© Коллектив авторов, 2016

Т. А. Родина[1,3], *Е. С. Мельников*[2,3], *А. В. Соколов*[1,2], *А. Б. Прокофьев*[1,2,3], *В. В. Архипов*[1,2,3], *А. А. Аксёнов*[2], *Д. Л. Поздняков*[3]

ЭКСПРЕСС-МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАРБАМАЗЕПИНА И КАРБАМАЗЕПИН-10,11-ЭПОКСИДА МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

[1] ФГБУ "НЦЭСМП" Минздрава России, Россия, Москва.
[2] ГБОУ ВПО Первый МГМУ им И. М. Сеченова Минздрава России, Россия, Москва.
[3] ГБУЗ "ГКБ им. И. В. Давыдовского ДЗМ", Россия, Москва.

Разработана экспресс-методика одновременного определения карбамазепина и карбамазепин-10,11-эпоксида в сыворотке крови человека с использованием метода ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. Аналитический диапазон для карбамазепина составил 50 – 20000 нг/мл и для карбамазепин-10,11-эпоксида 5 – 2000 нг/мл, что позволяет использовать настоящую методику как для осуществления терапевтического лекарственного мониторинга, так и для проведения исследований биоэквивалентности и оценки взаимозаменяемости препаратов карбамазепина.

Ключевые слова: карбамазепин; карбамазепин-10,11-эпоксид; терапевтический лекарственный мониторинг; биоэквивалентность; взаимозаменяемость; ВЭЖХ-МС/МС.

Многолетний опыт применения карбамазепина (I) в клинической практике позволяет позиционировать его как эффективное средство при лечении различных неврологических заболеваний. В настоящее время I является препаратом первого выбора при лечении эпилепсии, невралгии тройничного нерва (НТН) и широко применяется в комплексной терапии при лечении хронических болевых синдромов [1].

Фармакокинетика I достаточно хорошо изучена. Метаболизм I происходит в печени под действием цитохрома P450 CYP3A4 с образованием активного метаболита карбамазепин-10,11-эпоксида (II). При назначении препарата в терапевтических дозах в первые 3 – 7 дней имеет место эффект автоиндукции. Терапевтический диапазон концентраций I в сыворотке крови составляет 4 – 12 мкг/мл. При концентрации I выше 12 мкг/мл возможно проявление нежелательных лекарственных реакций (НЛР) [2, 3].

Известны фармакокинетические подходы при подборе оптимальной дозы препарата и интервалов дозирования с помощью терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ) при эпилепсии, которые основывались на измерении концентрации I в сыворотке крови [1, 4 – 6].

Особый интерес вызывает оптимизация фармакотерапии при применении препарата для купирования обострения НТН, так как по сравнению с лечением эпилепсии, лечение предусматривает повышение доз препарата, причем пациенты часто не соблюдают комплайнс и увеличивают дозы, что может привести к возникновению тяжелых НЛР [5, 8].

Разработка персонализированных подходов к рациональной фармакотерапии I при НТН с учетом скорости метаболизма у каждого конкретного пациента может существенно сократить время подбора оптимальной дозы и интервалов дозирования, а также значительно повысить эффективность и безопасность терапии [9]. Следует помнить, что на активность метаболизма I могут влиять другие препараты, например, фенитоин, фенобарбитал, примидон, которые могут увеличить клиренс I в 2 раза из-за индукции CYP3A4.

Эмпирический подбор доз I и определение оптимальной дозы по клинической картине представляет собой достаточно длительный и небезопасный процесс. Отношение между принятой дозой I и его концентрацией в сыворотке крови, скорость метаболизма (фенотип метаболизма), узкий терапевтический индекс и наличие многочисленных клинически значимых лекарственных взаимодействий обуславливают необходимость индивидуализации лечения [2, 3, 9, 10]. Для реализации данного подхода необходим быстрый и эффективный метод экспресс-анализа уровня I и II в сыворотке крови.

Существует ряд хроматографических методик [11, 12], позволяющих определять в сыворотке крови пациентов как концентрацию самого I, так и концентрации I и II при совместном присутствии [13 – 18]. Несмотря на высокую чувствительность и широкий аналитический диапазон, существенным недостатком данных методик является длительное время пробоподготовки и проведения анализа.

