

Метод одновременного определения кломипрамина и амитриптилина в сыворотке крови методом ВЭЖХ-МС/МС

Т.А. Родина^{1,2}, Е.С. Мельников³, Н.А. Псарева³, А.В. Соколов^{1,3},
В.В. Архипов^{1,2,3}, Д.Л. Поздняков², В.Г. Кукеc^{1,3}

¹ – ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва

² – ГБУЗ «ГКБ № 23 им. Медсантруд» Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва

³ – ГБОУ ВПО Первый МГМУ им И.М. Сеченова Минздрава России, Москва

Контактная информация: к.х.н. Родина Татьяна Александровна, rodina@front.ru

Разработана селективная, чувствительная и воспроизводимая методика количественного определения кломипрамина и амитриптилина в сыворотке крови человека методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) с одновременным использованием электрораспыления (ESI) и химической ионизации при атмосферном давлении (APCI). Пробоподготовка проводилась путём осаждения белков ацетонитрилом. Детектирование осуществляли в режиме положительной ионизации путём мониторинга множественных реакций (MRM). Количественное определение проводили с использованием прометазина в качестве внутреннего стандарта. Калибровочная кривая носила линейный характер в диапазоне концентраций 5-1000 нг/мл для каждого препарата. Данная методика может быть использована для терапевтического лекарственного мониторинга.

Ключевые слова: кломипрамин, амитриптилин, прометазин, ВЭЖХ-МС/МС, персонализированная медицина, терапевтический лекарственный мониторинг.

Введение

По данным ВОЗ, распространенность депрессий в развитых странах составила 28%. Около 121 млн чел. во всем мире страдают депрессивными расстройствами, теряя при этом трудоспособность [5].

Развитие соматоформных депрессий сопровождается целым рядом соматических заболеваний и является важной составляющей частью в патогенезе хронических болевых синдромов [1, 4].

Основные симптомы, позволяющие подтвердить диагноз депрессии, – такие как сниженное настроение, тревога, отсутствие интереса к окружающим

событиям, апатия, двигательная и идеаторная заторможенность, нарушение концентрации, заниженная самооценка, нарушение сна и отсутствие аппетита – подвергаются регрессу при лечении антидепрессантами – препаратами, влияющими на серотонинергическую и норадреналинергическую медиаторные системы [7, 10, 11].

Для лечения тяжелых депрессий и депрессий средней степени тяжести, как правило, применяются трициклические антидепрессанты (ТЦА) – амитриптилин, кломипрамин, имипрамин. Известно, что эти препараты обладают узким терапевтическим интервалом [6].

Часто при проведении терапии ТЦА возникают выраженные нежелательные лекарственные реакции (НЛР), такие как сонливость и слабость в течение дня, ортостатическая гипотензия, аритмии, сухость во рту, запоры, задержка мочеиспускания, нарушение аккомодации, увеличение массы тела, нарушения половой функции и др., вынуждая пациентов отказываться от применения ТЦА из-за их плохой переносимости. Известно, что выраженность НЛР может быть связана с дисфункцией ферментов системы цитохрома Р450, в результате которой нарушается метаболизм препаратов и происходит их кумуляция в крови [2, 12]. Следовательно, при лечении депрессий ТЦА необходимо учитывать индивидуальные особенности фармакокинетики назначаемых препаратов посредством проведения фармакокинетического анализа. Данный вид обследования позволит проводить терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) концентрации антидепрессантов в крови, контролировать режим дозирования препаратов, повышая при этом безопасность применения ТЦА.

Кломипрамин (рис. 1а) – 3-(3-хлоро-10,11-дигидро-5Н-дibenзо-[b, f]

азепин-5-ил)-N,N-диметилпропан-1-амин. Благодаря стимуляции адренергических и серотонинергических механизмов в ЦНС, оказывает антидепрессантный эффект при лечении навязчиво-компульсивных нарушений.

Амитриптилин (рис. 1б) – 5-(3-диметиламинопропилиден)-10,11-дигидродибензоциклогептен. Распространенный в нашей стране антидепрессант. Тимоаналептическое (антидепрессивное) действие сочетается у него с выраженным седативным, снотворным и анксиолитическим (противотревожным) эффектом, по причине сильной холинолитической и антигистаминной активности. Является на сегодняшний день самым доступным и надёжным антидепрессантом.

