

МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 615.074: 615.213

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ОСОБЕННОСТЕЙ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ВАЛЬПРАЗОЛАМИДА У КРОЛИКОВ

А.С. Малыгин, Н.С. Попов, М.А. Демидова, М.А. Горшкова

Тверской государственный медицинский университет, Тверь

В экспериментах на кроликах исследованы особенности фармакокинетики вальпрозоламида – нового противоэпилептического средства из группы вальпроатов. Определение содержания вальпрозоламида и его метаболитов в плазме крови и моче кроликов осуществляли хромато-масс-спектрометрическим методом. Хроматографию выполняли с использованием аналитической колонки Phenomenex Synergi C18 4 мкм 2,0×50 мм при температуре 40°C. В качестве подвижной фазы применяли смесь ацетонитрила и воды деионизированной в градиентном режиме; скорость потока подвижной фазы – 0,6 мл/мин. Масс-спектрометрическую идентификацию вальпрозоламида, его глюкуронида и фосфата осуществляли при положительной поляризации по значению MRM переходов: m/z 256,1 → m/z 130,1 и m/z 81,0; m/z 432,2 → m/z 129,1; m/z 336,1 → m/z 129,2 соответственно. Показано, что вальпрозоламид не метаболизируется до вальпроевой кислоты, его основными метаболитами являются глюкуронид и фосфат. Биодоступность вальпрозоламида при внутрижелудочном введении кроликам составила 85,3 %, $T_{1/2}$ =7,67 ч.

Ключевые слова: ВЭЖХ-МС/МС, хромато-масс-спектрометрия, вальпроаты, противоэпилептические средства, фармакокинетика.

DOI: 10.26456/vtbio38

Введение. Эпилепсия является одним из наиболее распространенных и опасных неврологических заболеваний, требующих постоянной фармакотерапии для надежного контроля за развитием судорожных припадков. В настоящее время в лечении эпилепсии и других заболеваний ЦНС, сопровождающихся эпилептическим синдромом, используют широкий арсенал основных и дополнительных противоэпилептических средств. Наиболее часто назначаемыми антиконвульсантами являются вальпроаты (соли и амиды вальпроевой кислоты) (Регисса, 2012, Фрейдкова и др., 2015). Препараты этой группы получают около 80% пациентов, страдающих эпилепсией различных форм (большие и малые приступы,

миоклоническая, тонико-клоническая и биполярная формы, эпилептический синдром). Новым противоэпилептическим средством из группы амидных производных вальпроевой кислоты является вальпрозоламид. В экспериментах на животных с использованием различных моделей эпилепсии вальпрозоламид продемонстрировал высокую противоэпилептическую активность в сочетании с низкой токсичностью. Важнейшим этапом изучения новых лекарственных средств являются экспериментальные фармакокинетические исследования, для проведения которых необходимы селективные и точные методики количественного определения аналитов в биологических объектах, в том числе в плазме крови и моче (Жердев, 2005).

В настоящее время одним из наиболее эффективных методов проведения аналитических исследований лекарственных средств является высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Разработаны методики хромато-масс-спектрометрии для идентификации и количественного определения вальпроевой кислоты (Zhao, 2016, Малыгин и др., 2018). Эти методики востребованы в практическом здравоохранении, так как необходимость проведения лекарственного терапевтического мониторинга вальпроатов показана в многочисленных исследованиях (Якунина, 2016, Леонова, 2017) и регламентирована нормативными документами (Приказ МЗ РФ от 22.10.2003 №494). Преимуществом ВЭЖХ-масс-спектрометрии при проведении фармакокинетических исследований наряду с высокой точностью является возможность определения не только лекарственного средства, но и его метаболитов.

Цель – с помощью хромато-масс-спектрометрии определить основные фармакокинетические параметры вальпрозоламида у кроликов.