Для минимизации времени определения I и его основного метаболита при сохранении чувствительности ранее предложенной методики [18], простоты пробоподготовки и с целью уменьшения расхода реактивов в ГКБ им. И. В. Давыдовского была разработана усовершенствованная методика определения концентрации I и II в сыворотке крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС.

Экспериментальная часть

Исследование проводилось на оборудовании фирмы Shimadzu (Япония), система ВЭЖХ Nexera LCMS-8040 (QQQ).

В работе использовали следующие реактивы: ацетонитрил (Panreac, supergradient for UPLC), муравьиная кислота (Fluka, for mass-spectrometry), деионизо-

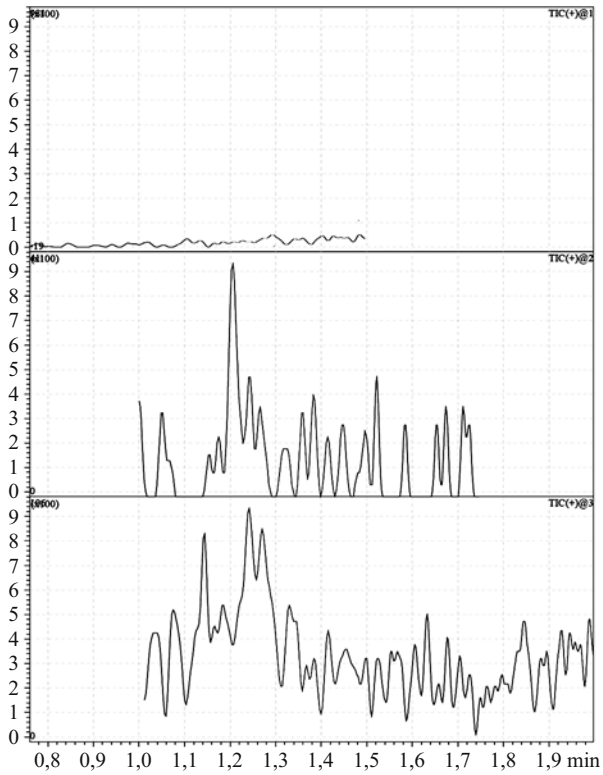

Рис. 1. Хроматограмма образца интактной сыворотки крови человека.

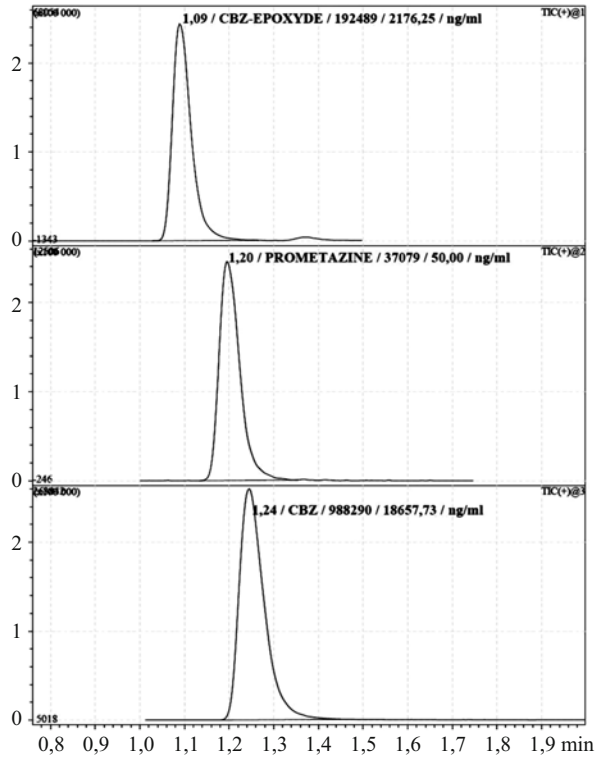

Рис. 2. Хроматограмма образца интактной сыворотки крови человека с прибавлением стандартных растворов I, II и промета-

ванная вода (электросопротивление 18,2 Мом · см). Для приготовления калибровочных растворов использовали I, II и прометазин (все реактивы Sigma-Aldrich), отвечающие требованиям Фармакопеи США.