От клинициста требуется, во-первых, добиться редукции и, во-вторых, определить минимальную дозу препарата, которая будет достаточна для контроля за депрессивной симптоматикой, но не будет вызывать дезадаптирующих побочных эффектов. Для решения этой задачи, особенно применительно к препаратам с узким терапевтическим диапазоном, необходимо проводить процедуру ТЛМ.

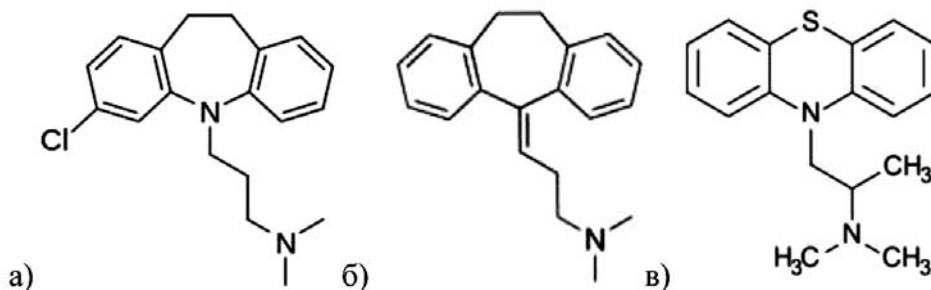


Рис. 1. Структурные формулы: а) кломипрамина, б) амитриптилина, в) прометазина.

Целью настоящего исследования явилась разработка методики одновременного количественного определения кломипрамина и амитриптилина при совместном присутствии в сыворотке крови человека с помощью ВЭЖХ-МС/МС для проведения терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ).

Материалы и методы

Жидкостный хромато-масс-спектрометр LCMS-8040 (система жидкостной хроматографии Nexera с тройным квадрупольным масс-спектрометром) фирмы Shimadzu (Япония), укомплектованный системой ионизации DUIS, т.е. одновременное использование двух методов ионизации (электрораспыление (ESI) и химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI)) системой градиентного элюирования, УФ-спектрофотометрическим детектором SPD-M20A с диодной матрицей (диапазон длин волн 190-800 нм), термостатом колонок CTO-20AC с диапазоном температур 4-90°C.

Пробоподготовку и последующий ВЭЖХ МС/МС-анализ проводили с использованием реактивов: ацетонитрил LiChrosolv® Reag. Ph Eur (марки «gradient grade for liquid chromatography»), муравьиная кислота (Merck), деионизованная вода (удельное сопротивление – 18,2 МОм*см). Для приготовления калибровочных растворов использовали: кломипрамин (Fluka), амитриптилин (Fluka), прометазин (внутренний стандарт) (Fluka), отвечающие требованиям USP. В качестве внутреннего стандарта использовали раствор прометазина в ацетонитриле 1000 нг/мл.

Хроматографическое разделение осуществляли на колонке ZORBAX Eclipse XDB-C18, 5 мкм, 150x4,6 мм (Agilent, США) при температуре 40°C. Подвижная фаза состояла из элюента А (0,1% муравьиной кислоты / деионизованная вода) и элюента В (0,1% муравьиной кислоты / ацетонитрил). Разделение проводилось в градиентном режиме элюирования (табл. 1). Скорость потока подвижной фазы – 0,8 мл/мин. Объем вводимой пробы – 10 мкл.

Таблица 1
Градиент состава подвижной фазы

Время анализа, мин	Объёмная доля элюента В, %
0,0 → 2,0	30 → 38
2,0 → 6,0	38 → 40
6,0 → 11,0	40 → 100
11,0 → 13,0	100
13,0 → 14,0	100 → 30

В режиме сканирования полного ионного тока (scan⁺) были выбраны ионы-предшественники: для кломипрамина – 315,10 m/z, амитриптилина – 278,10 m/z, прометазина – 285,10 m/z, что соответствует протонированным молекулярным ионам исследуемых веществ. Полученные ионы были обработаны в режиме сканирования фрагментных ионов (product scan⁺), после чего фрагментные ионы использовались для мониторинга множественных реакций (MRM⁺). Энергия соударений подбиралась экспериментально. В табл. 2 представлены параметры детектирования в режиме MRM⁺.

