

# ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ВЭЖХ–МС/МС С ЦЕЛЬЮ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО МОНИТОРИНГА ИММУНОДЕПРЕССАНТОВ — ЦИКЛОСПОРИНА А И ЭВЕРОЛИМУСА

APPLICATION OF THE METHOD HPLC–MS/MS WITH THE AIM OF PROVIDING THERAPEUTIC DRUG MONITORING OF IMMUNOSUPPRESSANTS CYCLOSPORINE A AND EVEROLIMUS

**R. Oshnyuk**  
**E. Kolobova**  
**I. Ushal**  
**G. Rodionov**  
**P. Shabanov**

*Summary.* With the aim of therapeutic drug monitoring methods have been developed for the quantitative determination of pharmaceutical preparations chemotherapeutic purpose — cyclosporine a and everolimus. The basis of the developed methods — high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. All methods successfully implemented in the analysis of samples obtained from patients.

*Keywords:* therapeutic drug monitoring (TLM), pharmacokinetics, HPLC / MS, cyclosporine A, everolimus.

**Осешнюк Родион Александрович**

Аспирант, ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, ra081@mail.ru

**Колобова Екатерина Алексеевна**

Аспирант, ФГБУ ВЦЭРМ им. А. М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург,

**Ушал Инна Эдвардовна**

К.м.н., ФГБУ ВЦЭРМ им. А. М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург,

**Родионов Геннадий Георгиевич**

Д.м.н., ФГБУ ВЦЭРМ им. А. М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург,

**Шабанов Петр Дмитриевич**

Д.м.н., ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург,

*Аннотация.* С целью терапевтического лекарственного мониторинга разработаны методы количественного определения фармакологических препаратов химиотерапевтического назначения — циклоспорин А и эверолимуса. В основе разработанных методов — высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ–МС). Все методики успешно реализованы при анализе образцов, полученных от пациентов.

*Ключевые слова:* терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ), фармакокинетика, ВЭЖХ–МС, циклоспорин А, эверолимус.

## Введение

**О**пасность развития тяжелых, подчас необратимых осложнений вследствие лекарственной терапии привлекают к проблеме безопасности использования лекарственных препаратов внимание практических врачей и пациентов [1, 3].

ВОЗ формулирует неблагоприятные побочные реакции как любые непреднамеренные и вредные для организма человека реакции, которые возникают при использовании лекарственных препаратов в обычных дозах с целью профилактики, лечения и диагностики или для изменения физиологических функций.

Дети и пожилые пациенты являются теми группами населения, которые наиболее часто страдают от лекарственных осложнений [2, 6].

Лекарственный мониторинг — это измерение концентраций лекарственных средств в биологических средах организма (цельная кровь, плазма крови, моча и др.)

с целью подбора дозировки и режима приема препарата, обеспечивающих его оптимальную концентрацию в организме для достижения максимального терапевтического эффекта при минимальных токсическом. Это особенно важно при использовании веществ с узким терапевтическим диапазоном — ряда антибиотиков, антиаритмических препаратов, противосудорожных и противосудорожных препаратов, иммунодепрессантов.

Согласно п. 5.4 положения об организации деятельности лаборатории клинической фармакокинетики и фармакогенетики утвержденному приказом Минздрава РФ от 22 октября 2003 г. N494, лаборатория с целью профилактики неблагоприятных побочных реакций ЛС должна проводить фармакокинетические исследования, включающие основные группы и отдельные препараты:

- ◆ антиконвульсанты (фенобарбитал, карбамазепин, вальпроевая кислота);
- ◆ диметилксантины (теофиллин);
- ◆ ванкомицин;
- ◆ хинидин, новокаинамид, пропafenон, прокаинамид;

- ◆ фуросемид;
- ◆ метотрексат.

Перечень препаратов, подлежащих обязательному лекарственному мониторингу согласно приказу № 64 МЗ РФ от 21 февраля 2000 г. включает в себя:

- ◆ лекарственные средства, действующие на сердечно-сосудистую систему (дигитоксин, дигоксин, дизопирамид, лидокаин, мексилетин, хинидин, теofilлин);
- ◆ лекарственные средства, действующие на ЦНС (амитриптилин, галоперидол, диазепам, имипрамин, клоназепам, оксазепам, сиднокарб, хлордиазепоксид, хлорпромазин);
- ◆ противосудорожные средства (карбамазепин, фенитоин, фенобарбитал, этосукцимид, вальпроат натрия);
- ◆ нестероидные противовоспалительные средства (ацетоминифен, индометацин);
- ◆ противомикробные средства (амикацин, амфотерицин, гентамицин, ванкомицин);
- ◆ иммуносупрессоры (циклоспорин);
- ◆ средства для лечения онкологических заболеваний (метотрексат).