Методика. Экспериментальные исследования выполнены с использованием 6 кроликов породы шиншилла. Животных содержали при постоянной температуре (22 ± 2 °C) и искусственном 12-часовом режиме дня и ночи (светлое время 08:00-20:00) со свободным доступом к воде и пище. Условия содержания животных соответствовали требованиям «Санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» № 1045-73, утвержденных Главным государственным санитарным врачом СССР 06.04.1973, и ГОСТ Р 53434-2009. Все эксперименты с животными проводили с соблюдением «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Directive 2010/63/EU) при наличии разрешения

этического комитета Тверского государственного медицинского университета.

Исследование осуществляли по открытой рандомизированной перекрёстной схеме. Вальпрозоламид вводили подкожным кроликам внутривенно в дозе 1 мг/кг в 0,33% растворе димексида или внутривенно в дозе 1 мг/кг в 20 мл 2% слизи крахмала. Период вымывания исследуемого вальпроата между этапами составлял 7 дней. Продолжительность мониторинга концентрации вальпрозоламида в плазме крови в среднем в 5 раз превышала период полувыведения ($T_{1/2}$). Забор крови осуществляли через катетер из краевой вены уха кроликов в обработанные натриевой солью гепарина пробирки в объеме 0,5 мл до начала исследования и через 0,016; 0,08; 0,16; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 10; 12; 24; 36 и 48 часов после введения вальпрозоламида. Для получения плазмы кровь центрифугировали в течение 10 минут при скорости 3000 оборотов в минуту. Пробоподготовку осуществляли методом осаждения белков ацетонитрилом. Для этого к 200 мкл исследуемого образца добавляли 800 мкл ацетонитрила. Пробу встряхивали на вортекс-шейкере в течение 30 секунд, термостатировали 20 минут при температуре 37°C, далее центрифугировали в течение 10 минут при 18000 об/мин, надосадочную жидкость использовали для исследования.

Определение вальпрозоламида и его метаболитов в плазме крови кроликов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС). Для хроматографии использовали хроматограф Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, ФРГ). Масс-спектрометрию осуществляли с помощью тройного квадрупольного масс-спектрометра AB Sciex QTrap 3200 MD (AB Sciex, Сингапур) с электрораспылительным источником ионов (Turbo V с зондом TurboIonSpray).

Для анализа образцов плазмы крови применяли следующие условия хроматографирования: неподвижная фаза – аналитическая колонка Phenomenex Synergi C18 4 мкм 2,0×50 мм при температуре 40°C; подвижная фаза – смесь ацетонитрила и воды деионизированной со следующим профилем градиента: 0 – 1 минута 10% водный раствор ацетонитрила; 1 – 3 минуты линейное повышение концентрации ацетонитрила в смеси до 90%; 3 – 4 минуты изократический участок с концентрацией ацетонитрила 90%; 4 – 5 минуты кондиционирование колонки 10% раствором; скорость потока подвижной фазы – 0,6 мл/мин; объем вводимой пробы – 20 мкл; общее время градиентного элюирования – 5 минут. Детекцию вальпрозоламида и его метаболитов (глюкуронида и фосфата) осуществляли масс-спектрометрически в режиме сканирования положительно заряженных ионов. Значения

MRM-переходов вальпрозоламида, его глюкуронида и фосфата составили соответственно: m/z 256,1 \rightarrow m/z 130,1 и m/z 81,0; m/z 432,2 \rightarrow m/z 129,2; m/z 336,0 \rightarrow m/z 129,2.

Аналитический диапазон ВЭЖХ-МС/МС методики определения вальпрозоламида составил 1 – 500 нг/мл. Разработанная методика была валидирована по параметрам селективности, кросс-переносу, линейности, точности, прецизионности, стабильности в соответствии с отечественными и международными требованиями (Guidance..., 2001).

В связи с тем, что вальпрозамид относится к группе вальпроатов для оценки его метаболических превращений во всех образцах плазмы крови подопытных кроликов проводили определение вальпрооевой кислоты и ее метаболитов хромато-масс-спектрометрическим методом (Малыгин и др., 2018).

