



Количественное определение феназепама и его активного метаболита в плазме крови человека при различных процедурах экстракции

И. И. Мирошниченко¹✉, А. И. Платова¹, И. И. Кузьмин¹, Д. В. Иващенко²

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр психического здоровья» (ФГБНУ НЦПЗ). 115522, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 34

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 125993, Россия, г. Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1

✉ Контактное лицо: Мирошниченко Игорь Иванович. E-mail: igormir41@gmail.com

ORCID: И. И. Мирошниченко – <https://orcid.org/0000-0003-4950-5336>;

А. И. Платова – <https://orcid.org/0000-0002-9682-4623>;

И. И. Кузьмин – <https://orcid.org/0000-0002-9326-4683>;

Д. В. Иващенко – <https://orcid.org/0000-0002-2295-7167>.

Статья поступила: 06.10.2024

Статья принята в печать: 20.08.2024

Статья опубликована: 23.08.2024

Резюме

Введение. Наличие активного метаболита 3-гидроксифеназепама (3-ОН-ФЕН), широкая межиндивидуальная вариабельность активной фракции феназепама (ФЕН) в крови, а также его терапевтического эффекта определяют актуальность терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ). Для этого исследователь должен располагать экспрессной методикой с широким аналитическим диапазоном, низким пределом количественного определения (НПКО), робастной при разных методах пробоподготовки.

Цель. Разработка и валидация методик количественного определения ФЕН и 3-гидроксифеназепама для измерения содержания этих аналитов в плазме крови человека при разных методах экстракции.

Материалы и методы. Определение ФЕН и 3-ОН-ФЕН в плазме крови человека проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Для пробоподготовки использовали твердофазную экстракцию (SPE, от *англ.* «solid phase extraction») и жидкостную экстракцию с поддержкой (SLE, от *англ.* «supported liquid extraction»), иначе называемую жидкостно-жидкостной экстракцией на твердой фазе. Внутренний стандарт (ВС) – метопролол. Подвижная фаза: 0,2%-й водный раствор муравьиной кислоты (элюент А) и 100%-й ацетонитрил (элюент В); режим: градиентный. Колонка: Hypersil GOLD® C18, 50 × 2,1 мм, 3,5 мкм.

Результаты и обсуждение. Разработаны две методики количественного определения ФЕН и 3-ОН-ФЕН в плазме крови человека при разных методах пробоподготовки: SPE и SLE. Подобраны условия хроматографического разделения и масс-спектрометрической детекции изучаемых аналитов. Для обеих методик были определены следующие валидационные характеристики: селективность, калибровочная кривая, точность, прецизионность, степень экстракции, НПКО, эффект переноса, фактор матрицы, стабильность рабочих растворов и аналита в матрице.

Заключение. Результаты валидации разработанных методик соответствуют установленным критериям, что позволяет их использовать для количественного определения ФЕН и 3-ОН-ФЕН в плазме крови человека. Широкий аналитический диапазон обеих методик – 1–1000,00 нг/мл – позволяет применять их для проведения исследований фармакокинетики и биоэквивалентности, а также в токсикологии.

Ключевые слова: феназепам, 3-гидроксифеназепам, ВЭЖХ-МС/МС, валидация, твердофазная экстракция, жидкостная экстракция с поддержкой

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. И. И. Мирошниченко, Д. В. Иващенко – постановка цели и задач исследования, формирование структуры статьи. А. И. Платова – контроль качества аналитических работ, валидация методики. И. И. Кузьмин – измерение концентрации изучаемых аналитов.

Для цитирования: Мирошниченко И. И., Платова А. И., Кузьмин И. И., Иващенко Д. В. Количественное определение феназепама и его активного метаболита в плазме крови человека при различных процедурах экстракции. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(3):199–207. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1609>

Quantitative determination of phenazepam and its active metabolite in human blood plasma at different extraction procedures

Igor I. Miroshnichenko¹✉, Angelina I. Platova¹, Ivan I. Kuzmin¹, Dmitriy V. Ivaschenko²

¹ Federal state budgetary scientific institution "Mental health research center". 34, Kashirskoe shosse, Moscow, 115522, Russia

² Russian Medical Academy of Continuous Professional Education. Building 1, 2/1, Barrikadnaya str., Moscow, 125993, Russia

✉ **Corresponding author:** Igor I. Miroshnichenko. **E-mail:** igormir41@gmail.com

ORCID: Igor I. Miroshnichenko – <https://orcid.org/0000-0003-4950-5336>;

Angelina I. Platova – <https://orcid.org/0000-0002-9682-4623>;

Ivan I. Kuzmin – <https://orcid.org/0000-0002-9326-4683>;

Dmitriy V. Ivaschenko – <https://orcid.org/0000-0002-2295-7167>.

