

УДК 543.054:543.51:543.544.5.068.7:615.276

## МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕКСКЕТОПРОФЕНА ТРОМЕТАМОЛА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И ЕЕ ВАЛИДАЦИЯ

© 2021 г. А. П. Лакеев<sup>a, b, \*</sup>, Е. А. Яновская<sup>a</sup>, О. С. Брюшнина<sup>a</sup>, Ю. Г. Зюзькова<sup>a</sup>,  
Г. А. Фрелих<sup>a</sup>, Н. Ю. Абдрашитова<sup>a</sup>, В. В. Удуг<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга,  
Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук  
просп. Ленина, 3, Томск, 634028 Россия

<sup>b</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет, химический факультет  
просп. Ленина, 36, Томск, 634050 Россия

\*e-mail: lakeevs@mail.ru

Поступила в редакцию 11.11.2020 г.

После доработки 05.12.2020 г.

Принята к публикации 15.12.2020 г.

Предложена и валидирована методика определения декскетопрофена трометамола в плазме крови человека методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ–МС/МС) с применением ибупрофена в качестве внутреннего стандарта. Оценено матричное влияние на величину отклика аналита; изучена его кратковременная и долговременная стабильность в биологической матрице и в водно-ацетонитрильном растворе, а также стабильность при замораживании и оттаивании образцов. Показано, что разбавление проб в два раза существенно не влияет на точность и прецизионность анализа<sup>1</sup>. Предел обнаружения и нижний предел количественного определения составили 0.01 мкг/мл, линейный диапазон – 0.01–8.50 мкг/мл ( $R^2 = 0.9974$ ), общая продолжительность анализа – 3.5 мин. Внутри- и межсерийная точность находились в диапазонах 96.66–100.00% и 94.97–97.92% соответственно. Пробоподготовка, включающая жидкостно-жидкостную экстракцию этилацетатом в кислой среде, отличается простотой выполнения и экспрессностью. Разработанная методика успешно апробирована на реальных образцах плазмы крови здоровых добровольцев в рамках сравнительного исследования фармакокинетики и биоэквивалентности генерического лекарственного средства.

**Ключевые слова:** декскетопрофена трометамол, ибупрофен, ВЭЖХ–МС/МС, валидация, биоаналитическая методика, плазма крови человека.

**DOI:** 10.31857/S0044450221050133

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) представляют собой группу лекарственных средств, проявляющих выраженные обезболивающие, жаропонижающие и противовоспалительные свойства. Установлено, что механизм их действия связан с неселективным ингибированием ферментов группы циклооксигеназ, участвующих в биосинтезе простагландинов

PGE1, PGE2, PGF1, PGF2 и тромбоксанов A2, B2 из арахидоновой кислоты [1]. Наиболее многочисленными представителями НПВП являются производные различных органических кислот, в частности пропионовой, к группе которой относятся лекарственные средства, содержащие в качестве действующего вещества декскетопрофен (ДКП, (2S)-2-(3-бензоилфенил)пропановая кислота, схема 1, формула I), ибупрофен (ИБП, (RS)-2-(4-изобутилфенил)пропановая кислота, схема 1, формула II), кетопрофен ((RS)-2-(3-бензоилфенил)пропановая кислота), а также ряд других соединений.

<sup>1</sup> В этой статье под точностью авторы понимают правильность (характеризуемую систематической погрешностью; отклонение от истинного содержания). Редакция не стала вносить изменений и сохранила терминологию авторов.

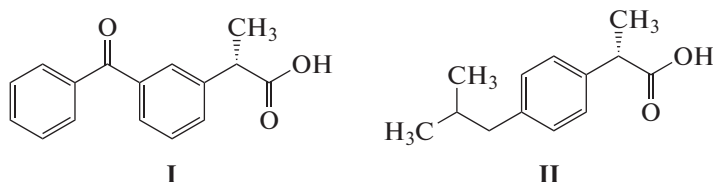


Схема 1. Структурные формулы декскетопрофена (I) и ибупрофена (II).

Кетопрофен представляет собой рацемическую смесь двух энантиомеров 2-(3-бензоилфенил)пропановой кислоты. Однако ингибирующим действием в отношении изоферментов ЦОГ-1 и ЦОГ-2 обладает лишь S(+)-энантиомер — декскетопрофен. В связи с этим в настоящее время наблюдается тенденция по замене рацемических препаратов на их чистые энантиомерные формы, что способствует уменьшению дозы лекарственного средства, требуемой для достижения необходимого терапевтического эффекта, снижению частоты развития побочных реакций, а также позволяет избежать негативного влияния, обусловленного R(–)-энантиомером и его метаболитами [2]. Помимо этого выделенная из рацемата чистая биологически активная форма, как правило, обладает более высокой биодоступностью [3].

Хемореактомный анализ показывает [4], что ДКП накапливается преимущественно в жировой ткани, мышцах и надпочечниках. При этом противовоспалительное и анальгетическое действие препарата может осуществляться посредством модулирования метаболизма не только простагландинов, но также лейкотриенов и энкефалинов; ингибирования ряда матриксных металлопротеиназ и глутаматных рецепторов. Кроме того, авторы указывают на возможные антиагрегантные, вазодилататорные, противоопухолевые и противодиабетические свойства ДКП.

Элиминация ДКП включает процессы его биотрансформации, протекающие в печени путем конъюгации с глюкуроновой кислотой (в основном с ацилглюкуронидом), и последующую экскрецию из организма почками в виде различных метаболитов, представленных главным образом гидроксильными производными [5]. Однако у людей гидроксильное взаимодействие играет второстепенную роль [6]. В основных метаболических путях ДКП задействованы как минимум два изофермента цитохрома P450 — CYP2C8 и CYP2C9 [7]. Сообщается, что период полувыведения и клиренс препарата у здоровых людей после однократного приема внутрь составляют  $1.05 \pm 0.04$  ч и  $0.089 \pm 0.004 \text{ л}^{-1} \text{ ч}^{-1} \text{ кг}^{-1}$  соответственно [8]; связывание с белками плазмы — 99.2% [6].

В готовых лекарственных формах ДКП используется в виде водорастворимой трометамоловой соли (декскетопрофена трометамол), до-

ступной в виде покрытых оболочкой таблеток или растворов для парентерального (внутримышечного и внутривенного) введения.