По результатам количественного определения вальпрозоламида в плазме крови подопытных кроликов рассчитывали значения следующих фармакокинетических параметров: максимальную концентрацию вальпрозоламида в крови (C_{max}) и время ее достижения (t_{max}) после однократного внутрижелудочного введения, период полувыведения ($T_{1/2}$), время удерживания вещества в плазме (MRT), скорость всасывания (C_{max}/AUC); константу элиминации (k_{el}), клиренс (Cl), кажущийся объем распределения (V_d), объем распределения в системе 2-х камер (V_{ss}). Определяли значения площадей под фармакокинетической кривой $AUC_{0\rightarrow\infty}$ (от момента введения исследуемого соединения до бесконечности) и $AUC_{0\rightarrow48}$ (от момента введения исследуемого соединения до 48 ч) для внутрижелудочного и внутривенного введения. Расчет биодоступности исследуемого лекарственного средства при внутрижелудочном применении проводили по формуле (1):

$$Fa = \frac{AUC_{в/ж}}{AUC_{в/в}} \times 100\%$$

где F_a – биодоступность, %; $AUC_{в/ж}$ – площадь под фармакокинетической кривой при внутрижелудочном введении; $AUC_{в/в}$ – площадь под фармакокинетической кривой при внутривенном введении.

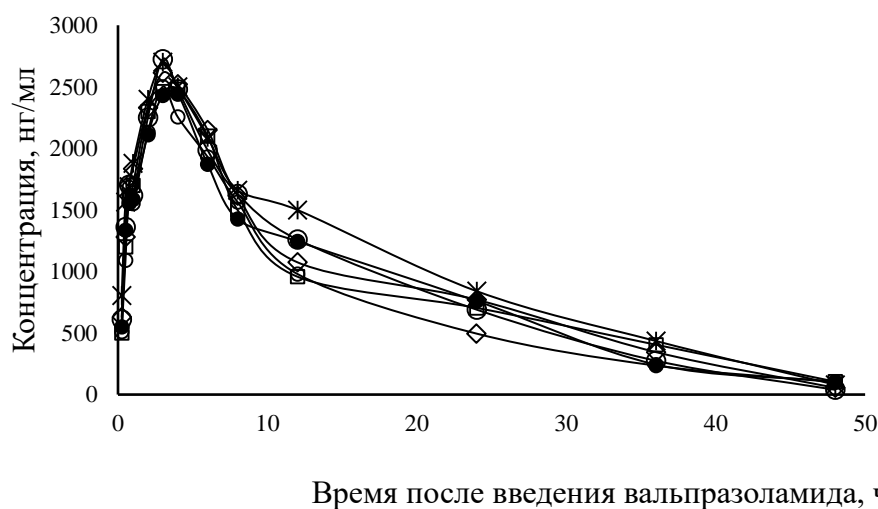
Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения AnalystSoft Inc., BioStat – 2009. Для каждого фармакокинетического параметра определяли среднее арифметическое (Mean), среднее геометрическое (GMean), стандартное отклонение (SD), значение коэффициента вариации (CV, %) и медианы (Median), доверительный интервал (L-95%; Uр-95%).

Результаты и обсуждение. Анализ результатов проведенного исследования показал, что после однократного внутрижелудочного

введения вальпрозоламида (1 мг/кг) его максимальное содержание в плазме крови подопытных кроликов отмечалось через 1,76 ч (95% ДИ: 1,59 – 1,93) и составляло 2564 нг/мл (95% ДИ: 2404 – 2724). Индивидуальные значения показателей и результаты статистической обработки данных представлены в таблице 1.