Для реализации ТЛМ оптимальным является применение метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ–МС/МС), как наиболее высокочувствительного, селективного и быстрого. Метод ВЭЖХ–МС/МС позволяет определять весьма широкий спектр препаратов, в то время, как другие методы, например, основанные на взаимодействии определяемого вещества с моноклональными антителами к нему, требуют специальных наборов, которые охватывают далеко не весь диапазон препаратов, рекомендованных к фармакологическому мониторингу.

Примером ситуаций, когда необходим ТЛМ препаратов с узким терапевтическим диапазоном, может быть лечение циклоспином А (терапевтический диапазон 100–400 нг/мл) и эверолимусом (терапевтический диапазон 2–12 нг/мл). Оба препарата относятся к группе иммунодепрессантов, применяемых с целью предотвращения отторжения трансплантата, а также с целью предотвращения реакции «трансплантат против хозяина» путем создания контролируемой иммуносупрессии [4,7].

Связь между базальной концентрацией эверолимуса и частотой подтвержденного биопсией острого отторжения и тромбоцитопении была выявлена у реципиентов почки и сердца в течение 6 мес после трансплантации [5]. При этом превышение терапевтической концентрации вызывает побочные реакции, зачастую достаточно тяжелые. Избыточная иммуносупрессия предраспола-

гает к развитию инфекций (часто оппортунистических), имеются данные о развитии сепсиса и фатальных инфекций. Также возможно развитие злокачественных новообразований.

При назначении препаратов, следует помнить, что концентрация препаратов в крови пациента зависит не только от дозы препарата, на нее оказывают существенное влияние такие факторы, как эффективность всасывания препарата, связывание с белками плазмы, эффективность метаболизма и выведения препарата. При этом терапевтическая эффективность напрямую зависит именно от концентрации действующего вещества в крови, для определения которой необходим ТЛМ [2].

## Материалы и методы

### Аналитическое оборудование:

высокоэффективный жидкостной хроматограф «Agilent 1200» с тройным квадруполом «Agilent 6440» ВЭЖХ–МС/МС; хроматографическая колонка Zorbax Eclips Plus-C18 4,6×100 мм×3,5 мкм или Poroshell 120 EC-C18 3.0×50 мм×2.7 мкм

### Оборудования для пробоподготовки:

- ◆ шкаф лабораторный в комплекте Koettermann 1800x900x2250;
- ◆ холодильник «ATLANT»;
- ◆ центрифуга Allegra 25R (BECKMAN COULTER, США);
- ◆ весы «Sartorius» (Германия) с измерением массы до 250 г. С точностью 0,0001–0,00001 г;
- ◆ вихревая мешалка типа «Vortex»;
- ◆ автоматические дозаторы фирмы Biohit с дозируемым объемом от 0,5 до 5000 мкл.

### Расходные материалы:

- ◆ микропробирки типа «эппендорф»;
- ◆ полипропиленовые флаконы (виалы) для анализируемых и градуировочных растворов вместимостью 250 мкл с защелкивающимися крышками фирмы Agilent.

### Реактивы:

- ◆ циклоспорин А, >97% сухое вещество; (TCI, Japan — C2408),
- ◆ эверолимус (fluka — 07741–10 mg-F);
- ◆ внутренние стандарты (циклоспорин DMS1112 — ClinMass — 18mkg), эверолимус d4- Santa Cruz Biotechnology — sc-218453);
- ◆ муравьиная кислота Agilent, номер по каталогу G 2453–85060.;
- ◆ метанол Baker HPLC analyzed» HPLC Far UV/ Gradient Grade;
- ◆ формиат аммония (fluka for HPLC ≥ 99.0%);
- ◆ Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Таблица 1. Хроматографические условия измерения