В литературе имеются данные по идентификации ДКП методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ–ВЭЖХ) с УФ-детектированием. Однако большая часть работ посвящена определению препарата в небологических матрицах [2, 9–15]; лишь в единичных публикациях представлено определение ДКП в моче или плазме крови животных и человека [16–18]. Описанные способы пробоподготовки являются довольно трудоемкими, а приведенная информация об используемых аналитических методиках недостаточна для их полной валидации в соответствии с требованиями European Medicines Agency (EMA) [19] и Государственной фармакопеи РФ XIV издания [20]. Так, в работе [16] для ОФ–ВЭЖХ с УФ-детектированием величина нижнего предела количественного определения (НПКО) декскетопрофена трометамола при анализе образцов плазмы и мочи человека составила 0.01 мкг/мл, что сопоставимо с полученными нами результатами. Однако валидационные характеристики методики авторами не приведены, а использованный способ пробоподготовки (жидкостно-жидкостная экстракция (ЖЖЭ) этилацетатом в кислой среде с последующим высушиванием органической фракции в токе азота) является довольно трудоемким. Нами показано, что ЖЖЭ этилацетатом с добавлением 0.6 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  достаточна для достижения указанного значения НПКО. Это позволяет значительно сократить продолжительность анализа при работе с большим количеством образцов. Кроме того, известно, что масс-спектрометрическое (МС) детектирование по сравнению с детектированием в УФ-диапазоне имеет ряд преимуществ, в частности, характеризуется более высокой селективностью. Это важно, поскольку при пробоподготовке биобразцов наряду с аналитом часто происходит соэкстракция белков исследуемой матрицы. В работе [17] валидация методики определения декскетопрофена трометамола проведена с использованием плазмы крови кроликов, имеющей иные биохимические показатели по сравнению с плазмой человека. В работе [18] величина НПКО, равная 0.01 мкг/мл, достигнута с применением метода ВЭЖХ–МС в режиме мониторинга одиночного иона в отрицательной области. Указанный режим характеризуется недоста-

точной специфичностью в отношении аналитов, находящихся в сложных биологических матрицах. Данную проблему можно решить, используя режим мониторинга заданных реакций (МЗР), обеспечивающий приемлемую эффективность в отсекании фона.

Цель настоящей работы – разработка и валидация методики определения декскетопрофена трометамола в плазме крови человека с использованием ОФ–ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (МС/МС), включающая оптимизацию условий пробоподготовки по критериям экспрессности и чувствительности.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы.** В качестве стандартных образцов использовали субстанции (содержание основного вещества не менее 99.96%) декскетопрофена трометамола производства “Чжэцзян Рэйбоу Фармасьютикал Ко., Лтд.” (Китай) и ибупрофена компании “Sigma-Aldrich” (США), выступающего в роли внутреннего стандарта (ВС). Для экстракции исследуемых веществ из плазмы применяли этилацетат х. ч. (АО “ЭКОС-1”, Москва). Хроматографирование проводили с использованием ацетонитрила (сорт 0, ос. ч., ООО “Криохром”, Санкт-Петербург) и муравьиной кислоты (98%, Sigma-Aldrich, США). При приготовлении растворов применяли бидистиллированную воду, полученную с помощью системы Fiestream Cyclon 044 (Великобритания) с последующей двойной перегонкой с добавлением серной кислоты х. ч. и перманганата калия х. ч. Для построения градуировочных зависимостей и апробации методики анализа использовали образцы интактной плазмы (химически не обработанной и не содержащей каких-либо посторонних веществ, за исключением антикоагулянтов) крови добровольцев, которые хранили при  $-32^{\circ}\text{C}$ .

**Аппаратура.** Аналитическая система включала в себя комплекс на базе жидкостного хроматографа LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), автоинжектор SIL-20A, термостат СТО-20А, тандемный масс-спектрометр AB Sciex QTRAP 3200 (AB Sciex, США) с нагреваемым источником электрораспылительной ионизации и хроматографическую колонку Phenomenex Luna C<sub>18</sub>(2) (50 × 2 мм, 3 мкм, 100 Å) с предколоночным картриджом (PerfectSil Target ODS-3 HD, 10 × 4.6 мм, 3 мкм). Пробоподготовку образцов проводили с помощью роботизированной системы Microlab STARlet (Hamilton, Швейцария). Для перемешивания проб применяли универсальный пробирочный вихревик MSV-3500 (Biosan, Латвия) с дальнейшим их разделением на фазы преципитата и супернатанта на мультифункциональной центрифуге SL 16R (Thermo Scientific, США). Для сбора и обработки хроматографических данных

использовали программное обеспечение Analyst 1.6.3 и MultiQuant 2.1 соответственно.

**Приготовление стандартных растворов.** Исходные растворы ДКП ( $c = 1000$  мкг/мл) и ИБП ( $c = 150$  мкг/мл) готовили растворением их точных навесок в заданных объемах смеси  $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$  (1 : 1, по объему). Далее растворы переносили во флаконы из темного стекла и хранили в холодильных камерах при  $-32^{\circ}\text{C}$  и  $4^{\circ}\text{C}$  соответственно. Рабочие растворы ДКП концентрацией 500, 50 и 5 мкг/мл готовили из исходного последовательным разбавлением 50%-ным ацетонитрилом, из которых, в свою очередь, готовили десять градуировочных растворов в диапазоне концентраций 0.2–170.0 мкг/мл. Растворы хранили при  $4^{\circ}\text{C}$  в посуде из темного стекла.

Для характеристики точности анализа готовили несколько растворов контроля качества с высокой (150.0 мкг/мл), средней (15.0 мкг/мл) и низкой (0.6 мкг/мл) концентрациями ДКП, а также растворы для установления нижнего (НПКО) и верхнего (ВПКО) пределов количественного определения – 0.2 мкг/мл и 170.0 мкг/мл соответственно. Концентрация раствора ДКП, применяемого для оценки влияния разбавления, – 300.0 мкг/мл.

**Приготовление градуировочных, контрольных, нулевых и холостых образцов в плазме.** Перед анализом образцы интактной плазмы размораживали при комнатной температуре, 285 мкл которой затем помещали в пробирки типа Эппендорф емк. 2 мл и добавляли 15 мкл стандартного градуировочного или контрольного раствора ДКП известной концентрации. Для приготовления нулевых (содержат только ВС) и холостых (не содержат аналита и ВС) образцов к плазме добавляли 15 мкл 50%-ного ацетонитрила. Диапазон концентраций ДКП в градуировочных образцах (ГО) – 0.01–8.50 мкг/мл. Концентрации ДКП в образцах контроля качества (ОКК) составляли: высокий ОКК – 7.50 мкг/мл, средний ОКК – 0.75 мкг/мл, низкий ОКК – 0.03 мкг/мл; НПКО – 0.01 мкг/мл, ВПКО – 8.50 мкг/мл. Концентрация ДКП в плазме, используемая для оценки влияния разбавления образцов, составляла 15.00 мкг/мл.

**Пробоподготовка.** В ходе пробоподготовки к градуировочным, контрольным и нулевым образцам в плазме общим объемом 300 мкл добавляли по 100 мкл ВС – ИБП ( $c = 150$  мкг/мл), 100 мкл 0.6 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и 800 мкл этилацетата; в пробы холостых образцов вместо ИБП вносили 100 мкл 50%-ного ацетонитрила. Далее смесь перемешивали на вихревом встряхивателе при 2500 об/мин в течение 10 мин и центрифугировали при 10000×g в течение 8 мин. После этого отбирали 500 мкл верхней органической фазы для дальнейшего анализа в описанных ниже условиях.