Таблица 1
Значения максимальной концентрации (C_{max}) вальпрозоламида в плазме крови и времени (t_{max}) ее достижения после внутрижелудочного введения вальпрозоламида в дозе 1 мг/кг

Показатель	C_{max} , нг/мл	t_{max} , Ч
1 кролик	2480	2,03
2 кролик	2610	1,82
3 кролик	2530	1,9
4 кролик	2605	1,55
5 кролик	2450	1,68
6 кролик	2710	1,58
Mean	2564	1,76
Gmean	2562	1,75
SD	96,2	0,18
CV, %	3,75	10,7
Median	2567	1,75
Min	2450	1,55
Max	2710	2,03
Доверительный интервал (L-95%; Up-95%)	2404 – 2724	1,59 - 1,93



Р и с . 1 . Зависимость концентрации вальпрозоламида в плазме крови кроликов от времени после однократного внутрижелудочного введения (1 мг/кг)

По результатам количественного определения вальпрозоламида в плазме крови кроликов в различные временные интервалы после внутривенного введения были построены графики зависимости концентрации исследованного лекарственного средства от времени (фармакокинетические кривые концентрация – время) (рис.1) и рассчитаны значения площадей под фармакокинетической кривой (табл. 2).

Таблица 2
Значения площадей под фармакокинетической кривой (AUC_{0-48} и $AUC_{0-\infty}$), при внутривенном введении вальпрозоламида в дозе 1 мг/кг

Показатель	AUC_{0-48} , нг×ч/мл	$AUC_{0-\infty}$, нг×ч/мл
1 кролик	37547	38328
2 кролик	39034	39368
3 кролик	34807	35521
4 кролик	40190	40414
5 кролик	36762	37504
6 кролик	42956	43486
Mean	38549	39104
Gmean	38463	39026
SD	2848	2720
CV, %	7,4	6,9
Median	38291	38849
Min	34807	35521
Max	42956	43486
Доверительный интервал (L-95%; Up-95%)	36270 – 40828	36928 – 41280

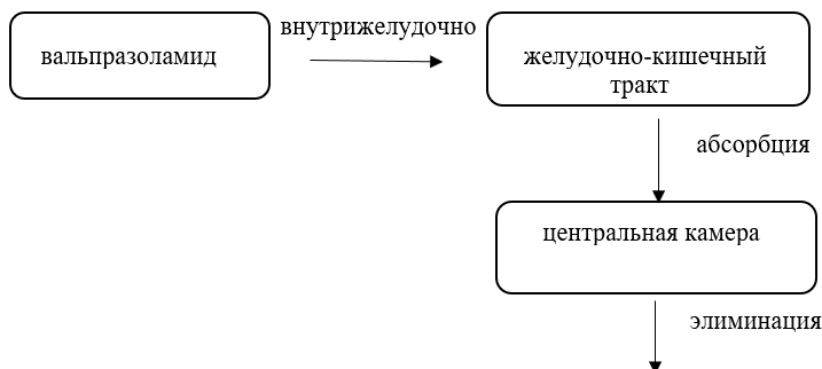
Было отмечено, что отношение $AUC_{48-\infty}/AUC_{0-48}$ составляло в среднем 1,4%, что свидетельствовало об адекватности продолжительности мониторинга концентрации исследуемого лекарственного средства в плазме крови.

Оценку фармакокинетических параметров при внутривенном введении вальпрозоламида осуществляли на основе построения однокамерной модели с всасыванием (рис. 2).

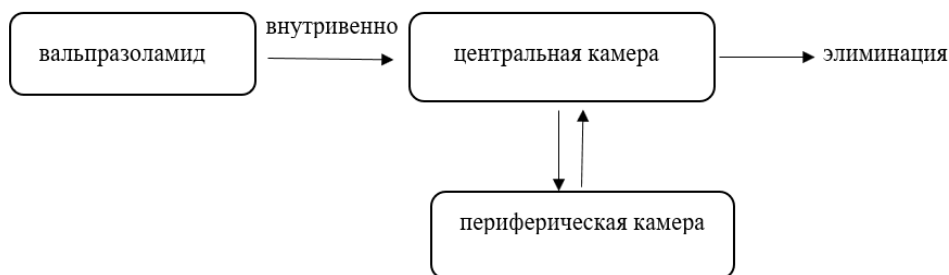
Проведенные в соответствии с использованной моделью расчеты показали, что значение $T_{1/2}$ при внутривенном введении вальпрозоламида составило 7,67 (95% ДИ: 7,15 - 8,19), MRT – 8,91 ч (95% ДИ: 8,19 - 9,63), C_{max}/AUC – 0,073 ч⁻¹ (95% ДИ: 0,067 - 0,079); kel – 0,105 ч⁻¹ (95% ДИ: 0,101 - 0,108), Cl – 2,67 л/ч/кг (95% ДИ: 2,58 - 2,76),