<b>Колонка</b>	<b>Poroshell 120 EC–C18 50 мм x 3.0 мм x 3.0 мкм</b>
Скорость элюирования	0.4 мл/мин
Подвижная фаза А	100 мМ раствор формиата аммония в воде, содержащей 0.1% муравьиной кислоты (5%)
Подвижная фаза Б	100 мМ раствор формиата аммония в метаноле, содержащем 0.1% муравьиной кислоты (95%)
Режим элюирования	изократический

Таблица 2. Условия измерений для масс- спектрометра

<b>Тип ионного источника</b>	<b>ESI positive polarity электроспрей, регистрация положительных ионов</b>
<b>Режим сканирования</b>	<b>MRM (мониторинг реакций заданных ионов)</b>
Параметры работы ионного источника:	325
Gas temperature, оС	9
Gas flow, л/мин	20
Nebulizer, psi	300
Sheath gas heater, оС	11
Sheath gas flow, л/мин	4500
Capillary, В	500
VCharging	

**Приготовление стоковых растворов (1 мг/мл):**

1. Фабричную навеску **эверолимуса** 10.0 мг помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл и добавляли 10 мл метанола. Содержимое колбы тщательно перемешивали до полного растворения эверолимуса.

2. Во флакон с фабричной навеской **эверолимуса-d4** 1 мг добавляли 1 мл метанола. Содержимое флакона тщательно перемешивали до полного растворения эверолимуса-d4.

3. Навеску **циклоспорина А** (100.0 ± 0.1 мг) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и добавляли около 50 мл метанола. Содержимое колбы тщательно перемешивали до полного растворения циклоспорина А и доводили до метки метанолом.

**Приготовление рабочих растворов:**

1. Рабочие растворы с массовой концентрацией **эверолимуса** 10.0, 20.0, 32.5, 75.0, 100.0, 125.0, 150.0, 175.0, 200.0 нг/мл (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) готовили из стандартного раствора, путем разбавления метанолом.

2. Рабочие растворы с массовой концентрацией **циклоспорина А** 250.0, 500.0, 1000.0, 2500.0, 5000.0, 7500.0, 10000.0 нг/мл (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) готовили из стандартного раствора, путем разбавления метанолом.

3. Рабочий раствор внутреннего стандарта с массовой концентрацией **эверолимус-d4** 100 нг/мл готовили из стандартного раствора, путем разбавления метанолом.

4. Во флакон с фабричной навеской **циклоспорина Д** 18 мкг добавляли 5 мл 70% метанола. Содержимое флакона тщательно перемешивали до полного растворения циклоспорина Д.

**Приготовление градуировочных растворов:**

1. Растворы для градуировки хроматографа (№ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9), что соответствует массовой концентрации **эверолимуса** в цельной крови от 1 до 20 нг/мл, готовили непосредственно перед проведением измерений в микроцентрифужных пробирках (типа «Эппендорф») вместимостью 1.5 мл. К 90 мкл интактной крови добавляли 10 мкл соответствующего рабочего раствора эверолимуса, приготовленного по п. 3.1.3., и 20 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта — эверолимус-d4, перемешивали, затем, для осаждения белков, добавляли 200 мкл 1% раствора сульфата цинка в 80% метаноле. Содержимое пробирок тщательно перемешивали с помощью перемешивающего устройства типа Vortex в течение 10 мин, после чего центрифугировали 10 мин со скоростью 4000 об/мин. К 100 мкл надосадочного слоя добавляли 100 мкл метанола для осаждения солевых примесей, перемешивали, затем центрифугировали в течение 5 минут со скоростью 4000 об/мин. Надосадочный слой переносили в чистые виалы и анализировали методом ВЭЖХ/МС/МС путем ввода 5 мкл образца.

2. Растворы для градуировки хроматографа (№ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7), что соответствует массовой концентрации **циклоспорина А** в цельной крови от 25 до 1000 нг/мл, готовили непосредственно перед проведением измерений в микроцентрифужных пробирках (типа «Эппендорф») вместимостью 1.5 мл. К 90 мкл интактной крови добавляли 10 мкл

Таблица 3. Параметры сканирования ионов

Фармсубстанция	Ион-прекурсор	Ион-фрагмент	Напряжение на фрагменторе (fragmentor), V	Энергия соударений (collision energy), V
Эверолимус	975.6	908.5	185	15
BC 1 — Эверолимус d4	979.6	912.5	170	12
Циклоспорин А	1220	1203	175	12
BC 2 — Циклоспорин Д	1234	1217	185	12

