

## МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТИЛДОПЫ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

А. Л. Хохлов<sup>1</sup>, Ю. А. Джурко<sup>2</sup>, V. Kubes<sup>2</sup>, Л. Н. Шитов<sup>1,2</sup>, И. И. Яичков<sup>1</sup>, А. М. Шитова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ярославский государственный медицинский университет,  
<sup>2</sup>Квинта-Аналитика, Ярославль

Разработана экспрессная и чувствительная методика количественного определения метилдопы в плазме крови с применением ВЭЖХ-МС/МС. Динамический диапазон измерения концентраций составил 0,02–3,00 мкг/мл. Данная методика использована для проведения исследования фармакокинетики таблетированной формы метилдопы.

**Ключевые слова:** метилдопа, ВЭЖХ-МС/МС, плазма, стабилизация, фармакокинетика.

DOI 10.19163/1994-9480-2017-3(63)-105-108

## A METHOD FOR QUANTIFICATION OF PLASMA CONCENTRATIONS OF METHYLDOPA

A. L. Khokhlov<sup>1</sup>, Y. A. Dzhurko<sup>2</sup>, V. Kubes<sup>2</sup>, L. N. Shitov<sup>1,2</sup>, I. I. Yaichkov<sup>1</sup>, A. M. Shitova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Yaroslavl State Medical University,  
<sup>2</sup>Quinta-Analytica, Yaroslavl

We developed a rapid and sensitive method for quantifying plasma concentrations of methyldopa using HPLC-MS/MS. The range of concentration measurements was 0,02–3,00 µg/ml. The method was applied for pharmacokinetic study of methyldopa tablet formulations.

**Key words:** methyldopa, HPLC-MS/MS, plasma, stabilization, pharmacokinetics.

Метилдопа (МД) – антигипертензивное средство центрального действия. Его активный метаболит, α-метилнорадреналин, является агонистом центральных пресинаптических α<sub>2</sub>-адренорецепторов. Согласно международным и отечественным рекомендациям данный препарат относится к первой линии лекарственных средств для лечения гипертонии беременных [1, 3].

Существуют методики количественного определения метилдопы в плазме крови с использованием ВЭЖХ с флюориметрическим [2, 3] и масс-спектрометрическим [1, 4] детектированием, недостатками которых являются длительная пробоподготовка с применением жидкостно-жидкостной экстракции [1, 2, 3] и низкая чувствительность [4]. Также авторами не указан используемый стабилизатор: хорошо известно, что двухатомные фенольные соединения легко окисляются в процессе хранения биологических жидкостей [5].

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработка новой экспрессной методики количественного определения метилдопы в плазме для

проведения исследования биоэквивалентности, обеспечивающей стабильность определяемого вещества при хранении и в ходе выполнения аналитических процедур.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве стандартного образца определяемого вещества была использована метилдопа сесквигидрат (Teva Pharmaceuticals, Израиль), в качестве внутреннего стандарта D,L-Метилдопа-D3 (МД- D3) (TLC Pharma Chem, Канада) (рис. 1).

Работа выполнена с использованием ВЭЖХ-МС/МС-системы Shimadzu, оснащенной двумя насосами LC-20AD, автосемплером SIL-20AC с устройством подачи проб Rack Changer II, термостатом колонок СТО-20AC с интегрированным 6-портовым краном FCV-32AH и трехквадрупольным масс-спектрометрическим детектором LCMS-8050.

В качестве раствора стабилизатора применялся водный раствор, содержащий аскорбиновую кислоту в концентрации 50 мг/мл, натрия сульфит – 2 мг/мл,



Рис. 1. Структурные формулы метилдопы (А) и внутреннего стандарта – дейтерированной метилдопы (Б)

натрия гидрокарбонат – 24 мг/мл. Модельные смеси готовились путем прибавления к 950 мкл бланковой плазмы 50 мкл растворов МД в метаноле. Затем к валидационным образцам добавлялся раствор стабилизатора из расчета 0,2 мл раствора стабилизатора на 1 мл плазмы. При этом концентрации анализата в калибровочных образцах составили 0,02; 0,10; 0,25; 1,00; 1,50; 2,00; 2,50; 3,00 мкг/мл; в образцах КК – 0,02; 0,06; 0,30; 1,20; 2,40; 3,00 мкг/мл.