Таблица 2

**Параметры детектирования амитриптилина, прометазина и кломипрамина
в режиме MRM⁺**

№ п/п	Ион-предшественник, m/z	Фрагментный ион, m/z	Энергия соударений, В
Кломипрамина			
1	315,10	242,10	-28,0
2		227,10	-35,0
3		220,10	-35,0
4		192,10	-50,0
5		86,10	-20,0
Прометазина			
1	285,10	198,00	-30,0
2		86,00	-20,0
3		71,05	-50,0
Амитриптилина			
1	278,10	298,10	-25,0
2		191,10	-40,0
3		117,10	-35,0
4		105,10	-35,0

Аналитическая методика

К 200 мкл сыворотки крови пациента или 180 мкл чистой сыворотки с прибавлением 20 мкл стандартного раствора амитриптилина и кломипрамина добавляли 50 мкл раствора внутреннего стандарта (раствор прометазина) с концентрацией 1000 нг/мл для получения в конечном образце концентрации прометазина 250 нг/мл, затем добавляли 550 мкл ацетонитрила, встряхивали в течение 1 мин на шейкере Vortex V-3 (Латвия), после чего центрифугировали 15 мин со скоростью 15000 об./мин на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5427. Надосадочную жидкость переносили в хроматографические флаконы и помещали в автосамплер. Объём ввода пробы – 10 мкл.

Учитывая данные о фармакокинетике кломипрамина и амитриптилина, количественное определение изучаемых

веществ проводили в диапазоне 5-1000 нг/мл.

Валидация методики

Валидация методики выполнена по следующим характеристикам: селективность, линейность, правильность (внутри цикла и между циклами), прецизионность (внутри цикла и между циклами), предел количественного определения, перенос пробы, стабильность растворов [3, 8, 9].

Селективность методики оценивали при сравнении хроматограмм проб интактной («чистой») плазмы с прибавлением стандартных растворов кломипрамина, амитриптилина и прометазина с хроматограммами проб чистой плазмы. На хроматограмме пробы чистой плазмы не наблюдается пиков, соответствующих по временам удерживанию кломипрамину, амитриптилину и прометазину (рис. 2, 3).

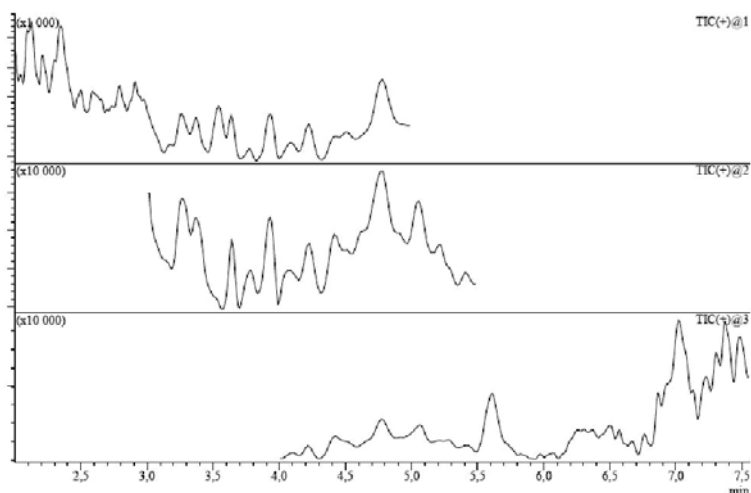


Рис. 2. Хроматограмма чистой сыворотки крови.

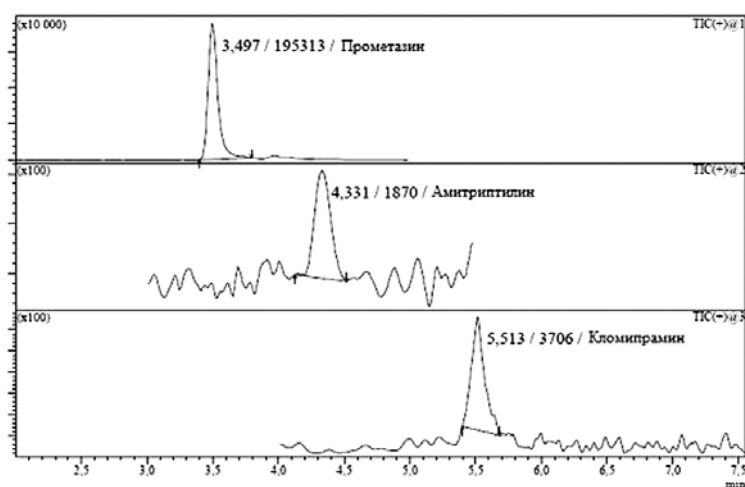


Рис. 3. Хроматограмма чистой сыворотки крови с прибавлением стандартного раствора кломипрамина и амитриптилина до концентрации 5,00 нг/мл в сыворотке крови.