Хроматографическое разделение осуществляли на колонке Synergi Polar RP, 50 × 2 мм, 4 мкм, 80 Å (Phenomenex, США) с универсальной предколонкой C18, 4 × 3,0 мм (Phenomenex, США) при температуре 40° С. Подвижная фаза состояла из элюента А (1 об. % муравьиной кислоты/деионизованная вода) и элюента В (1 об. % муравьиной кислоты/ацетонитрил). Градиент по составу подвижной фазы представлен в табл. 1, градиент по скорости потока представлен в табл. 2. Объем вводимой пробы — 1 мкл.

Для увеличения точности, прецизионности и стабильности результатов применили метод внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта был выбран прометазин, как вещество, обладающее близкой молекулярной массой, имеющее сходные с I и II физико-химические свойства и практически не применяемое в наши дни в клинической практике, что исключает возможность его нахождения в исследуемых образцах.

При ионизации использовали метод электрораспыления (ESI) в положительном режиме. Детектирование проводили в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). В данном случае ионы-предшественники соответствовали протонированным молекулярным ионам, а именно: для I — 237,10 *m*/*z*, для II — 253,10 *m*/*z* и для прометазина — 285,10 *m*/*z*. Параметры детектирования в режиме MRM^+ и энергия соударений подобраны экспериментально и представлены в табл. 3. Время удерживания I составляло около

Таблица 1

Градиент по составу подвижной фазы

Время анализа, мин	Объёмная доля элюента В, %
0,00 → 0,20	5
0,20 → 0,21	5 → 37
0,21 → 0,90	37 → 39
0,90 → 0,91	39 → 47
0,91 → 1,45	47
1,45 → 1,86	47 → 100
1,86 → 2,10	100
2,10 → 2,20	100 → 5
2,20 → 3,00	5

Таблица 2

Градиент по скорости потока

Время анализа, мин	Скорость потока подвижной фазы, мл/мин
0,00 → 0,20	0,4
0,20 → 0,21	0,40 → 0,60
0,21 → 0,75	0,60
0,75 → 0,76	0,60 → 0,90
0,76 → 2,25	0,90
2,25 → 2,26	0,90 → 0,40
2,26 → 3,00	0,40

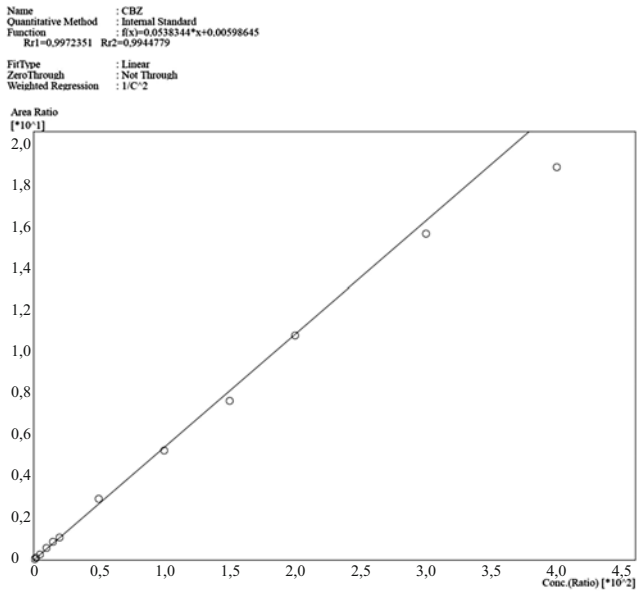

Рис. 3. Калибровочный график зависимости площади пика I от концентрации в сыворотке крови человека.

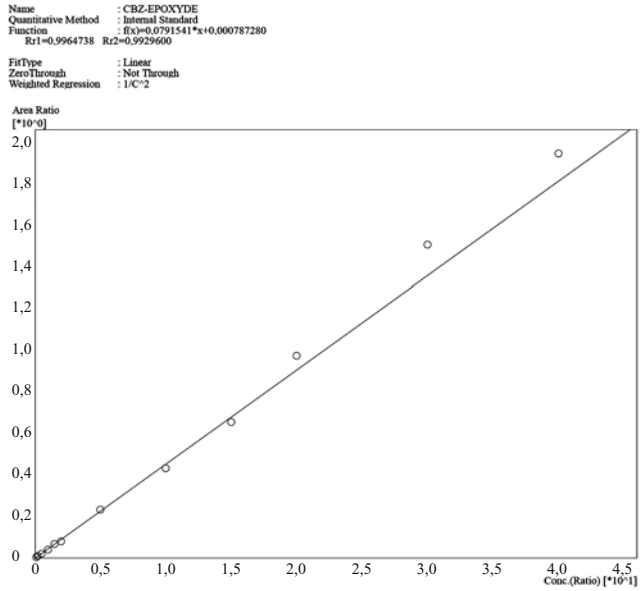

Рис. 4. Калибровочный график зависимости площади пика II от концентрации в сыворотке крови человека.