V_d – 31,52 л (95% ДИ: 28,77 - 34,27), абсолютная биодоступность – 85,3%.

Полученные данные свидетельствуют о том, что вальпрозамид, обладая высокой липофильностью, хорошо всасывается из желудочно-кишечного тракта, интенсивно проникает из кровеносного русла в периферические ткани и длительно в них удерживается.



Р и с . 2 . Однокамерная модель с всасыванием для оценки фармакокинетических параметров вальпрозамида после внутрижелудочного введения кроликам.



Р и с . 3 . Двухкамерная модель для оценки фармакокинетических параметров вальпрозамида после внутривенного введения кроликам.

При внутривенном введении уменьшение концентрации вальпрозамида в плазме крови подопытных кроликов имело 2-х фазный характер (α и β фазы). В α фазе в течение 45 минут наблюдалось быстрое снижение концентрации исследованного лекарственного средства в плазме крови, вероятно, за счет перераспределения в ткани (фаза распределения). В β фазе отмечалось медленное снижение концентрации вальпрозамида. Через 48 часов после внутривенного введения содержание исследуемого лекарственного средства в плазме крови приближалось к нижнему пределу количественного определения.

В связи с наличием 2-х линейных участков снижения концентрации фармакокинетические параметры вальпрозоламида при внутривенном введении описывали в соответствии с двухкамерной моделью, которая включает в себя центральную (кровь, интерстициальные ткани) и периферическую (ткани внутренних органов) камеры (рис.3).

Зависимость концентрации вальпрозоламида от времени в центральной и периферической камерах после однократного внутривенного введения (1 мг/кг) представлена на рис. 4.

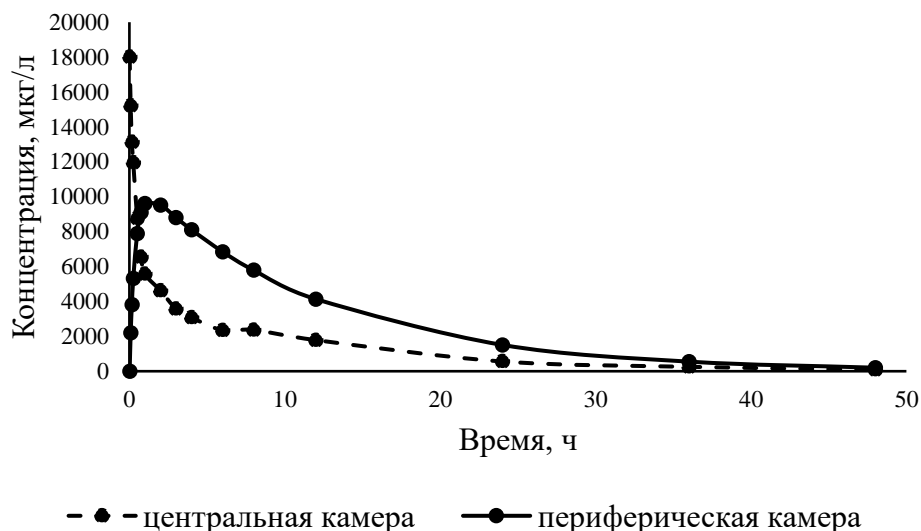
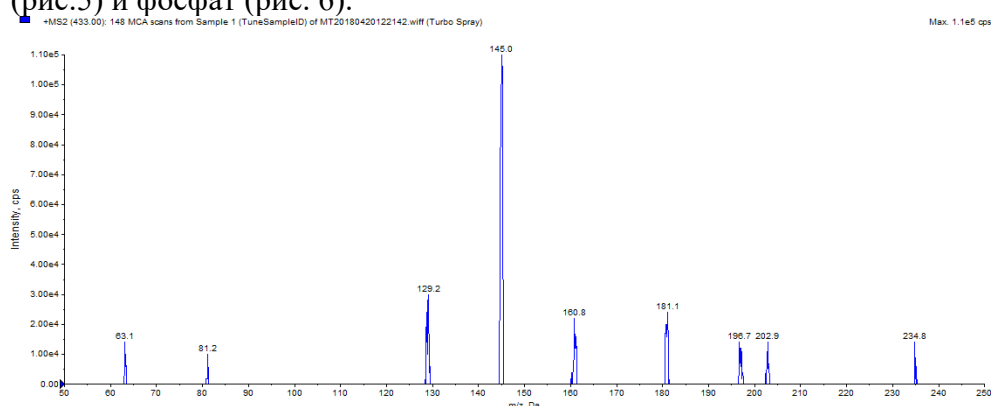