При оценке линейности проводили анализ 7-ми проб чистой плазмы с добавлением стандартного раствора эналаприла и эналаприлата до получения концентраций 5, 50, 100, 250, 500, 750 и 1000 нг/мл. Построены калибровочные графики для амитриптилина (рис. 4) и кломипрамина (рис. 5). Уравнение калибровочной прямой для амитриптилина

имеет вид:

$$y = 0,411036 * x,$$

коэффициент корреляции (r) составляет 0,99406.

Уравнение калибровочной прямой для кломипрамина имеет вид:

$$y = 0,813638 * x,$$

коэффициент корреляции (r) составляет 0,99875.

Отклонения концентраций калибровочных растворов, рассчитанные по уравнениям линейной зависимости, укладываются в допустимые нормы отклонений ($\pm 20\%$ для нижней точки аналитического диапазона и $\pm 15\%$ для остальных точек).

При оценке правильности и прецизионности проводили анализ 4-х образцов чистой плазмы с прибавлением

стандартных растворов кломипрамина, амитриптилина до получения концентраций: 5, 50, 500, 1000 нг/мл. Анализ каждого раствора осуществляли по 5 раз в рамках двух аналитических циклов. Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и относительной погрешности (ϵ , %), приведенные в табл. 3 и 4.

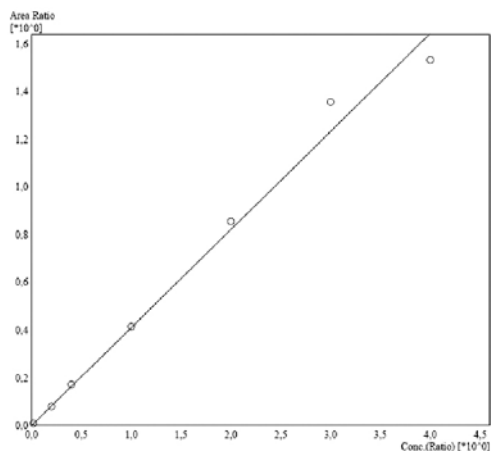


Рис. 4. Калибровочная прямая для амитриптилина.

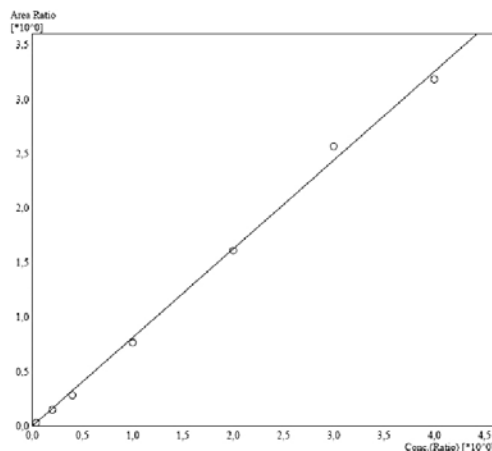


Рис. 5. Калибровочная прямая для кломипрамина.

Таблица 3
Правильность и прецизионность методики внутри аналитического цикла

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение (n=5)	S.D. (n=5)	RSD, % (n=5)	ϵ , %
Кломипрамин				
5,00	4,60	0,30	6,58	-8,04
50,00	50,18	2,57	5,12	0,36
500,00	515,40	16,28	3,16	3,08
1000,00	1028,58	87,13	8,47	2,86
Амитриптилин				
5,00	4,79	0,46	9,59	-4,27
50,00	51,08	5,40	10,58	2,16
500,00	535,27	13,26	2,48	7,05
1000,00	1070,44	118,68	11,09	7,04

Таблица 4

Правильность и прецизионность методики между аналитическими циклами

Введено (нг/мл)	Найдено (нг/мл), среднее значение (n=10)	S.D. (n=10)	RSD, % (n=10)	ε, %
Кломипрамин				
5,00	4,76	0,42	8,89	-4,88
50,00	49,68	2,43	4,89	-0,65
500,00	516,15	18,60	3,60	3,23
1000,00	1016,73	77,75	7,65	1,67
Амитриптилин				
5,00	4,95	0,40	8,12	-1,04
50,00	50,69	4,83	9,52	1,38
500,00	539,71	27,83	5,16	7,94
1000,00	1048,91	109,03	10,39	4,89

Предел количественного определения (ПКО) методики определяли на основании данных линейности, правильности и прецизионности. За ПКО методики принималась минимальная концентрация кломипрамина, амитриптилина в плазме, для которой возможно их количественное определение со значениями RSD и ε – не более 20% в диапазоне линейной зависимости. ПКО методики составил по 5 нг/мл для кломипрамина и амитриптилина.