1,26 мин, II — около 1,10 мин, прометазина — около 1,21 мин.

Пробоподготовку образцов сыворотки крови осуществляли путём осаждения белков ацетонитрилом. Для этого к 200 мкл исследуемой сыворотки (либо 180 мкл интактной сыворотки крови человека с прибавлением 20 мкл рабочего стандартного раствора I и II) добавляли 10 мкл раствора внутреннего стандарта прометазина (1000 нг/мл), 600 мкл ацетонитрила, встряхивали в течение 15 с на вортекс-шейкере. Далее пробу центрифугировали 15 мин со скоростью 14000 об/мин. Надосадочную жидкость переносили в виалы и помещали в автосамплер хроматографа.

Валидация методики проведена в соответствии с требованиями руководства по экспертизе лекарственных средств [19]. При оценке селективности был проведён анализ 6 образцов интактной сыворотки из разных источников, образцов интактной сыворотки с прибавлением стандартных растворов I, II и прометазина (рис. 1, 2). На хроматограмме интактной сыворотки отсутствовали пики, соответствующие по временам удерживания исследуемым веществам.

Для оценки влияния биологической матрицы на сигнал детектора рассчитывали эффект матрицы как соотношение площади пика исследуемого вещества на хроматограмме образца сыворотки крови с добавлением стандартных растворов после осаждения белков (А) к площади пика исследуемого вещества на хроматограмме образца, приготовленного с заменой сыворотки крови равным объёмом ацетонитрила и с добавлением стандартных растворов I, II и прометазина (Б) [20].

Степень извлечения I, II и прометазина из сыворотки крови в процессе пробоподготовки рассчитывали как соотношение площади пика исследуемого вещества на хроматограмме образца сыворотки крови с добавлением стандартных растворов до осаждения белков (В) к площади пика исследуемого вещества на хроматограмме образца интактной сыворотки крови с добавлением стандартных растворов после осаждения белков (А) [20]. Данные представлены в табл. 4.

Для построения калибровочной кривой проводили анализ 12 образцов интактной сыворотки с прибавлением стандартных растворов до получения следующих концентраций: 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2500, 5000, 7500, 10000, 15000, 20000 нг/мл для I и 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 нг/мл для II. Полученные калибровочные графики, а также уравнения прямых и коэффициенты корреляции приведены на рис. 3, 4.

Таблица 3

Параметры детектирования I, II и прометазина в режиме MRM$^+$

Соединение	Ион-предшественник, *m/z*	Фрагментный ион, *m/z*	Энергия соударений, В
КБЗ	237,10	194,10	– 35,0
Э-КБЗ	253,10	180,10	– 35,0
Прометазин	285,10	86,10	– 20,0

Таблица 4

Оценка эффекта матрицы и степени извлечения при анализе эпоксида II

Показатель	Концентрация, нг/мл				
	I		II		прометазина
	100	20000	10	2000	50
Эффект матрицы (А/Б)	1,13	1,04	1,07	1,03	1,10
Степень извлечения (В/А)	0,99	0,97	0,93	0,99	0,94