Таблица 4. Схема метода количественного определения циклоспорина А и эверолимуса

	Циклоспорин А	Эверолимус
Биоматериал	цельная кровь (0.1 мл)	цельная кровь (0.1; 0.5 мл)
Внутренний стандарт	Циклоспорин Д	Эверолимус d4
Пробоподготовка	осаждение белков ZnSO <sub>4</sub> в 80% метаноле, осаждение солевых примесей метанолом	осаждение белков ZnSO <sub>4</sub> в 80% метаноле, осаждение солевых примесей метанолом или жидкостная-жидкостная экстракция МТВЕ
Аналитическая колонка	Zorbax Eclips plus-C18 4.6x100 ммx3.5 мкм (Poroshell 120 EC-C18 3.0x50 ммx2.7 мкм)	
Режим элюирования	Изократический (5% 100 мМ NH <sub>4</sub> COOH в H <sub>2</sub> O+ 95% 100 мМ NH <sub>4</sub> COOH в CH <sub>3</sub> OH+0.1% f.a.)	
Линейный диапазон	25÷1000 нг/мл.	1.0÷20 нг/мл
Время анализа	4.5 (2.5) минуты	3.0 (1.5) минуты

соответствующего рабочего раствора циклоспорина А, 10 мкл рабочего раствора внутреннего стандарта — циклоспорина Д, перемешивали, затем, для осаждения белков, добавляли 200 мкл 1% раствора сульфата цинка в 80% метаноле. Содержимое пробирок тщательно перемешивали с помощью перемешивающего устройства типа Vortex в течение 10 мин, после чего центрифугировали 10 мин со скоростью 4000 об/мин. К 100 мкл надосадочного слоя добавляли 100 мкл метанола для осаждения солевых примесей, перемешивали, затем центрифугировали в течение 5 минут со скоростью 4000 об/мин. Надосадочный слой переносили в чистые виалы и анализировали методом ВЭЖХ/МС/МС путем ввода 5 мкл образца.

**Параметры хроматографической системы:**

Работа выполнена с помощью аналитического комплекса высокоэффективный жидкостной хроматограф «Agilent 1200» с тройным квадруполем «Agilent 6440». Параметры хроматографической системы приведены в таблицах 1–3.

В таблице 4 представлена схема анализа содержания циклоспорина А и эверолимуса в образце

**Результаты**

Исследование показало линейность калибровочной кривой для эверолимуса в диапазоне концентраций от 1 нг/мл до 20 нг/мл и для циклоспорина А в диапазоне от 25 нг/мл до 1000 нг/мл ( $r > 0,99$ ). Примеры градуировочной зависимости для эверолимуса и циклоспорина А приведен на рисунках 1 и 2 соответственно.

Нижний предел количественного обнаружения данного метода — 1 нг/мл для эверолимуса и 25 нг/мл для циклоспорина А. Аналиты в данной концентрации определяются в виде узких симметричных пиков с соотношением сигнал: шум не менее 10:1. Типичные хроматограммы образцов с концентрациями эверолимуса и циклоспорина А, соответствующими нижним пределам количественного обнаружения приведен на рисунках 3 и 4 соответственно.

Для оценки селективности метода были проанализированы пробы интактной цельной крови, не содержащей аналиты, из 6-ти различных источников. Результаты контроля признаны удовлетворительными, так как на масс-хроматограммах отсутствовали пики при заданных переходах масс с отношением сигнал: шум, превышающим 3:1.

Оценка прецизионности выполнена по результатам анализа модельных проб плазмы на четырех уровнях концентраций в необходимом количестве повторностей (не менее пяти). Результаты приведены в табл. 5.

Пробы цельной крови с массовыми концентрациями эверолимуса и циклоспорина А, соответствующими нижним пределам количественного определения (LLOQ), средним и высшим диапазонам измерения готовили на основе интактной цельной крови.