При пробоподготовке аликвоту плазмы 100 мкл подвергали депротеинизации 400 мкл раствора МД-D3 0,125 мкг/мл в метаноле, полученную смесь встряхивали на вортексе в течение 30 с при частоте 2400 мин<sup>-1</sup>, подвергали центрифугированию в течение 10 мин при 3500 об./мин и температуре +4 °С. Затем надосадочную жидкость вводили в хроматографическую систему.

Для хроматографического разделения компонентов биологической пробы использовались две хроматографические колонки Phenomenex Luna Phenyl-Hexyl (50 x 3,0 мм, 5 мкм) и Phenomenex Synergi Fusion – RP 80Å (150 x 3,0 мм, 4 мкм). Элюирование проводили в изократическом режиме с применением подвижной фазы (ПФ) на основе метанола, воды и водного раствора формиата аммония в концентрации 80 ммоль/л. Масс-спектрометрической детектирование проводилось с применением электрораспылительной ионизации в режиме регистрации положительных ионов по следующим MRM-переходам: для МД – 211,95 → 138,90 m/z; для МД-D3 – 214,95 → 169,00 m/z.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Исследование стабильности метилдопы в плазме крови.** Предварительная оценка стабильности метилдопы в плазме крови проводилась на модельных смесях с концентрацией 3 мкг/мл без добавления и с добавлением раствора стабилизатора при комнатной температуре и при замораживании до температуры -20 °С (рис. 2, табл. 1). В качестве антикоагулянта был использован КЗЭДТА.

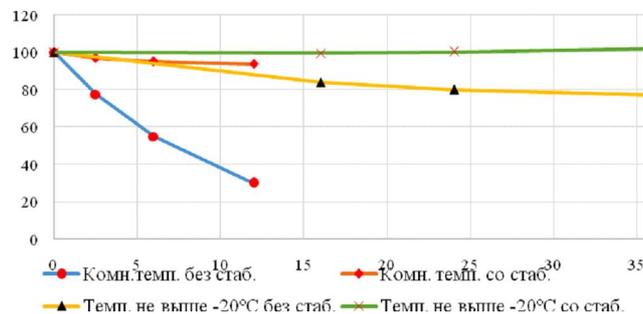


Рис. 2. Стабильность метилдопы в плазме крови при комнатной температуре и при замораживании до температуры не выше -20 °С

## Предварительная оценка стабильности метилдопы в плазме крови при комнатной температуре и при замораживании

Время, ч	Комнатная температура концентрация, % от исходного уровня	
	без добавления стабилизатора	с добавлением стабилизатора
0	100,0	100,0
2,5	77,6	97,1
6	55,1	95,2
12	29,9	93,8
Температура не выше -20 °С		
0	100,0	100,0
16	84,0	99,7
24	80,0	100,2
36	77,3	101,9

Таким образом, без стабилизатора метилдопа разлагается: при комнатной температуре за 2,5 часа окисляется 20,4 % от исходного количества лекарственного вещества, а при температуре -20 °С за 24 часа –22,7 %, что не укладывается в критерии приемлемости (концентрация должна быть в диапазоне 85–115 % от исходной). Добавление раствора аскорбиновой кислоты с натрия сульфитом и гидрокарбонатом к плазме значительно замедлило процесс деградации.