Была подтверждена стабильность для стандартных растворов кломипрамина, амитриптилина и прометазина (при хранении раствора в течение 14 дней при температуре 2-8°C), кратковременная стабильность (для приготовленных проб в течение 24 ч при анализе на следующий день при температуре 5°C), на уровнях концентраций 5 и 1000 нг/мл. Образцы выдерживали 3 цикла замораживания/размораживания. Площадь пика при повторных анализах не менялась более чем на 10%.

При последовательном анализе проб с концентрацией кломипрамина и амитриптилина 1000 нг/мл и чистой плазмы

на хроматограмме последней отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания кломипрамину, амитриптилину и прометазину. Таким образом, перенос пробы отсутствовал.

Применение методики

Разработанная методика была применена для определения концентраций кломипрамина и амитриптилина в сыворотке крови пациентов, госпитализированных в клинику психиатрии им. С.С. Корсакова ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России с депрессивными расстройствами и принимавших лекарственные препараты амитриптилина и/или кломипрамина.

Первый забор крови у пациентов производили непосредственно перед приёмом препаратов в клинику. Часть пациентов принимали амитриптилин и/или кломипрамин постоянно, ещё до поступления в клинику, что объясняет обнаружение их в исходных пробах. Повторно пробы отбирали через 2 недели непрерывного перорального приема амитриптилина и/или кломипрамина. Части пациентов в начале лечения была

назначена комбинированная терапия с использованием и кломипрамина, и амитриптилина, что объясняет обнаружение обоих препаратов в пробах.

Результаты исследований

Полученные данные приведены в табл. 5, типичная хроматограмма представлена на рис. 6.

Таблица 5

Индивидуальные концентрации кломипрамина и амитриптилина в сыворотке крови пациентов

№ пациента	Концентрация кломипрамина в сыворотке крови, нг/мл	Концентрация амитриптилина в сыворотке крови, нг/мл
1	11,49	256,26
2	23,25	117,56
3	56,83	23,45
4	14,49	44,81
5	48,64	38,43
6	16,88	14,33

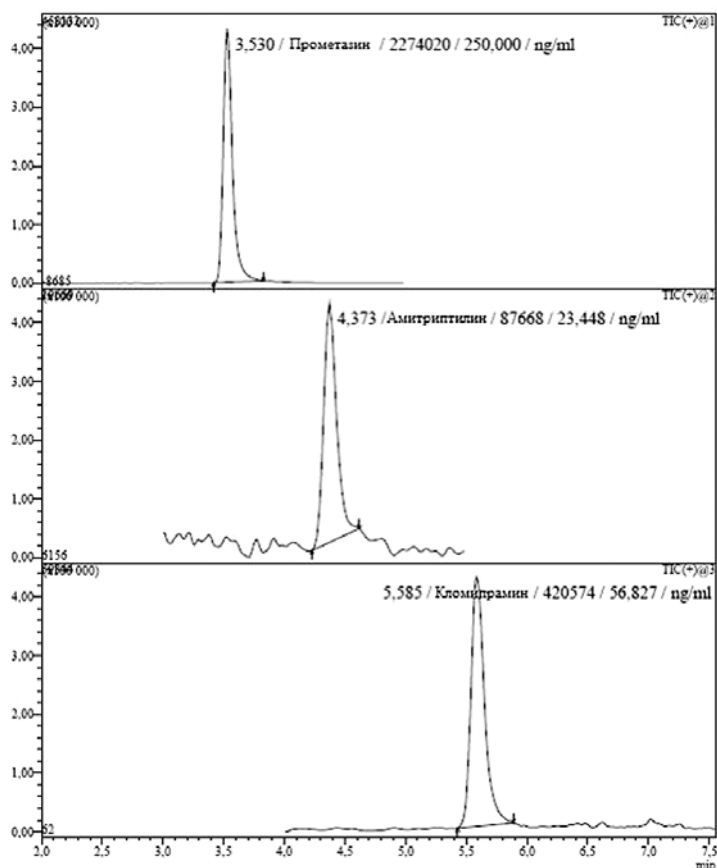


Рис. 6. Типичная хроматограмма пробы сыворотки крови (пациент № 3).