Результаты контроля признаны приемлемыми, так как выполнялось условие:

$$|S_{внт} - S_{нт}| < 15\%, \tag{6}$$

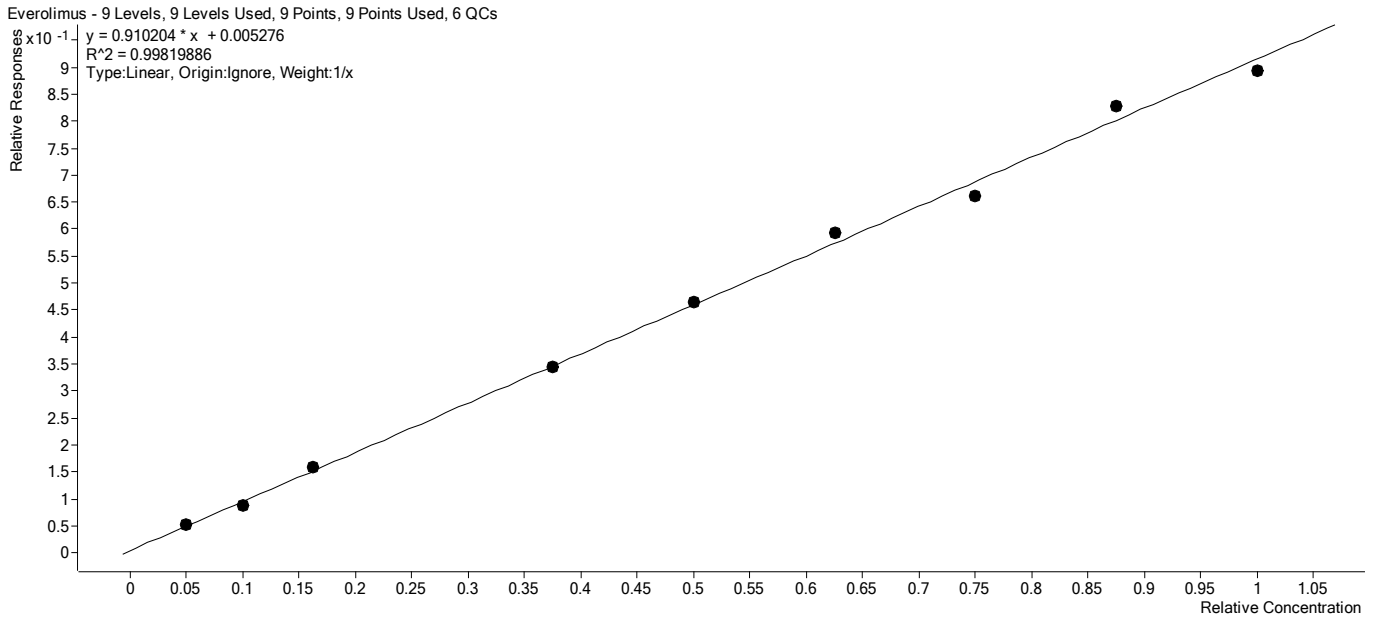


Рис. 1. Пример градуировочной зависимости для эверолимуса в диапазоне 1÷20 нг/мл.