Received: 06.10.2024

Accepted: 20.08.2024

Published: 23.08.2024

Abstract

Introduction. The presence of the active metabolite (3-hydroxyphenazepam, 3-OH-PHEN), the wide interindividual variability of the therapeutic effect of phenazepam (PHEN), as well as its active moiety in the blood, determine the relevance of therapeutic drug monitoring (TDM). To do this, the researcher must have an express analytical technique with a wide analytical range, a low limit of quantification (LLOQ), and with robustness with different sample preparation methods.

Aim. Development and validation of quantitative methods for PHEN and 3-OH-PHEN in human blood plasma with different sample preparation methods.

Materials and methods. The determination of PHEN and 3-OH-PHEN has been performed by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Solid-phase extraction (SPE) and liquid extraction with support (SLE) otherwise called liquid-liquid extraction in the solid phase were used for sample preparation. Metoprolol was utilized as an internal standard (IS). Gradient elution profile between mobile phase A (0.2 % aqueous formic acid) and B (100 % acetonitrile) has been used. Column: Hypersil GOLD® C18, 50 × 2.1 mm, 3.5 μm.

Results and discussion. Two methods have been developed for the quantitative determination of PHEN and 3-OH-PHEN in human blood plasma using different sample preparation methods: SPE and SLE. The conditions of chromatographic separation and mass spectrometric detection of the analytes are selected. The following validation characteristics were determined for both methods: selectivity, calibration curve, accuracy, precision, degree of extraction, LLOQ, carry-over effect, matrix factor, stability of standard solutions and analyte in the matrix.

Conclusion. The validation results of the developed methods meet the established criteria, which allows them to be used for the quantitative determination of PHEN and 3-OH-PHEN in human blood plasma. The wide analytical range for both methods 1–1000.00 ng/ml allows the use them for pharmacokinetics and bioequivalence studies, as well as in toxicology.

Keywords: phenazepam, 3-oxyphenazepam, HPLC-MS/MS, validation, solid phase extraction, supported liquid extraction

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Igor I. Miroshnichenko and Dmitriy V. Ivaschenko are responsible for the statement of the problem, the purpose of the study and general general articles. Angelina I. Platova carried out quality control and validation procedures. Ivan I. Kuzmin measured the concentration of the analytes under study.

For citation: Miroshnichenko I. I., Platova A. I., Kuzmin I. I., Ivaschenko D. V. Quantitative determination of phenazepam and its active metabolite in human blood plasma at different extraction procedures. *Drug development & registration*. 2024;13(3):199–207. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1609>

ВВЕДЕНИЕ

Феназепам (бромдигидрохлорфенилбензодиазепин, 7-бром-5-(2-хлорфенил)-1,3-дигидро-2Н-1,4-бензодиазепин-2-он) – производное бензодиазепина, структурно сходное с флуромазепамом, в котором хлор заменен на фтор в фенильной группе Moosmann [1]. Этот транквилизатор впервые синтезировали в 1974 г. в результате совместной разработки

НИИ фармакологии им. В. В. Закусова и Одесского физико-химического института им. А. В. Богатского АН СССР [2–4].

ФЕН относится к высокопотентным бензодиазепинам. Обладая успокоительным, седативным, противосудорожным и миорелаксирующим свойствами, этот препарат успешно применяется для купирования синдрома отмены алкоголя [5].

К сожалению, помимо мощного и быстрого фармакотерапевтического действия, ФЕН вызывает формирование лекарственной зависимости [6]. Особую опасность представляет прием препарата водителями автотранспорта [7, 8]. В РФ с 22.03.2021 ФЕН включен в раздел II номенклатуры сильнодействующих и ядовитых веществ, не являющихся прекурсорами наркотических средств и психотропных веществ.