Рис. 4. Зависимость концентрации вальпрозоламида от времени в центральной и периферической камерах после однократного внутривенного введения (1 мг/кг).

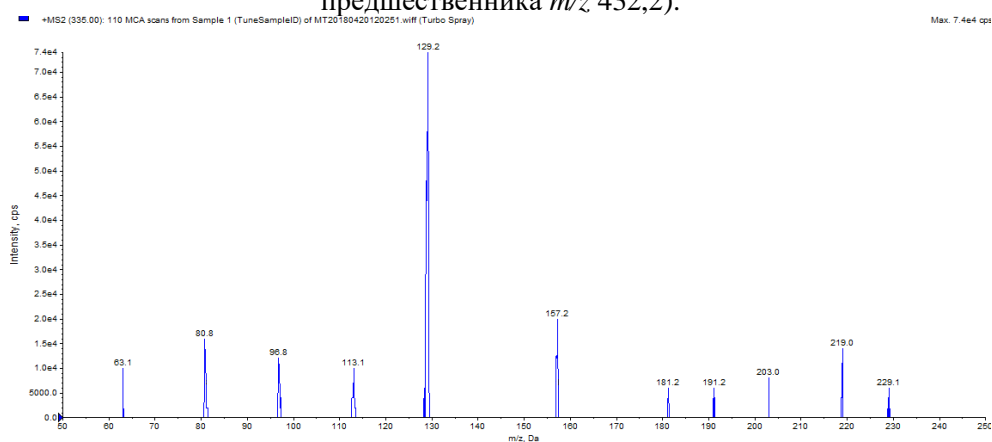
Концентрация вальпрозоламида в нулевой момент времени (C_0) после его внутривенного введения в дозе 1 мг/кг составила 18161 нг/мл, что соответствовало теоретической концентрации, рассчитанной путем деления количества исследуемого лекарственного средства, введенного подопытным кроликам на предполагаемый объем циркулирующей крови. Рассчитанное значение центрального объема распределения (V_1) 199 мл (95% ДИ: 191 - 207) также соответствовало среднему объему циркулирующей крови у кроликов массой $3,62 \pm 0,15$ кг. Значение стационарного объема распределения (V_{ss}) составило 566 мл/кг (95% ДИ: 545 - 587), что свидетельствовало об интенсивном проникновении вальпрозоламида в периферические ткани. Значение $T_{1/2}$ при внутривенном введении вальпрозоламида достоверно не отличалось от его значения при внутрижелудочном применении и было равно 8,22 ч (95% ДИ: 7,27 - 9,17). Площади под фармакокинетической кривой

($AUC_{0 \rightarrow 48}$ и $AUC_{0 \rightarrow \infty}$) составили соответственно 45391 нг×ч/мл (95% ДИ: 41910 - 48872) и 46422 нг×ч/мл (95% ДИ: 43187 - 49657), а отношение $AUC_{48 \rightarrow \infty}/AUC_{0 \rightarrow 48}$ – в среднем 2,2%.

