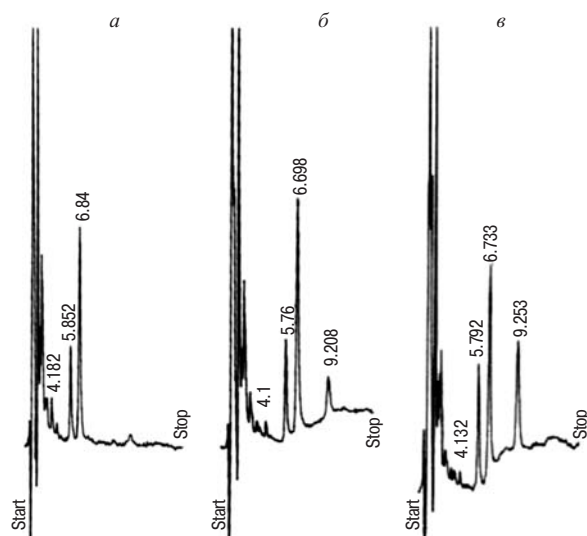


Рис. 2. Хроматограммы (УФ) холостой пробы сыворотки (а), калибровочного образца (б) с концентрацией ФА 125 нг/мл (внутренний стандарт — 1000 нг/мл) и опытного образца (в) сыворотки пациента (проба № 17) с концентрацией ФА 603 нг/мл. Время удерживания ФА — 9,2 мин, S(-)-А — 6,7 мин.

связывается с молекулой ФА через NH₂-группу боковой цепи, что приводит к образованию продукта, окрашенного в интенсивно оранжевый цвет с $\lambda_{\max} = 450$ нм. Подбор внутреннего стандарта для хроматографического определения обусловлен наличием первичной аминогруппы и удовлетворительной экстракцией соединения из сывороточного матрикса гексаном. Исходя из этих критериев и хорошего разделения на хроматографической колонке, в качестве внутреннего стандарта был выбран А.

На результат оказывают влияние различные экспериментальные факторы дериватизации. В связи с этим для получения оптимальных величин в ходе эксперимента варьировали следующие параметры реакции: природу буфера (изучали боратный и фосфатный буферы), pH буфера (в диапазоне от pH 4,0 до 10), состав реакционной смеси (соотношение ацетонитрила и буфера в диапазоне от 1 до 1/4), концентрацию водного раствора NQS (от 0,05 до 2 %), температуру водяной бани (35 – 70 °С), время инкубации (10 – 30 мин). Оптимизацию процесса дериватизации выполняли, используя стандартные растворы, содержащие ФА и внутренний стандарт. Наибольшее влияние на величину хроматографических пиков оказывала величина pH фосфатного буфера (рис. 1). Оптимально значение pH равнялось 7,75.

В работе [5] дериватизация проводилась путем добавления NQS непосредственно в сывороточные образцы с последующей экстракцией продукта реакции. Мы нашли такой способ неэффективным ввиду малого выхода и множества коэлюирующих соединений. Вследствие этого дериватизацию проводили после экстракции сывороточных образцов.

Хроматограммы холостой пробы, калибровочного и опытного образцов представлены на рис. 2. Пик ФА