**Валидацию методики** осуществляли в соответствии с рекомендациями [19, 20].

**Степень извлечения** исследуемого вещества из биологической матрицы предварительно оценивали на ГО с концентрациями 0.05, 1.00 и 5.00 мкг/мл. Для этого к 15 мкл соответствующего ГО добавляли 285 мкл бидистиллированной воды (имитирует объем добавляемой плазмы), 100 мкл 0.6 М  $H_2SO_4$ , 100 мкл ВС и 800 мкл этилацетата. После тщательного перемешивания и центрифугирования водного и органическую фазы разделяли и последнюю анализировали методом ВЭЖХ–МС/МС. Среднее содержание аналита в экстракте составило  $97.63 \pm 3.86\%$ , что свидетельствует о практически полном экстрагировании исследуемого соединения этилацетатом. Поскольку плазма крови человека на 90–92% состоит из воды, то ее замена на соответствующий объем бидистиллированной воды правомерна.

**Линейный диапазон** методики оценивали в области концентраций аналита от 0.01 до 8.50 мкг/мл. Для этого строили градуировочные кривые в виде зависимости отношения площади пика ДКП к площади пика ИБП от концентрации ГО, которые затем обрабатывали как линейные на основе регрессионного анализа (квадратичная функция с весовым фактором  $1/x^2$ ). Отклонения при открываемости концентраций для не менее чем 75% ГО не должны превышать  $\pm 15\%$  от их истинных значений (за исключением образцов НПКО, для которых допускается  $\pm 20\%$ ). При этом зависимости должны характеризоваться значением коэффициента детерминации  $R^2 \geq 0.9900$ .

**Точность и прецизионность** методики оценивали путем анализа ОКК на уровне НПКО, низкой, средней и высокой концентраций (по шесть образцов для каждого уровня). Для оценки межсерийной точности анализировали образцы с разными концентрациями ДКП в плазме, приготовленные внутри трех различных циклов; внутрисерийной – в пределах одного цикла в исследуемом градуировочном диапазоне.

Значения точности открываемых концентраций для ОКК не должны выходить за пределы диапазона 85–115% (за исключением образцов НПКО, для которых эти значения могут находиться в пределах 80–120%). Указанному критерию должны соответствовать не менее 67% ОКК и не менее 50% ГО. Величина коэффициента вариации (**КВ**) концентраций для ОКК внутри одного цикла и между ними не должна превышать 15%; для НПКО – не более 20%. Для каждой концентрации ОКК рассчитывали средние величины точности всех приемлемых циклов.

**Нижний предел количественного определения** устанавливали по величине соотношения сигнал/шум для пика ДКП на уровне НПКО путем сравнения среднего отклика аналита в шести об-

работанных ГО с наименьшей концентрацией и среднего уровня шума на нулевом уровне около времени удерживания ДКП в шести холостых образцах матрицы. Значение НПКО должно соответствовать соотношению сигнал/шум  $\geq 10.0$  и позволять определять концентрацию стандартного образца аналита с **КВ**  $\leq 20\%$ . Причем четыре из шести значений НПКО должны удовлетворять точности  $100 \pm 20\%$  от номинального значения.

**Селективность** методики оценивали путем сравнения хроматограмм шести холостых образцов интактной плазмы различных добровольцев с образцами, содержащими аналит с концентрацией на уровне НПКО и ВС. Отклик детектора при времени удерживания аналита и ВС должен составлять  $\leq 20\%$  от среднего отклика первого и  $\leq 5\%$  от среднего отклика второго для установленного НПКО в 90% исследуемых биологических матрицах.

**Стабильность ДКП** в плазме оценивали в рамках аналитического цикла на шести ОКК для высокой и низкой уровней концентраций.

Для исследования стабильности субстанции декскетопрофена трометамола при замораживании и оттаивании свежеприготовленные ОКК помещали в холодильную камеру при  $-32^\circ C$  на 12 ч и затем размораживали при комнатной температуре. После полного оттаивания образцы вновь подвергали повторному циклу замораживания–размораживания. Далее проводили их пробоподготовку и анализ в соответствии с описанными в данной работе методиками.

При оценке кратковременной стабильности аналита в матрице ОКК, подвергшиеся пробоподготовке, оставляли в закрытых виалах из бесцветного стекла при комнатной температуре непосредственно в автоинжекторе на сутки (образцы для проверки стабильности). Для определения стабильности при долговременном хранении ОКК помещали в холодильную камеру при  $-32^\circ C$  на два месяца (образцы для проверки стабильности). По истечении времени осуществляли их пробоподготовку и хроматографирование с аналогичными свежеприготовленными контрольными образцами (образцы сравнения).

Кратковременную стабильность в 50%-ном растворе ацетонитрила при комнатной температуре оценивали по аналогичному принципу.

**Матричный эффект** оценивали на свежеприготовленных ОКК с низкой и высокой концентрациями в шести образцах интактной плазмы различных добровольцев. Подготовку и пробоподготовку ОКК проводили в соответствии с ранее описанными способами с тем отличием, что рассчитанные количества аналита и ВС вносили в образцы непосредственно перед анализом после этапа пробоподготовки. При расчетах использо-

вали значения матричного фактора, нормализованного на ВС, согласно формулам:

$$\Phi M = S_m / S_a,$$

$$H\Phi M = \Phi M_a / \Phi M_{bc},$$

где  $S_m$  — площадь пика аналита или ВС в присутствии биологической матрицы,  $S_a$  — площадь пика аналита или ВС при ее отсутствии,  $\Phi M_a$  — фактор матрицы ( $\Phi M$ ) аналита,  $\Phi M_{bc}$  — фактор матрицы ВС,  $H\Phi M$  — нормализованный по ВС  $\Phi M$ .

Коэффициенты вариации  $\Phi M$  не должны превышать 15%.

Оценка матричного эффекта является важным этапом при разработке и валидации биоаналитических методик, поскольку в некоторых случаях может наблюдаться сильное влияние матрицы на сигнал аналита. Возникающая при этом ионная супрессия часто осложняет проведение анализа биообразцов методом ВЭЖХ–МС/МС, приводя к занижению определяемого содержания аналита.

*Степень переноса* предыдущей пробы оценивали путем анализа холостых образцов после хроматографирования ОКК с высокой концентрацией (ВПКО). Перенос в холостой образец после стандарта с высокой концентрацией не должен превышать 20% от величины НПКО.