Анализ содержания вальпрозоламида в моче подопытных кроликов показал, что в течение суток в неизменном виде выводится не более 0,05% исследуемого препарата. Большая часть вальпрозоламида подвергается метаболическим превращениям. Основными выявленными метаболитами исследуемого лекарственного средства в крови и моче подопытных кроликов были глюкуронид (рис.5) и фосфат (рис. 6).



Р и с . 5 . Масс-спектр глюкуронида вальпрозоламида 2 порядка (в режиме сканирования положительно заряженных ионов, для иона-предшественника m/z 432,2).



Р и с . 6 . Масс-спектр фосфата вальпрозоламида 2 порядка (в режиме сканирования положительно заряженных ионов, для иона-предшественника m/z 336,0).

Одновременно было показано, что в организме вальпрозоламид не метаболизируется до вальпроевой кислоты, так как в плазме крови и моче подопытных кроликов вальпроевой кислоты и ее метаболитов (в том числе продуктов окисления – 2-пропил-4-пентеновой, 3-гидрокси-

2-пропилпентановой, 4-гидрокси-2-пропилпентановой, 2-пропилпентандиовой и 3-оксо-2-пропилпентановой кислот) обнаружено не было.

Заключение. Использование хромато-масс-спектрометрического метода позволило определить содержание вальпрозоламида и его метаболитов в плазме крови и моче подопытных кроликов после его внутривенного и внутривенного введения. На основе проведенных исследований были рассчитаны основные фармакокинетические параметры нового противозепилептического средства из группы производных вальпроевой кислоты. Отмечена высокая биодоступность вальпрозоламида (85,3%) при внутривенном введении, что позволяет рекомендовать его для перорального применения. Вальпрозамид хорошо проникает в ткани и длительно в них удерживается. В организме практически полностью метаболизируется, в неизменном виде через почки с мочой выводится менее 0,05%, не метаболизируется до вальпроевой кислоты и не образует токсичных продуктов ее окисления. Основными направлениями метаболизма вальпрозоламида является конъюгация с глюкуроновой и фосфорной кислотами. Максимальная концентрация вальпрозоламида в плазме крови отмечается через 1,76 часа после внутривенного введения, а значение $T_{1/2}$ составляет 7,67, что позволяет определить оптимальный режим применения исследованного лекарственного средства.

Список литературы

- Белоусов Ю.Б., Леонова М.В., Штейнберг Л.Л., Тищенко И.Ф.* 2013. Терапевтический лекарственный мониторинг в реальной практике // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. № 3. С. 6-15.
- Жердев В.П., Литвин А.А.* 2005. Роль и организация фармакокинетических исследований // Клиническая фармакокинетика. Т. 3. № 2. С. 1-3.
- Леонова М.В., Ивжиц М.А., Тищенко И.Ф.* и др. 2017. Терапевтический лекарственный мониторинг антиконвульсантов у детей в реальной практике // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. Т. 9. № 1. С. 26-34.
- Малыгин А.С., Попов Н.С., Демидова М.А., Горшкова М.А.* 2018. Разработка и валидация методики ВЭЖХ-масс-спектрометрического определения вальпроатов в плазме крови // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. № 1. С. 47-57.
- Малыгин А.С., Попов Н.С., Демидова М.А., Кудряшова М.Н.* 2018. Определение вальпроевой кислоты и ее метаболитов в плазме крови методом ВЭЖХ- масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. № 2. С. 35-42.
- Малыгин А.С., Попов Н.С., Демидова М.А., Кудряшова М.Н., Горшкова М.А.* 2018. Использование ВЭЖХ-масс-спектрометрии для терапевтического