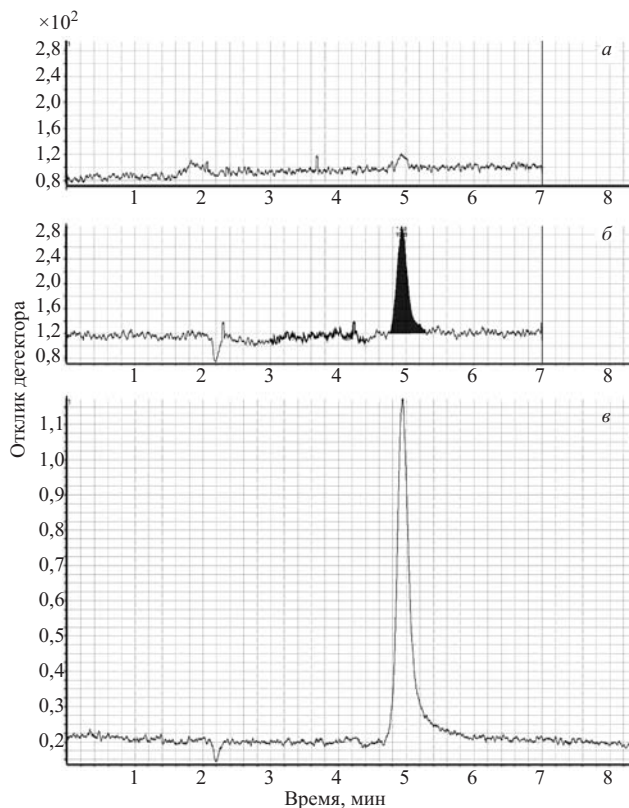


Рис. 3. Хроматограммы (МС) холостой пробы сыворотки (а), стандартного образца (б) с концентрацией ФА 1 нг/мл и опытного образца (в) сыворотки пациента (проба № 94) с концентрацией флувоксамина 5,9 нг/мл. Время удерживания ФА — 4,9 мин.

симметричный, отвечает гауссову распределению, без признаков размывания и раздвоения со временем удерживания 9,2 мин (рис. 2, б и в). Амлодипин выходит 2 пиками со временами удерживания: первый R(+) — 5,8 мин, второй S(-) — 6,7 мин. В качестве внутреннего стандарта использовали S(-)-изомер А. Пики коэкстрактивных веществ матрицы образцов не интерферируют с выходом целевого вещества и внутреннего стандарта. Использование дериватирующего агента (NQS) обеспечивает приемлемый и стабильный ответ для различных концентраций флувоксамина.

Для разработанной ВЭЖХ-методики со спектрофотометрическим детектированием установлена линейная зависимость между концентрацией ФА в интервале 25 нг/мл – 5 мкг/мл и отношением высот хроматографических пиков целевого соединения и внутреннего стандарта $C = 6 + 841 \cdot (H_1/H_2)$, $r^2 = 0,99$. Предел обнаружения разработанной методики — 25 нг/мл при соотношении сигнал/шум = 5/1.

В настоящее время в практике количественного определения содержания лекарственных веществ в биологических субстратах все большее применение находят так называемые “гибридные” методы: сочетание хроматографических методов разделения и масс-спектроскопической детекции (ВЭЖХ-МС) [8]. Им присуща универсальность, селективность (разделение идет как на колонке, так и в анализаторе по массам) и высокая чувствительность количественного определения. Для измерения концентрации ФА в крови человека разработаны методики, основанные на тандемной хро-

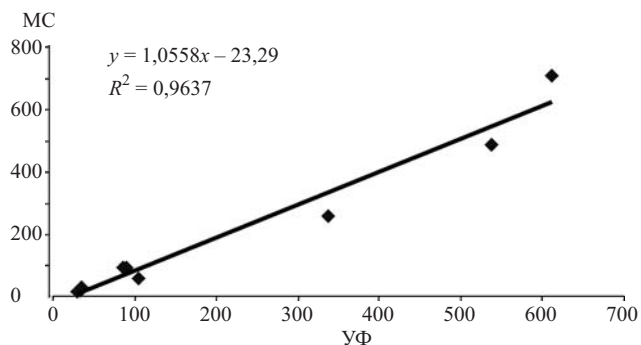


Рис. 4. Диаграмма рассеяния концентраций ФА, измеренных у 8 пациентов при использовании УФ- и МС-детекторов.

момасс-спектрометрии в режиме детектирования заданных масс [9 – 11], с использованием оборудования фирм Thermo Electron Corporation и Applied Biosystems. Необходимо отметить, что методики значительно изменяются для конкретного оборудования, и механический перенос на анализатор другого типа непродуктивен. В связи с этим была поставлена задача — разработать методику для анализаторов фирмы Agilent, широко распространенных на территории РФ.

Масс-спектрометрическое детектирование проводилось в режиме положительной ионизации электро-распылением (ESI/ API, Positive). В масс-спектре ФА, полученном при ионизации вещества в режиме MS с одним квадрупольным анализатором, наблюдался интенсивный пик с m/z 319,2, соответствующий протонированному молекулярному иону $(M+H)^+$ целевого вещества.

В количественном анализе лекарственных веществ наиболее распространен мониторинг 1 выбранного иона: первый анализатор (MS1) настроен на пропускание ионов с одним фиксированным значением m/z (для ФА 319,2), второй анализатор (MS2) фиксирует количество прошедших ионов либо по одному, либо по нескольким (Multiple Reaction Monitoring — MRM) каналам с заданными значениями m/z фрагментов (m/z выбранного дочернего иона ФА — 71,1). Параметры работы детектора подбирались для достижения максимального выхода MRM. Параметры источника ионизации: расход газа азота — 11 л/мин, температура газа — 270 °С, напряжение капилляра — 5800 В, давление распылителя — 35 psi; параметры фрагментации: энергия фрагментации — 100 В, энергия столкновения — 15 В.