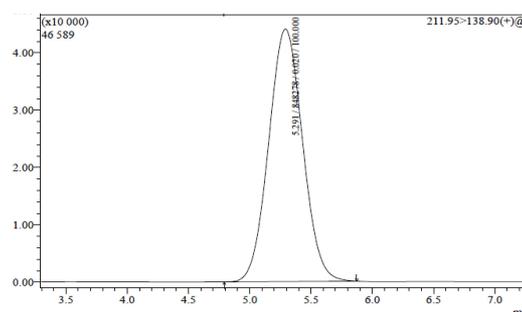
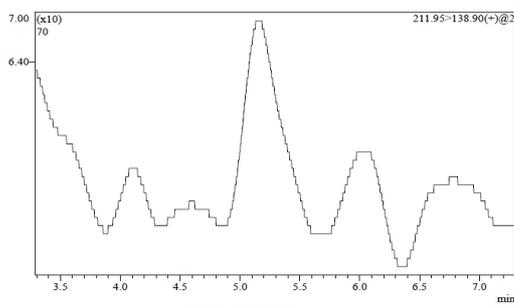
**Валидация методики.** Валидация разработанной методики была проведена в соответствии с требованиями руководства ЕМЕА [6], Решения Совета Евразийской экономической комиссии № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза» [7]. Все испытания выполнены с добавлением стабилизатора. Полученные результаты валидационных тестов представлены в таблице 2.

**Исследование фармакокинетики метилдопы в форме таблеток, покрытых оболочкой.** Разработанная методика прошла апробацию при исследовании фармакокинетики таблеток, покрытых оболочкой в дозировке 250 мг (препарат «Допегит» производства ОАО «Фармацевтический завод ЭГИС», Венгрия, серия D358N1014), которое было проведено на 12 здоровых добровольцах. Отбор образцов крови осуществлялся до приема препарата и через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 1 ч 15 мин, 1 ч 30 мин, 1 ч 45 мин, 2 ч, 2 ч 15 мин, 2 ч 30 мин, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 9 ч, 12 ч, 18 ч, 24 ч. Затем образцы крови, не позднее 15 мин после отбора, центрифугировали при температуре +4 °С в течение 5 мин при 3000 об./мин. После этого к полученной плазме добавлялся раствор стабилизатора из расчета 0,2 мл раствора стабилизатора на 1 мл плазмы. Полученные образцы хранились при температуре не выше -20 °С до проведения анализа. Расчет значений основных фармакокинетических параметров осуществлялся с помощью программ Microsoft Excel 2007, StatSoft STATISTICA v.12 и пакета R, модуль Bear (Lee, Hsin-ya and Lee, Yung-jin, bear: Data Analysis Tool for Average Bioequivalence and Bioavailability) (рис. 4, табл. 3).

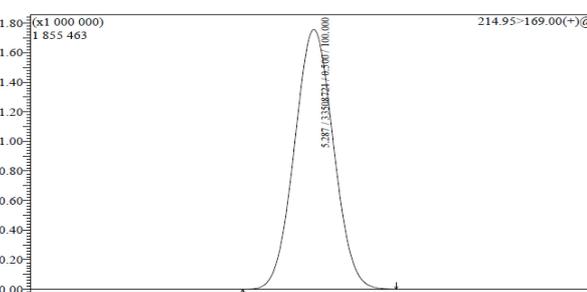
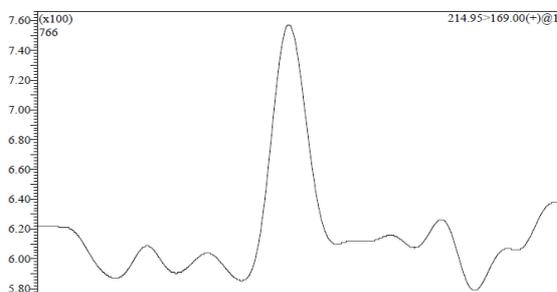
## Валидационные характеристики разработанной методики