Заключение

Разработана методика количественного определения кломипрамина и амитриптилина в сыворотке крови человека с использованием прометазина в качестве внутреннего стандарта. Методика селективна, имеет аналитический диапазон 5-1000 нг/мл для обоих определяемых веществ, относительное стандартное отклонение и относительная ошибка результатов измерений не превышают 11,09 и 8,04% соответственно. Настоящая методика позволяет одновременно определять кломипрамин и амитриптилин в сыворотке крови человека с целью проведения терапевтического лекарственного мониторинга.

Список литературы

1. Акарачкова Е.С., Вершинина С.В. Синдром вегетативной дистонии или депрессия? Депрессивные расстройства в общесоматической практике // РМЖ. - 2010. - Т. 1. - № 26.
2. Кукес В.Г., Сычев Д.А., Гасанов Н.А. Проблемы клинической фармакогенетики на современном этапе // Клиническая медицина. - 2007. - Т. 85. - № 2. - С. 58-63.
3. Руководство по экспертизе лекарственных средств / под. ред. проф. А.Н. Миронова. Том I. - М.: Гриф и К, 2013. - 328 с.
4. Смуглевич А.Б., Дубницкая Э.Б., Дробизhev М.Ю. и др. Депрессии и возможности их ле-

чения в общемедицинской практике (предварительные результаты программы ПАРУС) // Consilium-medicum. - 2007. - Т. 2. - № 2. - С. 23-25.

5. Bromet E., Andrade L.H., Hwang I., Sampson N.A., Alonso J., de Girolamo G., de Graaf R., Demyttenaere K., Hu C., Iwata N., Karam A.N., Kaur J., Kostyuchenko S., Lepine J.-P., Levinson D., Matschinger H., Mora M.E.M., Browne M.O., Posada-Villa J., Viana M.C., Williams D.R., Kessler R.C. Cross-National Epidemiology of DSM-IV Major Depressive Episode // BMC Medicine, 2011.
6. Ciraulo D.A., Shader R.L., Greenblatt P.J. Drug interactions in psychopharmacology. In: Manual of Psychiatric therapeutic. Ed. Shader R. Little Brown and Comp (Inc.). - 1994. No. 193. - P. 8.
7. Coppen A. The biochemistry of affective disorders // Brit. J. Psych. - 1967. - No. 113. - Pp. 1237-64.
8. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of health and human services, food and drug administration, Center for drug evolution and research (CDER). - Washington, DC: U.S. Government printing office, 2001.
9. Guideline on bioanalytical method validation, European medicines agency, committee for medicinal products for human use. - London, 2011.
10. Hall H., Orgen S.O. Effects of antidepressant drugs on different receptors in the brain // Eur. J. Pharmacol. - 1981. - No. 70. - Pp. 393-407.
11. Lapin I.P., Oxenkrug G.F. Intensification of the serotonergic processes as a possible determination of the thymoleptic effect // Lancet. - 1969. - No. I(7587). - Pp. 132-6.
12. Murphy P.J. The development of drug metabolism research as expressed in the publications of ASPET: Part 3, 1984-2008 // Drug metabolism and disposition. - 2008. - Vol. 36. - No. 10. - Pp. 1977-1982.

Simultaneous determination of clomipramine and amitriptyline in human serum using HPLC-MS / MS

T.A. Rodina, E.S. Melnikov, N.A. Psarev, A.V. Sokolov, V.V. Arhipov,
D.L. Pozdnyakov, V.G. Kukes

Selective, sensitive and reproducible method for the quantitative determination of amitriptyline and clomipramine in human serum by reversed-phase high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC-MS / MS) using both electrospray (ESI) and chemical ionization at atmospheric pressure (APCI) was developed. Sample preparation was performed by protein precipitation with acetonitrile. Detection was performed in positive ionization mode by monitoring of multiple reactions (MRM). Quantification was performed using promethazine as internal standard. The analytical range of the method is 5-1000 ng / ml for each drug. This technique can be used for therapeutic drug monitoring.

Key words: clomipramine, amitriptyline, promethazine, HPLC-MS/MS, personalized medicine, therapeutic drug monitoring.