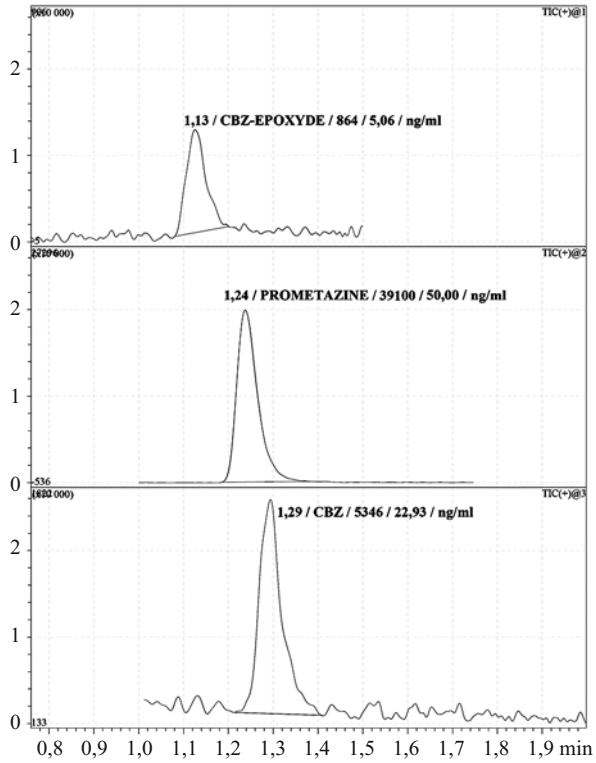

Рис. 5. Хроматограмма образца сыворотки крови человека с содержанием 5,00 нг/мл II и 50,00 нг/мл I.

При оценке точности и прецизионности проводили анализ 4 образцов интактной сыворотки с прибавлением стандартных растворов до получения концентраций: 5, 10, 1500, 2000 нг/мл для II и 50, 100, 15000, 20000 нг/мл для I. Точность и прецизионность определяли внутри аналитического цикла и между циклами. Данные представлены в табл. 5, 6.

Полученные величины относительного стандартного отклонения (RSD, % — прецизионность) и относительной погрешности (E, % — точность) соответствуют нормам (не более 20 % для нижнего предела количественного определения, не более 15 % — для остальных точек). Предел количественного определения методики составил 50 нг/мл для I и 5 нг/мл для II.

Применение методики. Разработанная методика была применена для определения концентраций I и II в плазме крови пациентов, проходивших лечение в ГБУЗ "ГКБ им. И. В. Давыдовского ДЗМ", с целью контроля содержания препарата и его метаболита в сыворотке крови пациента при выборе оптимальной дозы и кратности приёма препарата.

Таблица 5

Точность и прецизионность методики для эпоксида II

Введено, нг/мл	Внутри цикла			Между циклами		
	найдено, нг/мл, среднее (n = 5)	RSD, % (n = 5)	E, %	найдено, нг/мл, среднее (n = 15)	RSD, % (n = 15)	E, %
5,00	5,03	9,88	0,68	4,99	3,36	– 0,23
10,00	10,39	7,12	3,90	10,34	3,64	3,35
1500,00	1572,52	5,94	4,83	1630,51	5,81	8,70
2000,00	2276,2	5,40	13,81	2223,42	3,86	11,17

Таблица 6

Точность и прецизионность методики для I

Введено, нг/мл	Внутри цикла			Между циклами		
	найдено, нг/мл, среднее (n = 5)	RSD, % (n = 5)	E, %	найдено, нг/мл, среднее (n = 15)	RSD, % (n = 15)	E, %
50,00	54,41	6,29	8,82	49,58	7,65	– 0,83
100,00	109,57	4,24	9,57	108,27	4,4	8,27
15000,00	16561,7	2,35	10,41	14921,9	3,64	– 0,52
20000,00	20682	1,15	3,41	18411,4	6,98	– 7,94

Кроме того, разработанная нами методика может применяться для различных целей, например, при проведении исследований биоэквивалентности новых лекарственных форм I как модифицированного высвобождения, так и лекарственных форм, отличающихся повышенной биодоступностью.

Таким образом, разработана и валидирована экспресс-методика определения I и II в сыворотке крови человека с применением прометазина в качестве внутреннего стандарта. Аналитический диапазон для I составил 50 – 20000 нг/мл и для II 5 – 2000 нг/мл, что позволяет использовать данную методику как для осуществления терапевтического лекарственного мониторинга, так и для проведения исследований биоэквивалентности и оценки взаимозаменяемости препаратов карбамазепина. Простая процедура пробоподготовки и время хроматографического анализа, равное 3 мин, позволяет проводить ТЛМ I и II в режиме реального времени, что важно при оптимизации фармакотерапии карбамазепином при заболеваниях нервной системы (эпилепсия, НТН, хронический болевой синдром и т.д.).