- лекарственного мониторинга вальпроатов // Верхневолжский медицинский журнал. Т. 17. Вып. 2. С. 27-33.
- Приказ МЗ РФ от 22.10.2003 №494 «О совершенствовании деятельности врачей клинических фармакологов».
- Фрейдкова Н.В., Пылаева О.В., Мухин К.Ю. 2015. Вальпарин XR в лечении эпилепсии (обзор литературы и описание клинических случаев) // Русский журнал детской неврологии. Т. 10. № 3. С. 37-42.
- Якунина А.В., Повереннова И.Е. 2016. Роль терапевтического лекарственного мониторинга при использовании противосудорожных препаратов // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. № 3. С. 66-73.
- Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), US Government Printing Office, Washington, DC, 2001.
- Perucca E. 2012. Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience // CNS Drugs. № 16(10). P. 695-714.
- Zhao M., Li G., Qiu F., Sun Zhao Y. 2016. Development and validation of a simple and rapid UPLC-MS assay for valproic acid and its comparison with immunoassay and HPLC methods // Ther Drug Monit. V. 38. No. 2. P. 246-252.

THE USE OF CHROMATO-MASS-SPECTROMETRY FOR INVESTIGATION OF THE PHARMACOKINETICS OF VALPRAZOLAMIDE IN RABBITS

A.S. Malygin, N.S. Popov, M.A. Demidova, M.A. Gorshkova
Tver State Medical University, Tver

The pharmacokinetics of valprazolamide, a new antiepileptic agent from the valproate group, were investigated in the experiments on rabbits. The concentration of valprazolamide and its metabolites in blood plasma and urine of rabbits was investigated by the chromatography-mass spectrometry. Chromatography was performed using an analytical column of Phenomenex Synergi C18 4 μm 2.0 \times 50 mm at 40 ° C. A mixture of acetonitrile and deionized water in a gradient mode was used as a mobile phase; the flow rate of the mobile phase was 0.6 ml / min. Mass-spectrometric identification of valprazolamide and its glucuronide and phosphate was carried out with positive ionisation mode according to the value of MRM transitions: m / z 256.1 \rightarrow m / z 130.1 and m / z 81.0; m / z 432.2 \rightarrow m / z 129.1; m / z 336.1 \rightarrow m / z 129.2, respectively. It is shown that valprazolamide is not metabolized to valproic acid; its main metabolites are glucuronide and phosphate. Bioavailability of valprazolamide with intragastric administration to rabbits was 85,3%, $T_{1/2} = 7,67$ hours.

Keywords: HPLS-MS-MS, chromatography-mass spectrometry, valproates, antiepileptics, pharmacokinetics.

Об авторах:

МАЛЫГИН Александр Сергеевич – клинический ординатор кафедры фармакологии, клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет Минздрава России», 170100, Тверь, ул. Советская, д. 4, e-mail: dr.a.s.m@yandex.ru.

ПОПОВ Никита Сергеевич – ассистент кафедры управления и экономики фармации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет Минздрава России», 170100, Тверь, ул. Советская, д. 4, e-mail: ns.popov@mail.ru.

ДЕМИДОВА Марина Александровна – доктор медицинских наук, заведующая кафедрой управления и экономики фармации, профессор, ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет Минздрава России», 170100, Тверь, ул. Советская, д. 4, e-mail: demidova.m.a@mail.ru.

ГОРШКОВА Марина Анатольевна – заведующая клинко-диагностической лабораторией поликлиники, ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет Минздрава России», 170100, Тверь, ул. Советская, д. 4, e-mail: lab-f@yandex.ru.

Малыгин А.С. Использование хромато-масс-спектрометрии для исследования особенностей фармакокинетики вальпрозоламида у кроликов / А.С. Малыгин, Н.С. Попов, М.А. Демидова, М.А. Горшкова // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2018. № 4. С. 191-202.