Валидационный параметр	Результаты	
Селективность	Анализ 6 образцов бланковой плазмы крови (полученной из разных источников) и плазмы, содержащей определяемые вещества, показал, что интерференция в области времен удерживания МД не превышала 20 % от уровня НПКО, а в области времен удерживания МД- D <sub>3</sub> не превышала 5 % от их концентрации (рис. 3)	
Нижний предел количественного определения (НПКО)	0,02 мкг/мл (точность 104,20 % от теоретической, прецизионность (CV*) –1,59 %)	
Линейность	Диапазон концентраций: 0,02–3,00 мкг/мл. Коэффициент корреляции 8-точечной калибровочной кривой (r): 0,99772 до 0,99926	
Прецизионность и точность	Точность: от 94,72 % до 107,42 %; CV: от 0,69 % до 3,97 %	
Степень извлечения	63,49 %	
Отсутствия влияния разведения (двукратное разведение образцов с концентрацией аналита 4800 нг/мл)	100,21 % (при n = 6), CV = 1,78 %.	
Эффект влияния матрицы	NMF** находился в диапазоне от 1,010 до 1,018; CV– от 0,40 до 1,27 %	
Стабильность	Краткосрочная (24 ч)	95,50 % от номинальной концентрации
	Долгосрочная (29 дней)	90,74 % от номинальной концентрации
	При замораживании/размораживании	104,43 % от номинальной концентрации

\*Коэффициент вариации; \*\*нормализованный фактор матрицы.



МД – m/z – 211,95 → 138,90



МД-D<sub>3</sub> – m/z – 214,95 → 169,00

А

Б

Рис. 3. Хроматограммы бланковой плазмы (А) и калибровочного образца МД в концентрации 0,02 мкг/мл (НПКО) (Б)

Таким образом, уровень максимальной концентрации метилдопы в плазме крови составил 1,375 мкг/мл (табл. 3), следовательно, выбранное значение НПКО

(0,02 мкг/мл) ниже, чем 5 % от Стах, и чувствительности методики достаточно для изучения биоэквивалентности ее таблетированных форм [6, 7]. Соотношение

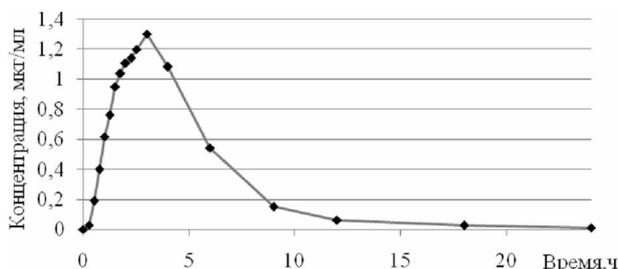


Рис. 4. Усредненный фармакокинетический профиль концентрации метилдопы в плазме крови добровольцев после однократного приема таблеток «Допегит» в дозировке 250 мг

Таблица 3

### Значения фармакокинетических параметров метилдопы

	$C_{\max}$ , мкг/мл	$T_{\max}$ , ч	$AUC_{0-t}$ , мкг·ч/мл	$AUC_{0-\infty}$ , мкг·ч/мл	$AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$ , %	$C_{\max}/AUC_{0-t}$ , ч <sup>-1</sup>	$K_{el}$ , ч <sup>-1</sup>	$T_{1/2}$ , ч	MRT, ч
Ср. знач. ± SD	1,375 ± 0,491	2,75 ± 0,805	6,854 ± 2,262	7,008 ± 2,288	97,65 ± 1,05	0,202 ± 0,033	0,18 ± 0,095	4,848 ± 2,186	5,046 ± 0,583
Min	0,594	1,500	2,901	2,980	95,46	0,163	0,087	2,070	3,890
Max	2,275	4,000	9,490	9,775	99,26	0,268	0,335	8,010	5,730
CV, %	35,69	29,27	33,00	32,64	1,07	16,10	52,55	45,09	11,55