Хроматограммы холостой пробы, стандартного и опытного образцов представлены на рис. 3. Как в стандартных образцах сыворотки (рис. 3, б), так и в опытных (рис. 3, в), пик ФА симметричный, отвечает гауссову распределению, без признаков размывания и раздвоения со временем удерживания 4,9 мин.

Линейность хроматомасс-спектрометрической методики в диапазоне концентраций 2 – 1000 нг/мл демонстрируется средним коэффициентом корреляции $r^2 = 0,999$ ($S = 2190,08 \cdot C$). Предел количественного об-

наружения составляет 1 нг/мл при соотношении сигнал/шум = 4,8/1.

Вышеуказанные методические подходы были успешно апробированы при проведении рутинного ТЛМ ФА в сыворотке крови 47 амбулаторных больных с эндогенными депрессиями различной нозологической принадлежности на базе Научного центра психического здоровья (НЦПЗ) РАМН, Москва. Проведено сравнение результатов, полученных обоими методами (УФ и МС-детекция) (рис. 4).

Корреляционный анализ [12] полученных результатов выявил высокую степень совместимости данных — коэффициент корреляции Пирсона равнялся 0,982 ($P < 0,0001$), а наклон линии регрессии был близок к 1.

Поскольку концентрации флувоксамина в большинстве экспериментальных проб, как было выявлено при проведении ТЛМ, варьируют в пределах 40 – 800 нг/мл, для рутинного количественного определения можно применять и УФ- и МС-детекцию. Хромато-масс-спектрометрия предпочтительнее из-за менее трудоемкой пробоподготовки образца и более высокой чувствительности и селективности, однако большая стоимость проведения анализа единичного образца ограничивает ее применение.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. I. Wilde, G. L. Plosker, and P. Benfield, *Drugs*, **46**(5), 895 – 924 (1993).
2. И. И. Мирошниченко, Е. В. Горшкова, *Психиатрия*, № 3, 47 – 55 (2008).
3. A. Lucca, G. Gentilini, S. Lopez-Silva, and A. Soldarini, *Ther. Drug Monit.*, **22**(3), 271 – 276 (2000).
4. Y. Higashi, H. Matsumura, Y. Fujii, *Biomed. Chromatogr.*, **19**, 771 – 776 (2005).
5. S. T. Ulu, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **43**(4), 1444 – 1451 (2007).
6. J. Saurina, S. Hern'andez-Cassou, *J. Chromatogr. A*, **676**(2), 311 – 319 (1994).
7. P. Edler, A. Cominoli, and C. Corvi, *J. Chromatogr. A*, **830**, 345 – 351 (1999).
8. И. И. Мирошниченко, Ю. А. Федотов, Е. В. Горшкова, А. А. Иващенко, *Качеств. клин. практика*, № 3, 29 – 36 (2008).
9. U. Gutteck and K. M. Rentsch., *Clin. Chem. Lab. Med.*, **41**(12), 1571 – 1579 (2003).
10. H. Kirchherr and W. N. Kuhn-Velten, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **843**(1), 100 – 113 (2006).
11. H. Hattori, K. Ito, M. Iwai, et al., *Forensic. Toxicol.*, **25**, 100 – 103 (2007).
12. L. I. Lin, *Biometrics*, **56**, 324 – 325 (2000).

Поступила 07.12.09

FLUVOXAMINE QUANTITATIVE DETERMINATION FOR THERAPEUTIC DRUG MONITORING

O. Yu. Kravtsova and I. I. Miroshnichenko

Mental Health Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

Highly sensitive and reproducible methods for quantitative determination of fluvoxamine in biological samples have been developed based on high performance liquid chromatography (HPLC) with UV-spectroscopic or mass-spectrometric (MS) detection. Correlation analysis showed agreement between fluvoxamine levels measured by HPLC with both UV and MS detection techniques: the Pearson correlation coefficient was 0.982 ($p < 0.0001$) and the slope of the congruence line was close to unity. The HPLC-UV and HPLC-MS procedures were successfully applied to routine therapeutic monitoring of fluvoxamine in the blood serum of depression patients.

Key words: Fluvoxamine, HPLC, UV detection, derivatization, 1,2-naphthoquinone-4-sulphonic acid sodium salt, tandem HPLC-MS, therapeutic drug monitoring