*Влияние разбавления* проб на точность анализа определяли путем предварительного приготовления раствора ДКП с концентрацией выше значения высокого ОКК в два раза (15.00 мкг/мл), 150 мкл которого затем разбавляли 150 мкл интактной плазмы. Далее проводили пробоподготовку и анализ согласно описанной в работе методике.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

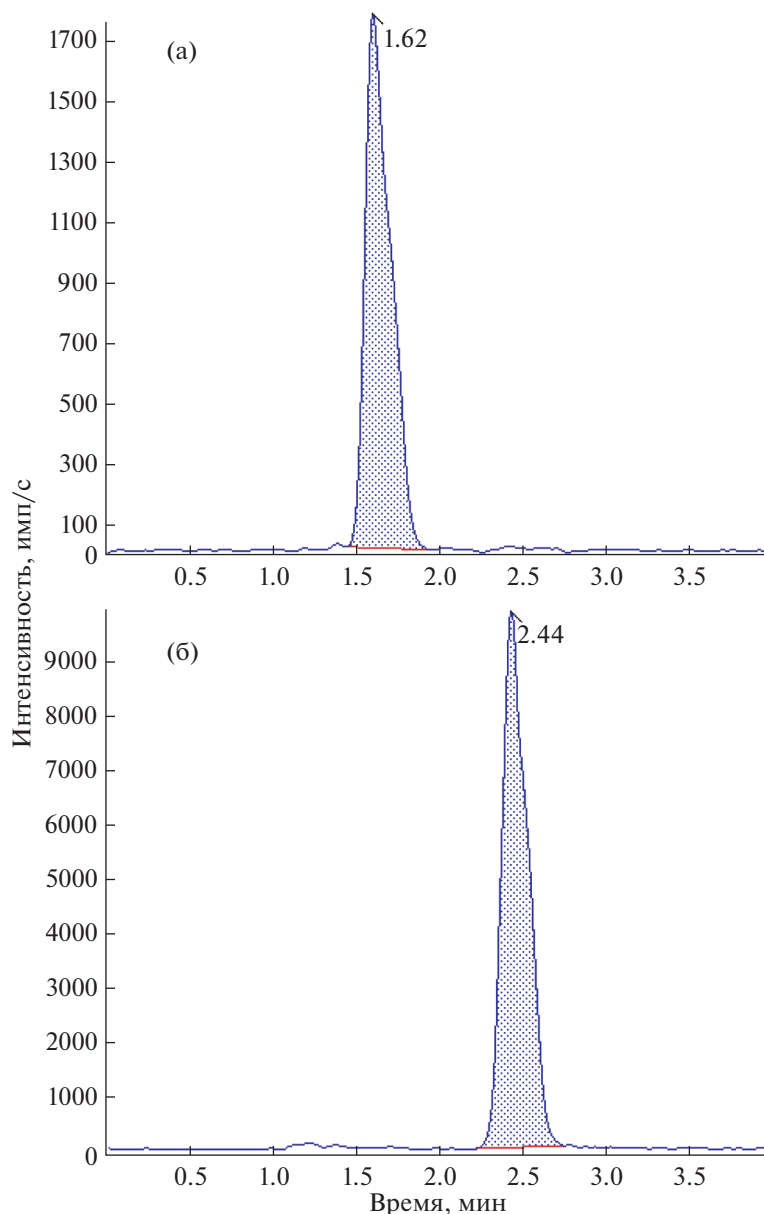
**Выбор внутреннего стандарта.** В связи с отсутствием изотопно-меченных стандартов в качестве ВС использовали сертифицированную субстанцию ибупрофена. Данное вещество близко по структуре и химическим свойствам к декскетпрофену и не является эндогенным соединением, что позволяет избежать существенных искажений результатов в ходе анализа. Изучена также возможность применения венлафаксина в роли ВС. Однако по причине невысокой воспроизводимости полученных данных от рассматриваемого варианта пришлось отказаться.

**Выбор условий пробоподготовки.** Извлечение ДКП и ИБП из плазмы проводили методом ЖЖЭ этилацетатом с добавлением 0.6 М  $H_2SO_4$ . Кроме того, изучали варианты ЖЖЭ с одновременным высаливанием белков плазмы 3 М раствором  $(NH_4)_2SO_4$ , а также смесью 3 М раствора  $(NH_4)_2SO_4$  с 0.6 М  $H_2SO_4$ . Удовлетворительные результаты были получены только в первом случае — с добавлением  $H_2SO_4$ .

Учитывая высокую степень связывания аналита и ВС с белками плазмы (99.2% для ДКП [6]), а также то, что оба вещества содержат в своей структуре способную к ионизации карбоксильную группу (схема 1), можно предположить, что роль серной кислоты в процессе пробоподготовки сводится к разрыву указанных связей (белковая составляющая плазмы подвергается денатурации, что способствует более полному осаждению молекул белков и уменьшению тем самым степени их связывания с аналитом и ВС) и переводу веществ в полностью неионизированную форму (без добавления кислоты целевые компоненты могут также находиться в растворе в частично ионизированном состоянии). Указанные факты должны способствовать повышению степени извлечения ДКП и ИБП в ходе экстракции.

Использование концентрированного раствора сульфата аммония в качестве высаливающего агента, с одной стороны, также способствует уменьшению степени связывания целевых компонентов с белками плазмы ввиду осаждения последних, а с другой, — незначительно подкисляет раствор в связи с возможным протеканием процесса гидролиза. Однако более выраженный сигнал аналита, сопоставимый с сигналом в случае применения смеси  $(NH_4)_2SO_4$  с  $H_2SO_4$ , наблюдается при добавлении  $H_2SO_4$ , что свидетельствует о значительной роли фактора кислотности в процессе экстрагирования.

**Выбор элюента и оптимизация условий ВЭЖХ–МС/МС-анализа.** В качестве подвижной фазы рассматривали системы  $CH_3CN$ – $HCOOH$  (0.1%-ная) и  $CH_3CN$ – $HCOONH_4$  (5 мМ и 10 мМ) с добавлением  $HCOOH$  и при ее отсутствии. При разработке методики проводили также ряд предварительных испытаний на нескольких обращенно-фазовых хроматографических колонках Phenomenex, Macherey–Nagel и EcoNova  $C_{18}$  (октадецил) одного размера (50 × 2 мм), но отличающихся величиной зернения сорбента (3, 4 и 5 мкм) и размером пор (80 и 100 Å). Наибольшая эффективность разделения, более высокая чувствительность с хорошими формами пиков, а также оптимальная продолжительность анализа с достижением желаемой селективности при минимальном уровне шума наблюдались при использовании смеси  $CH_3CN$  (элюент В) и 0.1%-ной  $HCOOH$  (элюент А) в соотношении 60 : 40 (по объему) в изократическом режиме на аналитической колонке Phenomenex Luna  $C_{18(2)}$  (50 × 2 мм, 3 мкм, 100 Å). При этом выбрали следующие условия хроматографирования: объем вводимой аликвоты 2 мкл; скорость потока элюента 0.30 мл/мин; температура колонки 40°C; общая продолжительность анализа 3.5 мин. Среднее время удерживания ДКП и ИБП составило  $1.62 \pm 0.02$  и  $2.43 \pm 0.03$  мин соответственно (рис. 1а, 1б).