*Примечание.*  $C_{\max}$  – максимальная концентрация МД в крови;  $T_{\max}$  – время наступления максимальной концентрации препарата;  $C_{\max}/AUC$  – относительная скорость всасывания;  $T_{1/2}$  – период полувыведения;  $AUC_{0-t}$  – площадь под фармакокинетической кривой «концентрация – время» от нулевого значения времени до последнего отбора крови;  $AUC_{0-\infty}$  – площадь под фармакокинетической кривой от нулевого значения времени до бесконечности;  $K_{el}$  – константа элиминации; MRT – среднее время удержания в крови.

$AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$  равнялось 97,65 %, что указывает на достаточную длительность наблюдения. Полученные значения ФК параметров практически совпадают с данными К. Rona, et al. [2], однако в 1,5 раза выше чем значения ФК параметров, рассчитанные в исследовании Н. Valizadeh, et al. [3] за исключением периода полувыведения – он в 2,5 раза короче. Это может быть связано с тем, что после отбора образцов крови к плазме не был добавлен стабилизатор, и МД подверглась частичной деградации.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Выбранные условия пробоподготовки, хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования позволяют быстро и точно определять концентрацию метилдопы в плазме крови в диапазоне 0,02–3,00 мкг/мл

2. Использованный раствор стабилизатора-антиоксиданта, содержащий аскорбиновую кислоту в концентрации 50 мг/мл, натрия сульфит – 2 мг/мл и натрия гидрокарбонат – 24 мг/мл, позволяет обеспечить сохранность МД в плазме в течение 29 дней.

3. Методика успешно применена для изучения фармакокинетики таблетированной формы МД и показала свою пригодность для изучения биоэквивалентности.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Oliveira C.H., Barrientos-Astigarraga R.E., Sucupira M., et al. // Journal of Chromatography B. – 2002. – Vol. 768 (2). – P. 341–348.

2. Rona K., Ary K., Renczes G., et al. // European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics. – 2001. – Vol. 26 (1–2). – P. 25–30.

3. Valizadeh H., Nemati M., Hallaj-Nezhadi S., et al. // Arzneimittelforschung. – 2010. – Vol. 60 (10). – P. 607–611.

4. Vlase L., Mihu D., Popa D.-S., et al. // Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Chemia. – 2013. – Vol. 58 (1). – P. 31–41.

5. Dell D. // Chromatographia Supplement. – 2004. – Vol. 59. – P. 139–148.

6. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft) / European Medicines Agency, 2010.

7. Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза / Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 85, 2016.

### REFERENCES

1. Oliveira C.H., Barrientos-Astigarraga R.E., Sucupira M., et al. Journal of Chromatography B. 2002. Vol. 768 (2). P. 341-348.

2. Rona K., Ary K., Renczes G., et al. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics. 2001. Vol. 26 (1-2). P. 25-30.

3. Valizadeh H., Nemati M., Hallaj-Nezhadi S., et al. Arzneimittelforschung. 2010. Vol. 60 (10). P. 607-611.

4. Vlase L., Mihu D., Popa D.-S., et al. Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Chemia. 2013. Vol. 58 (1). P. 31-41.

5. Dell D. Chromatographia Supplement. 2004. Vol. 59. P. 139-148.

6. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft) / European Medicines Agency, 2010.

7. Ob utverzhdenii Pravil provedenija issledovaniy bioekvivalentnosti lekarstvennykh preparatov v ramkah Evrazijskogo jekonomicheskogo sojuza / Reshenie Soveta Evrazijskoj jekonomicheskoy komissii ot 3 nojabrja 2016 g. no85, 2016.

### Контактная информация

**Яичков Илья Игоревич** – аспирант кафедры фармацевтической и токсикологической химии, Ярославский государственный медицинский университет, e-mail: [ilya\\_1993\\_08@mail.ru](mailto:ilya_1993_08@mail.ru)