ЛИТЕРАТУРА

1. В. А. Карлов, *Терапия нервных болезней*, Медицина, Москва (2004).
2. A. Serralheiro, G. Alves, A. Fortuna, et al., *J. Chromatogr. B*, 925 (2013).
3. Л. Е. Холодов, В. П Яковлев, *Клиническая фармакокинетика*, Медицина, Москва (1985).
4. Е. Н. Гусев, Ю. Б. Белоусов, А. Б. Гехт и др., *Лечение эпилепсии: Рациональное дозирование антиконвульсантов*, ООО "Речь", Санкт-Петербург (2000).
5. В. Г. Кукес (ред.), *Методические рекомендации "Терапевтический лекарственный мониторинг: инструмент персонализированной медицины"*, Издательство Автономной некоммерческой организации "Международной ассоциации клинических фармакологов и фармацевтов", Москва (2013).
6. J. Sato, T. Saitoh, K. Notani, et al., *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, PMID 14716252 (2004).
7. В. Г. Кукес, С. В. Грачев, Д. А. Сычев, Г. В. Раменская, *Руководство для врачей*, Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2008).
8. В. Г. Кукес (ред.), *Справочник лекарственных средств, которые метаболизируются в организме человека*, Издательство Автономной некоммерческой организации "Междуна-

родной ассоциации клинических фармакологов фармацевтов", Москва (2013).
9. Philip N. Patsalos, David J. Berry, et al., *Epilepsia*, **49**(7), 1239 – 1276 (2008).
10. F. Pisani, M. Caputo, A. Fazio, et al., *Epilepsia*, **31**(3), 339 – 342 (1990).
11. D. A. Cocks, T. F. Dyer, K. Edgar, *J. Chromatogr.*, **222**, 496 – 500 (1981).
12. K. Chen H. K. Bashi, *J. Anal. Toxicol.*, **15**, 82 – 85 (1991).
13. Ranise, E. Benassi, G. Besio, *J. Chromatogr.*, **222**, 120 – 124 (1981).
14. M. C. Rouan, J. Campestrini, V. Le Clanche, et al., *J. Chromatogr.*, **573**, 65 – 68 (1992).
15. Ana Ferreira, Márcio Rodrigues, Paula Oliveira, et al., *J. Chromatogr. B*, **971**, 20 – 29 (2014).
16. P. Pienimaki, S. Fuchs, J. Isojarvi, et al., *J. Chromatogr. B*, **673**, 97 – 105 (1995).
17. K. Chan, *J. Chromatogr.*, **342**, 341 – 347 (1985).
18. Т. А. Родина, Е. С. Мельников, А. В. Соколов и др., *Ведомости научного центра экспертизы средств мед. применения*, № 4, 20 – 25 (2015).
19. А. Н. Миронов (ред.), *Руководство по экспертизе лекарственных средств*, т. 1, Гриф и К, Москва (2013).
20. B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, C. M. Chavez-Eng, *Anal. Chem.*, **75**(13), 3019 – 3030 (2003).

Поступила 18.04.16

RAPID HPLC-MS/MS DETERMINATION OF CARBAMAZEPINE AND CARBAMAZEPINE-10,11-EPOXIDE

T. A. Rodina[1,3], E. S. Mel'nikov[2,3], A. V. Sokolov[1,2], A. B. Prokof'ev[1,2,3], V. V. Arkhipov[1,2,3], A. A. Aksenov[2], and D. L. Pozdnyakov[3]

[1] Federal Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow, 127051 Russia;

[2] I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia

[3] I. V. Davydovsky Municipal Clinical Hospital, Moscow City Department of Health Moscow, 109240 Russia

A new method for rapid simultaneous determination of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in human blood serum has been developed based on the HPLC-MS/MS technique. The analytical range was 50 – 20000 ng/mL for carbamazepine and 5 – 2000 ng/mL for carbamazepine-10,11-epoxide, which allows this method to be used for therapeutic drug monitoring, studying bioequivalence, and assessing interchangeability of carbamazepine-based preparations.

Keywords: carbamazepine; carbamazepine-10,11-epoxide; therapeutic drug monitoring; interchangeability; bioequivalence; HPLC-MS/MS.