**Рис. 1.** Репрезентативные хроматограммы смеси стандартных образцов декскетопрофена ( $c = 0.25$  мкг/мл, переход  $m/z$  255.2  $\rightarrow$  105.2) (а) и ибупрофена ( $c = 37.5$  мкг/мл) (б), экстрагированных из плазмы.

Использование смеси  $\text{CH}_3\text{CN}-\text{HCOOH}$  (0.1%-ная) в объемном соотношении 80 : 20 также приводит к оптимальным параметрам элюирования; время удерживания ДКП и ИБП при данных условиях –  $1.43 \pm 0.04$  и  $1.61 \pm 0.03$  мин соответственно. Указанный режим изократического элюирования предполагал общую продолжительность анализа 3.0 мин. Однако на этапе хроматографирования экстрактов, полученных из реальных образцов плазмы крови добровольцев, происходит соэлюирование аналита и его метаболита на заданных МЗР-переходах (255.2  $\rightarrow$  105.2, 255.2  $\rightarrow$  208.8  $m/z$ ). В связи с этим выбрали соот-

ношение элюентов В и А 60 : 40 (по объему), что позволило разделить пики метаболита (время удерживания  $1.25 \pm 0.03$ ) и целевого компонента. Элюирование с применением указанной выше смеси веществ в объемном соотношении 50 : 50 при скорости потока 0.25 мл/мин приводит к увеличению общей продолжительности анализа до 5.0 мин (время удерживания ДКП и ИБП  $2.54 \pm 0.04$  и  $4.27 \pm 0.03$  мин соответственно). При использовании в качестве элюента А формиатного буферного раствора с различной буферной емкостью принципиальных различий по сравнению с 0.1%-ной  $\text{HCOOH}$  не наблюдали. В случае же

растворов  $\text{HCOONH}_4$  различной концентрации хроматографический пик аналита имеет выраженный “хвост” и дает менее интенсивный сигнал.

Для обеспечения воспроизводимости результатов и минимизации перекрестного загрязнения образцов иглу автоинжектора промывали до и после ввода пробы смесью  $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$  (1 : 1, по объему). Определение ДКП проводили методом внутренней стандартизации по соотношению площадей хроматографических пиков аналита и ВС.

Для идентификации использовали метод масс-спектрометрии в МЗР-режиме (регистрировали положительные ионы) на основе следующих величин  $m/z$ : 255.2  $\rightarrow$  105.2 (основной переход, ДКП), 255.2  $\rightarrow$  208.8 (подтверждающий переход, ДКП) и 206.8  $\rightarrow$  161.0 (ИБП). Из масс-спектров соединений (рис. 2а, 2б) видно, что аналит имеет несколько характеристических переходов. Это повышает надежность его определения. Так, пик при величине  $m/z$  255.2 соответствует протонированной молекуле  $[\text{M}-\text{H}]^+$ . Наиболее интенсивные фрагментные ионы при  $m/z$  208.8 и 105.2 образуются в результате потери молекул  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{CO}$  ионом-предшественником и при разрыве  $\text{C}-\text{C}$  связи между атомами углерода бензольного кольца и карбонильной группы с образованием положительно заряженного бензоил-иона соответственно. Для ВС:  $m/z$  206.8 – родительский ион, а фрагментный ион при  $m/z$  161.0 – результат отщепления молекул  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{CO}$ . Следует отметить, что оба целевых соединения содержат в своей структуре  $-\text{COOH}$ -группу, что делает возможным детектирование в режиме отрицательной ионизации.

Поскольку определяемые вещества являются полярными, целесообразно применение электрораспылительной ионизации. В табл. 1 приведены условия МС/МС-детектирования (для ДКП представлены данные по основному переходу), предварительно оптимизированные для обеспечения максимальной чувствительности прибора путем напуска определяемых веществ в камеру источника с использованием шприцевого ввода.

**Валидация методики.** Согласно требованиям ЕМА [19] и Государственной фармакопеи РФ XIV издания [20] к основным параметрам биоаналитической методики, подтверждающим эффективность и надежность результатов, относятся: селективность определения, предел обнаружения (ПО) и НПКО, диапазон линейности, точность, прецизионность, стабильность аналита в биологической матрице и в растворе в условиях его хранения и пробоподготовки, степень переноса предыдущей пробы и извлечения аналита из матрицы, а также величина матричного эффекта, оказывающего влияние на степень ионизации и отклик аналита. В этот перечень нами также был добавлен параметр, характеризующий влияние