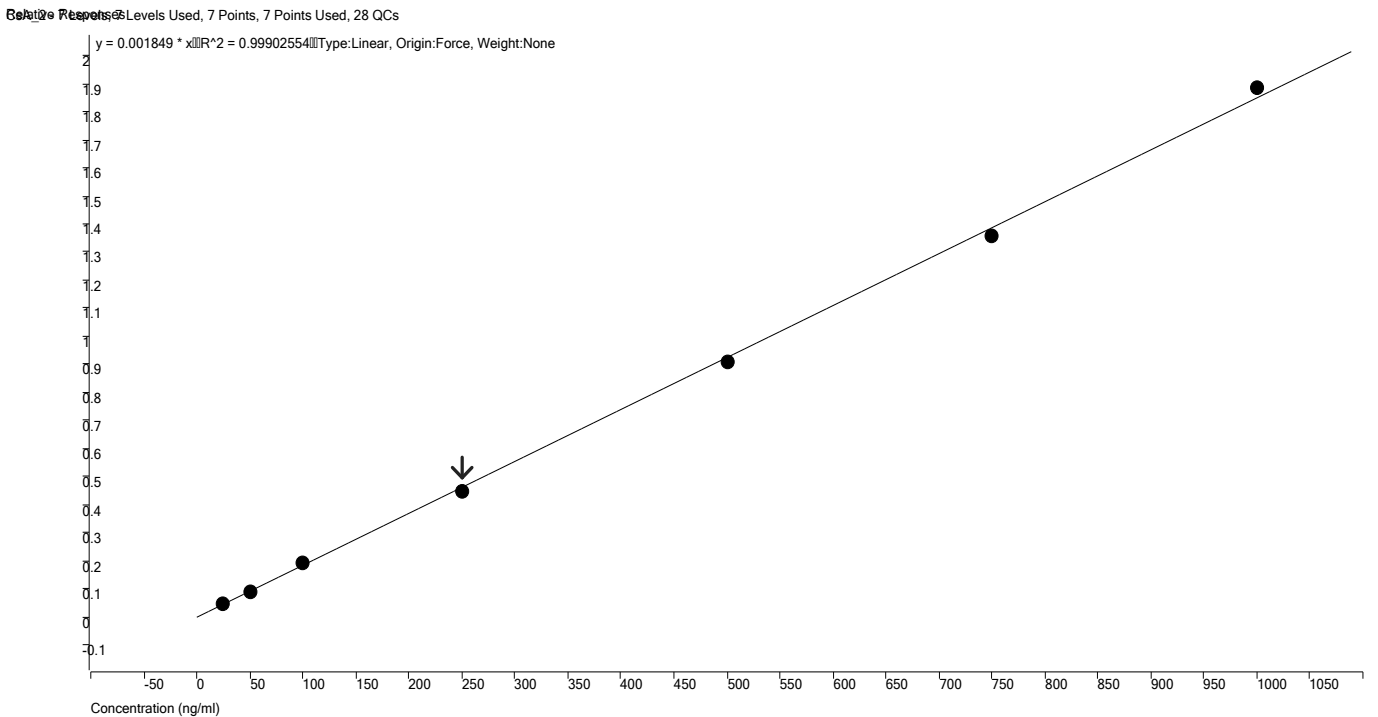


Рис. 2. Пример градуировочной зависимости для циклоспорина А в диапазоне 25÷1000 нг/мл.

где СвНТ — массовая концентрация аналита, внесенного в пробу цельной крови;

СНТ — массовая концентрация аналита в пробе, найденное значение.

Для нижнего предела количественного определения этот показатель не превышал 20%.

### Заключение

Реализован количественный анализ циклоспорина А и эверолимуса методом ВЭЖХ–МС/МС. Линейный диапазон метода охватывает весь спектр концентраций препаратов, возможный в образцах пациентов. Представленный метод позволяет в течение 4.5 минутного анализа определить количество двух иммуносупрессо-