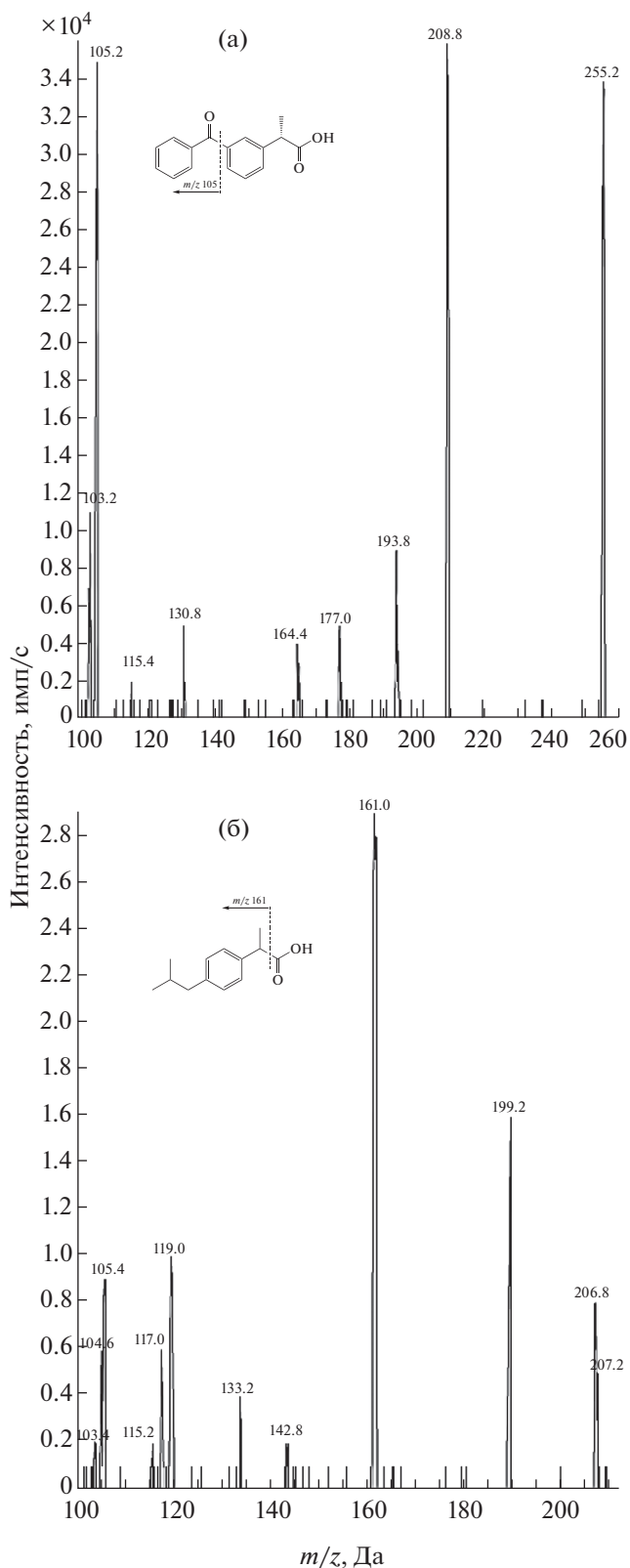


Рис. 2. Масс-спектры декскетопрофена (а) и ибупрофена (б) с соответствующими схемами фрагментации.

**Таблица 1.** Условия масс-спектрометрического анализа

Параметр	Значение параметра	
	ДКП	ИБП
Потенциал входа, В	10	
Потенциал декластеризации, В	41	
Входной потенциал в столкновительную камеру, В	16	17
Выходной потенциал из столкновительной камеры, В	4	
Энергия столкновения, В	17	13
Напряжение на капилляре, В	4000	
Температура источника электро-спрея, °С	450	
Расход газа в столкновительной камере – N <sub>2</sub>	Средний	
Газ-распылитель – воздух, psi	50	
Газовая завеса – N <sub>2</sub> , psi	25	
Вспомогательный газ – воздух, psi	25	

разбавления образцов, с целью точного определения концентрации вещества, превышающей диапазон градуировочной зависимости. Экспериментальные данные обрабатывали по результатам трех последовательно проведенных аналитических циклов, состоящих из холостого образца (подвергнутый обработке образец интактной матрицы, не содержащий аналита и ВС), нулевого образца (обработанная интактная матрица, содержащая ВС), десяти ГО, трех ОКК и образцов, соответствующих концентрациям на уровнях

НПКО и ВПКО. Все указанные образцы проходили стадию пробоподготовки как единая серия. При этом каждый аналитический цикл сопровождался градуировочной зависимостью в диапазоне рабочих концентраций для подтверждения градуировочного коэффициента и метрологических характеристик методики. Последние, в свою очередь, должны удовлетворять критериям приемлемости (обладать требуемыми точностью и прецизионностью) [19, 20], которые подтверждают пригодность разработанной методики для определения ДКП в плазме крови человека.

**Линейный диапазон.** Установлено, что открываемые значения концентраций ГО соответствуют приведенным выше критериям в исследуемом диапазоне концентраций. Процент образцов, удовлетворяющих указанным требованиям, – 96.67%. Расчетные концентрации градуировочных стандартов приемлемых аналитических циклов приведены в табл. 2. Величина  $R^2$  составила 0.9974 (усредненное значение для трех аналитических циклов). В качестве примера приводим параметры уравнения градуировочной зависимости для первого аналитического цикла:  $y = 1.0177 \times 10^{-8}x^2 + 6.8158 \times 10^{-4}x - 4.0033 \times 10^{-4}$  ( $R^2 = 0.9961$ ), где  $y$  – отношение площади пика аналита к ВС,  $x$  – концентрация аналита.

**Точность и прецизионность.** По результатам анализа внутри- и межсерийная точность находятся в пределах 96.66–100.00% и 94.97–97.92% от номинальных концентраций соответственно; внутри- и межсерийные КВ изменились соответственно в диапазонах 4.93–9.25% и 4.24–9.57%. Полученные данные удовлетворяют приведенным выше критериям приемлемости: значения

**Таблица 2.** Результаты оценки градуировочных циклов при определении декскетопрофена трометамола в плазме крови человека

№ градуировочного уровня	$c \times 10^3$ , мкг/мл	№ аналитического цикла					
		1		2		3	
		$c \times 10^3$ , мкг/мл	точность, %	$c \times 10^3$ , мкг/мл	точность, %	$c \times 10^3$ , мкг/мл	точность, %
1	10.00	9.43	94.32	10.71	107.07	10.06	100.60
2	25.00	26.55	106.18	21.74	86.94	25.36	101.43
3	50.00	59.44	118.89*	45.27	90.54	47.55	95.11
4	100.00	97.46	97.46	97.86	97.86	98.88	98.88
5	250.00	236.73	94.69	252.00	100.80	240.57	96.23
6	500.00	488.30	97.66	526.59	105.32	506.04	101.21
7	1000.00	980.03	98.00	1100.97	110.10	1027.63	102.76
8	2500.00	2220.82	88.83	2632.01	105.28	2642.03	105.68
9	5000.00	5093.70	101.87	4863.76	97.28	4991.95	99.84
10	8500.00	8682.20	102.14	8396.33	98.78	8352.36	98.26

\* Значение не соответствует критериям приемлемости.



**Таблица 3.** Результаты оценки внутрисерийной точности и прецизионности при определении декскетопрофена трометамола в плазме крови человека

№ образца	НПКО, $c = 0.01$ мкг/мл		Низкий ОКК, $c = 0.03$ мкг/мл		Средний ОКК, $c = 0.75$ мкг/мл		Высокий ОКК, $c = 7.50$ мкг/мл	
	$c \times 10^3$ , мкг/мл	точность, %	$c \times 10^3$ , мкг/мл	точность, %	$c \times 10^3$ , мкг/мл	точность, %	$c \times 10^3$ , мкг/мл	точность, %
1	9.30	92.97	32.82	109.38	727.08	96.94	7715.09	102.87
2	8.70	86.97	26.34	87.78	675.67	90.09	6674.30	88.99
3	10.17	101.75	27.39	91.30	737.17	98.29	7080.64	94.41
4	10.75	107.49	31.60	105.32	747.40	99.65	7581.87	101.09
5	8.70	87.04	31.20	103.98	673.99	89.87	7352.51	98.03
6	10.89	108.87	30.66	102.21	788.29	105.10	7616.88	101.56
Среднее	9.75	97.52	30.00	100.00	724.93	96.66	7336.88	97.83
СО*	0.90	—	2.33	—	40.20	—	362.03	—
КВ**, %	9.25	—	7.77	—	5.55	—	4.93	—

\* СО – стандартное отклонение, \*\* КВ – коэффициент вариации.

точности на уровнях НПКО и нижнего, среднего, верхнего диапазонов концентраций не выходят за пределы  $100 \pm 20\%$  и  $100 \pm 15\%$  соответственно; величины КВ внутри одного цикла и между ними не превышают  $\pm 15\%$  для ОКК и  $\pm 20\%$  для НПКО. В табл. 3 для примера приведены экспериментальные данные по оценке внутрисерийной точности и прецизионности одного из аналитических циклов.

**Предел обнаружения и нижний предел количественного определения.** По результатам анализа среднее соотношение сигнал/шум составило 12.4, а КВ и точность для НПКО в рамках одного цикла – 9.25 и 97.52% соответственно. В данном случае ПО совпадает с НПКО (0.01 мкг/мл) (табл. 4). Репрезентативные хроматограммы холостого образца и образца, содержащего аналит с концентрацией на уровне НПКО, представлены на рис. 3а, 3б.

**Селективность.** Влияние эндогенных компонентов плазмы на площадь пиков ДКП и ИБП нами не выявлено. Отклик детектора при времени удерживания аналита и ВС составлял  $\leq 20\%$  от среднего отклика первого и  $\leq 5\%$  от среднего отклика второго для установленного НПКО в 90% исследуемых биологических матриц, что соответствует установленным критериям.

**Стабильность.** По результатам проведенных испытаний ДКП признан нами стабильным как в плазме, так и в водно-ацетонитрильном растворе в исследуемых временных интервалах. После трех циклов замораживания–оттаивания при  $-32^\circ\text{C}$  изменение значений точности определения концентраций в образцах для проверки стабильности

относительно свежеприготовленных низких и высоких ОКК составило 8.70 и 3.29% соответственно. При оценке кратковременной стабильности в плазме и в растворе изменение точности определения концентраций на указанных уровнях составило соответственно 4.35 и 0.80%; 0.82 и 3.12%. В случае оценки долговременной стабильности – 1.53 и 2.50%.

**Матричный эффект.** Коэффициент вариации фактора матрицы для низкого и высокого ОКК составил 9.30 и 5.45% соответственно, что удовле-

**Таблица 4.** Результаты оценки нижнего предела количественного определения декскетопрофена трометамола в плазме крови человека (один цикл; номинальная концентрация – 0.01 мкг/мл)

№ образца	$c \times 10^3$ , мкг/мл	Точность, %	Соотношение сигнал/шум
1	9.30	92.97	11.7
2	8.70	86.97	13.0
3	10.17	101.75	10.0
4	10.75	107.49	13.9
5	8.70	87.04	14.1
6	10.89	108.87	11.7
Среднее	9.75	97.52	12.4
СО*	0.90	—	—
КВ**, %	9.25	—	—

\* СО – стандартное отклонение, \*\* КВ – коэффициент вариации.

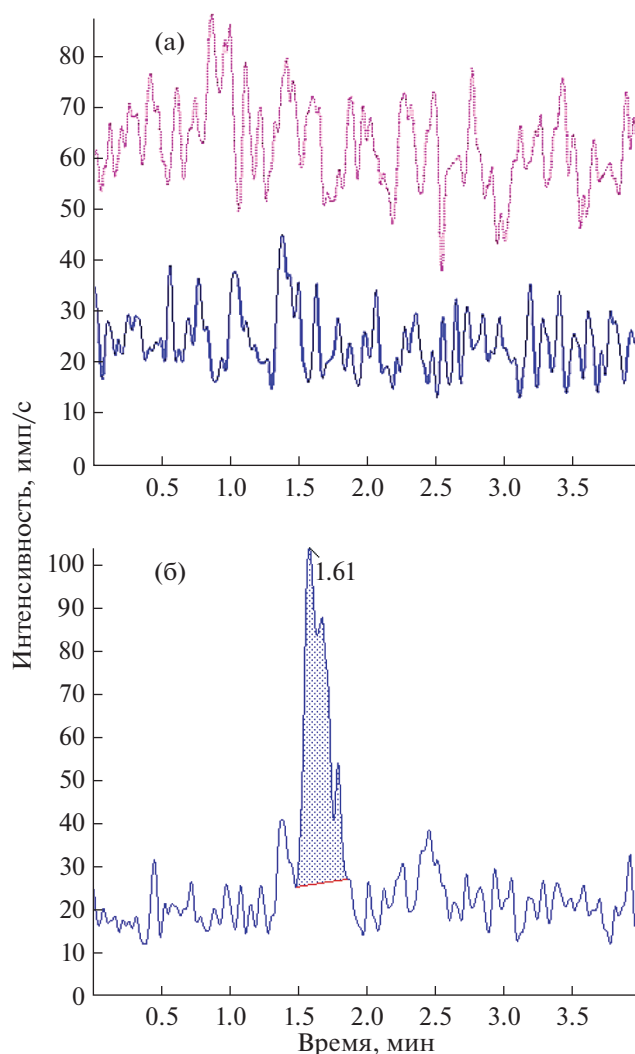


Рис. 3. Репрезентативные хроматограммы холостого образца (а) и стандартного образца декскетопрофена на уровне нижнего предела количественного определения ( $c = 0.01$  мкг/мл, переход  $m/z$  255.2  $\rightarrow$  105.2) (б).

творяет установленным требованиям. Полученные значения свидетельствуют о незначительном влиянии исследуемой биологической матрицы на отклик аналита.

**Степень переноса.** Полученные результаты указывают на отсутствие эффекта переноса проб, поскольку в холостых образцах после ОКК с высокой концентрацией отсутствует хроматографический пик с временем удерживания ДКП.

**Влияние разбавления.** Установлено, что процедура разбавления образцов в два раза существенно не влияет на параметры точности и прецизионности предложенной нами методики. Среднее значение точности составило 88.06%, а изменение – 11.26%.

В табл. 5 обобщены значения валидационных параметров разработанной методики.

\* \* \*

Таким образом, в настоящей работе предложена и валидирована ВЭЖХ–МС/МС-методика определения декскетопрофена трометамола в плазме крови человека в диапазоне концентраций 0.01–8.50 мкг/мл с применением ибупрофена в роли внутреннего стандарта. В качестве метода определения целевых соединений выбран МЗР-режим, обеспечивающий достаточную селективность при работе со сложными биологическими матрицами. Разработанная методика, удовлетворяющая требованиям ЕМА [19] и Государственной фармакопеи РФ XIV издания [20], отвечает критериям точности, прецизионности, экспрессности, надежности и чувствительности, а также демонстрирует приемлемую производительность. Оптимизированные условия пробоподготовки по сравнению с имеющимися в литературе на дан-

**Таблица 5.** Валидационные характеристики разработанной методики определения декскетопрофена трометамола в плазме крови человека