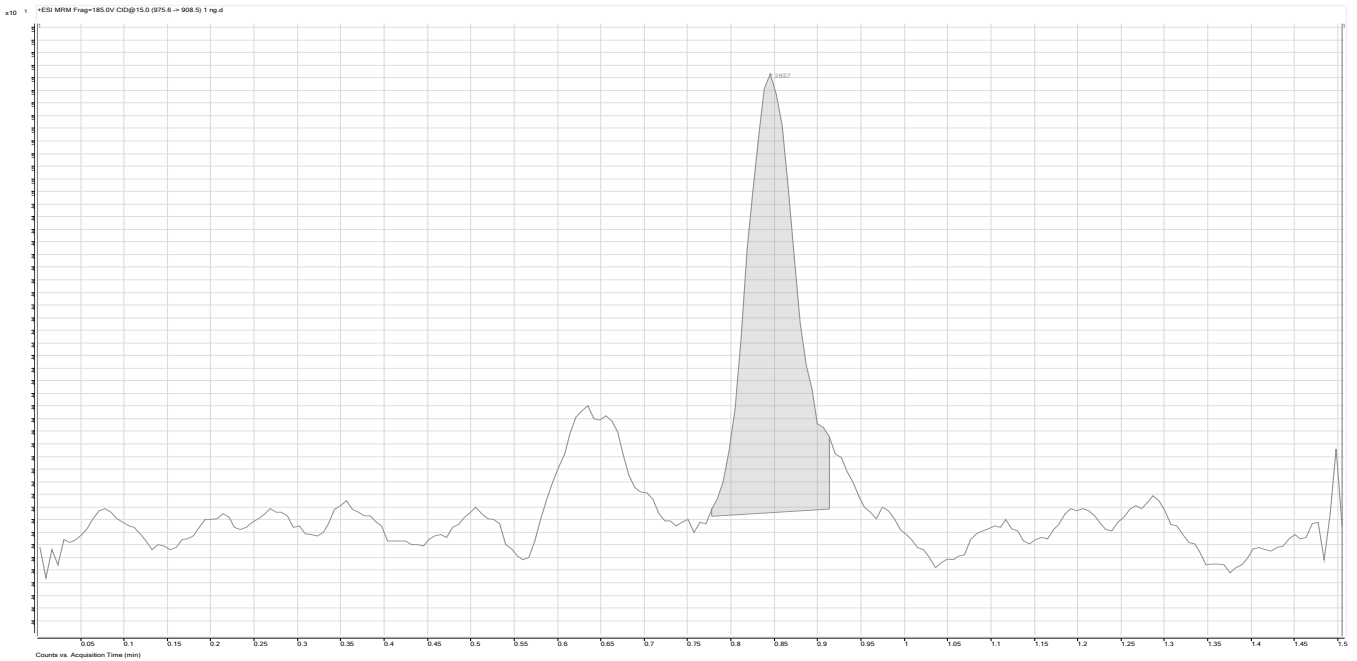


Рис. 3. Хроматограмма стандартного образца с концентрацией эверолимуса 1 нг/мл.

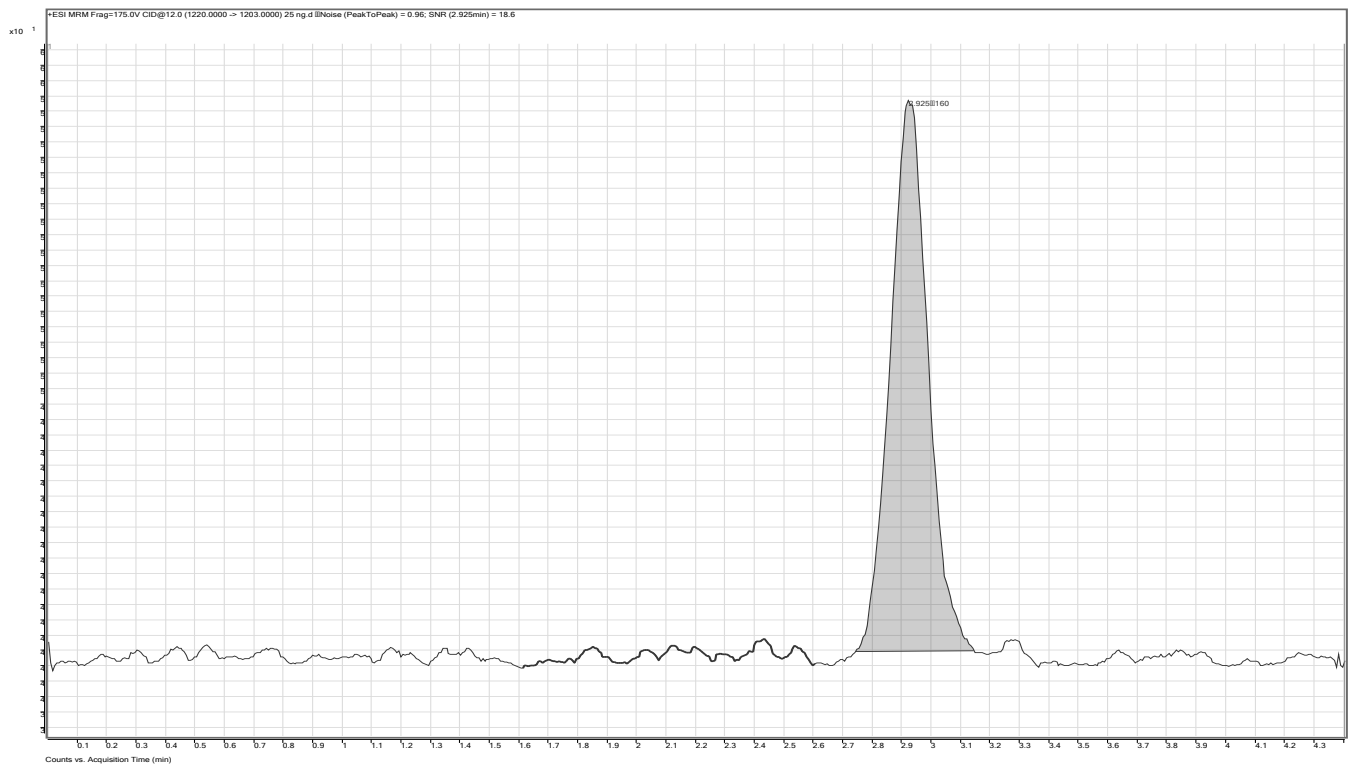


Рис. 4. Хроматограмма стандартного образца с концентрацией циклоспорина А 25 нг/мл.