Параметр	Значение параметра
Селективность матрицы	≤20% отклика НПКО, ≤5% отклика ВС
ПО	0.01 мкг/мл
НПКО	0.01 мкг/мл при соотношении сигнал/шум 12.4
Линейный диапазон	0.01–8.50 мкг/мл
Внутрисерийная точность	96.66–100.00% от номинальных значений
Внутрисерийные коэффициенты вариации	4.93–9.25%
Межсерийная точность	94.97–97.92% от номинальных значений
Межсерийные коэффициенты вариации	4.24–9.57%
Оценка стабильности в матрице при замораживании и оттаивании при –32°C	Среднее изменение точности 8.70 и 3.29%
Оценка долговременной стабильности в матрице при –32°C в течение двух месяцев	Среднее изменение точности 1.53 и 2.50%
Оценка кратковременной стабильности в матрице при комнатной температуре	Среднее изменение точности 4.35 и 0.80%
Оценка кратковременной стабильности в растворе при комнатной температуре	Среднее изменение точности 0.82 и 3.12%
Эффект переноса	≤ 20% величины НПКО
Эффект матрицы	Коэффициенты вариации фактора матрицы 9.30 и 5.45%
Разбавление образцов в два раза	Среднее изменение точности 11.26%

ный момент позволяют значительно сократить общую продолжительность анализа. Кроме того, показано, что для образцов с концентрациями, превышающими аналитический диапазон разработанной методики, допустимо использование их разбавления. В ходе выполнения эксперимента особое внимание уделяли оценке матричного эффекта и отсутствию перекрестного загрязнения проб во избежание ошибочных результатов, которое контролировали путем анализа холостого образца после ввода образца контроля качества с максимальной концентрацией. Данная методика успешно апробирована на реальных образцах плазмы крови здоровых добровольцев (мужчин и женщин) в возрасте от 20 до 45 лет при однократном приеме ими генерического препарата дозой 25 мг натошак в рамках клинических исследований, проводимых в соответствии с законами РФ и этическими требованиями.

*Работа выполнена в рамках исследования биоэквивалентности новых лекарственных препаратов в интересах АО “Органика” (Россия, Новокузнецк).*

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Khambe G.S., Salunkhe V.R., Korhale R., Jadhav S., Choudhari P., Wagh N., Birdar N.* RP–HPLC method development for dexketoprofen trometamol and paracetamol in pharmaceutical dosage form and its validation including short term stability study // *IJIPLS*. 2015. V. 5. № 1. P. 279.
2. *Zippel H., Wagenitz A.* Comparison of the efficacy and safety of intravenously administered dexketoprofen trometamol and ketoprofen in the management of pain after orthopaedic surgery // *Clin. Drug Invest.* 2006. V. 26. № 9. P. 517.  
<https://doi.org/10.2165/00044011-200626090-00005>
3. *Карамеев А.Е.* Современные средства эффективного контроля острой боли: декскетопрофен // *Трудный пациент*. 2015. Т. 13. № 10–11. С. 24.
4. *Торшин И.Ю., Громова О.А., Федотова Л.Э., Громов А.Н.* Сравнительный хемореактомный анализ декскетопрофена, кетопрофена и диклофенака // *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2018. Т. 10. № 1. С. 47.  
<https://doi.org/10.14412/2074-2711-2018-1-47-54>
5. *Sweetman B.J.* Development and use of the quick acting chiral NSAID dexketoprofen trometamol (Keral) // *Acute Pain*. 2003. V. 4. № 3–4. P. 109.
6. *Walczak J.-S.* Analgesic properties of dexketoprofen trometamol // *Pain Manage.* 2011. V. 1. № 5. P. 409.  
<https://doi.org/10.2217/pmt.11.42>
7. *Martínez C., Blanco G., Ladero J.M., García-Martín E., Taxonera C., Gamito F.G., Diaz-Rubio M., Agúndez J.A.G.* Genetic predisposition to acute gastrointestinal bleeding after NSAIDs use // *Br. J. Pharmacol.* 2004. V. 141.

- № 2. P. 205.  
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705623>
8. Vallés J., Artigas R., Bertolotti M., Crea A., Muller F., Paredes I., Capriati A. Single and repeated dose pharmacokinetics of dexketoprofen trometamol in young and elderly subjects // *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 2006. V. 28 (Suppl. A). P. 13.
  9. Archana K., Vikas P. Development and validation of reversed-phase high performance liquid chromatographic method for estimation of dexketoprofen trometamol in bulk and tablet dosage form // *AJPCT.* 2013. V. 1. № 4. P. 395.
  10. Bhusari V.K., Dhaneshwar S.R. Development of a validated stability-indicating HPLC assay method for dexketoprofen trometamol // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2012. V. 4. № 1. P. 321.
  11. Dhaneshwar S.R., Jagtap V.N. Development and validation of RP-HPLC-PDA method for simultaneous determination of dexketoprofen and thiocolchicoside in pharmaceutical dosage form // *J. Pharm. Res.* 2013. V. 3. № 6. P. 604.  
<https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.04.053>
  12. Krupal P., Dhaval M., Krupal P., Patel J., Shah N. Development and validation of UV-spectroscopic and RP-HPLC methods for estimation of dexketoprofen trometamol in tablet dosage form // *JPSBR.* 2011. V. 1. № 1. P. 78.
  13. Harde M.T., Dharam D.L., Jadhav S.B., Balap A.R. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of thiocolchicoside and dexketoprofen in bulk and tablet dosage form // *Int. J. PharmTech Res.* 2012. V. 4. № 4. P. 1797.
  14. Mulla T.S., Rao J.R., Yadav S.S., Bharekar V.V., Rajput M.P. Development and validation of HPLC method for simultaneous quantitation of paracetamol and dexketoprofen trometamol in bulk drug and formulation // *Pharmacie Globale (IJCP).* 2011. V. 2. № 7. P. 1.
  15. Öztürk A.A., Yenilmez E., Yazan Y. Development and validation of high-performance liquid chromatography (HPLC) modified method for dexketoprofen trometamol // *Eur. Int. J. Sci. Technol. (EIJST).* 2017. V. 6. P. 33.
  16. Barbanoj M.J., Gich I., Artigas R., Tost D., Moros C., Antonijoan R.M., García M.L., Mauleón D. Pharmacokinetics of dexketoprofen trometamol in healthy volunteers after single and repeated oral doses // *J. Clin. Pharmacol.* 1999. V. 38. № 12. P. 33S.  
<https://doi.org/10.1002/jcph.1998.38.s1.33>
  17. Fengci H., Liang C., Desheng M. Determination of the plasma concentration of dexketoprofen with HPLC in rabbits // *China Pharmacy.* 2003. V. 12. P. 53.
  18. Song Y., Jia Y.-Y., Ge J., Lu C.-T., Li X.-Q., Chen M.-C., Ding Y., Wen A.-D. Determination of dexketoprofen in human plasma by LC-MS // *Chinese J. New Drugs.* 2013. V. 22. № 1. P. 75.
  19. Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency – Committee for Medicinal Products for Human Use. 2011.
  20. Государственная Фармакопея РФ XIV издания. М.: ФГБУ “Научный центр экспертизы средств медицинского применения” Минздрава России, 2018. <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (10.11.2020).