ров, применяемых, в том числе, и комплексно у одного пациента. Приведенные методики являются простыми, воспроизводимыми, быстрыми и надежными. Используемый простой способ осаждения белков при приготовлении образцов и быстрое хроматографическое разделение аналитов и эндогенных компонентов цельной

крови дает приемлемый результат без каких-либо значимых эффектов наложения.

Проведена валидация аналитической методики количественного определения эверолимуса и циклоспорина А в цельной крови человека методом высокоэф-

Таблица 5. Прецизионность определения эверолимуса и циклоспорина А в цельной крови

Концентрация эверолимуса в стандартном образце, нг/мл	Mean±SD (нг/мл)	RSD (%)
1.0	0.94±0.09	9.2
2.0	1.91 ± 0.15	8.1
7.5	7.54±0.28	3.7
20.0	19.6 ± 0.4	2.1
Концентрация циклоспорина А в стандартном образце, нг/мл	Mean±SD (нг/мл)	RSD (%)
25.0	24.3±1.1	4.5
250.0	243.4±8.4	3.5
750.0	752.9±19.9	2.6

фективной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Чувствительность метода составила 1 нг/мл для эверолимуса и 25 нг/мл для циклоспорина А. Воспроизводимость, прецизионность и правильность достигается во всем интервале концентраций. Анализируемые вещества стабильны при хранении в автосэмплере при температуре +15÷+25 °С в течение 24 часов после пробоподготовки.

Приведенный метод успешно применен для определения эверолимуса и циклоспорина А в реальных образцах

цельной крови. Количественный анализ циклоспорина А успешно внедрен в лечебно-диагностическую деятельность ФГБУ ВЦЭРМ им. А. М. Никифорова МЧС России.

На примере приведенных методов анализа, показана возможность реализации с помощью одного комплекса ВЭЖХ–МС/МС терапевтического лекарственного мониторинга практически всех фармакологических препаратов, для которых с целью обеспечения эффективности и безопасности их применения существует таковая необходимость.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Астахова А.В., Брайцева Е. В., Лепяхин В. К. Контроль безопасности лекарственных средств // Фармация, 2000, 4, 38–40.
2. Дедов И.И., Тюльпаков А. Н., Чехонин В. П. [и др.]. Персонализированная медицина: современное состояние и перспективы, ВЕСТНИК РАМН /2012/ № 12
3. Чекалаева И. И. Фальсификация лекарственных средств — проблема решаемая // Новая аптека, 2001, 6, 48–51.
4. Brignol N, McMalon LM, Luo S, et al. High-throughput semi-automated 96-well liquid/liquid extraction and liquid chromatography/mass spectrometric analysis of everolimus (RAD001) and cyclosporine A (CsA) in whole blood. Rapid Commun Mass Spectrom 2002;15:1–10. —2
5. Kovarik JM, Kaplan B, Silva HT, et al. Exposure-response relationships for everolimus in de novo kidney transplantation: defining a therapeutic range. Transplantation 2002; 73(6):920–5.
6. Mannesse C.K., Derkx F. H., de Ridder M. A., Man in't Veld A. J., van der Cammen T. J. Contribution of adverse drug reactions to hospital admission of older patients, Age Ageing, 2000, 29 (1), 35–39.
7. Norman B. Roberts et al. Evaluation of a novel semi-automated HPLC procedure for whole blood cyclosporin A confirms equivalence to adjusted monoclonal values from Abbott TDx, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2005, v.43, No 2, p.228–236

© Осешнюк Родион Александрович ( ra081@mail.ru ), Колобова Екатерина Алексеевна,  
Ушал Инна Эдвардовна, Родионов Геннадий Георгиевич, Шабанов Петр Дмитриевич.  
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»