ФЕН, подобно другим 1,4-бензодиазепинам, интенсивно метаболизируется, и только небольшая доля полученной дозы выводится в неизмененном виде. Основным активный метаболит 3-ОН-ФЕН, кроме того, является основным действующим веществом препарата «Левана» (МНН: циназепам) [9] (рисунок 1).

На интенсивность метаболизма ФЕН может влиять комедикация с препаратами – ингибиторами или индукторами цитохрома 3A4/5, что сказывается на концентрациях 3-ОН-ФЕН и ФЕН в крови [10]. Наличие у 3-ОН-ФЕН фармакологической активности означает необходимость измерения его уровня наряду с основным веществом. Широкая фармакокинетическая вариабельность ФЕН и 3-ОН-ФЕН требует изучения и проведения ТЛМ. При приеме ФЕН в клинической дозе 0,5–2,0 мг максимальные концентрации в плазме крови варьируют от 20 до 60 нг/мл (терапевтический диапазон), а при злоупотреблении ФЕН они могут более чем в 50 раз превышать этот уровень. Так, по данным анализа судебно-медицинских образцов крови водителей, задержанных за вождение в нетрезвом виде в США, Великобритании и Финляндии, измеренные уровни ФЕН варьировали в диапазоне 50–5000 нг/мл. А уровень ФЕН в крови пациентов с наркотической зависимостью ($n = 20$) в Финляндии составил 18–4000 нг/мл [11]. Поэтому для возможности применения в широких целях методика количественного определения ФЕН и 3-ОН-ФЕН, помимо экспрессности и простой техники пробоподготовки, должна также иметь как можно более широкий аналитический диапазон.

Ранее для количественного определения ФЕН была разработана и применена методика ВЭЖХ с УФ-детекцией и газовой хроматографией с детектором электронного захвата [12]. Аналитический диа-

пазон в этой работе был узким, составляя 50–150 для ФЕН и 80–200 нг/мл для 3-ОН-ФЕН, а двухэтапная экстракция не обеспечивала должную экспрессность. В другой работе НПКО этой методики был снижен до 1 и 3 нг/мл для ФЕН и 3-ОН-ФЕН соответственно [13]. Методика S. Kerrigan и соавт. (2013) также подразумевала газовую хромато-масс-спектрометрию, ограничивалась количественным определением ФЕН без метаболита и имела аналитический диапазон 1–100 нг/мл [7]. По-видимому, термолабильность молекул ФЕН и 3-ОН-ФЕН существенно ограничивает возможности газовой хроматографии в их количественном определении.

Альтернативой хроматографическим подходам может выступать иммуноанализ (ИФА), однако он имеет существенные ограничения из-за перекрестной интерференции, методика L. C. O'Connor и соавт. (2016) не включала метаболит ФЕН и ограничивалась аналитическим диапазоном 5–300 нг/мл [14]. В настоящее время все большую популярность в биоаналитике бензодиазепиновых производных приобретает ВЭЖХ-МС/МС, в работе R. A. Mastrovito и соавт. (2021) приведена методика количественного определения 12 бензодиазепинов, которая включала ФЕН (аналитический диапазон 1,88–200 нг/мл), но не его метаболит [15]. Chu-An Yang и соавт. (2022) была разработана методика ВЭЖХ-МС/МС для одновременного измерения ФЕН и этизолама, которая также не включала 3-ОН-ФЕН [16]. В другой публикации приведены сведения по методике одновременного измерения в крови 13 дизайнерских бензодиазепинов, включая 3-ОН-ФЕН (аналитический диапазон 1–500 нг/мл), однако данная работа не включала собственно ФЕН [17]. Представляет интерес методика M. P. Pettersson и соавт. (2016) для количественного определения 28 дизайнерских бензодиазепинов в моче, в том числе ФЕН и 3-ОН-ФЕН (аналитический диапазон 5–1000 нг/мл), с применением метода масс-спектрометрии высокого разрешения [18].

M. L. Crichton и соавт. [19] проводили количественное определение ФЕН и 3-ОН-ФЕН в посмертных жидкостях и тканях с помощью ВЭЖХ-МС/МС, в работе подробно не представлены условия пробоподготовки, калибровочный диапазон для ФЕН (0,7–

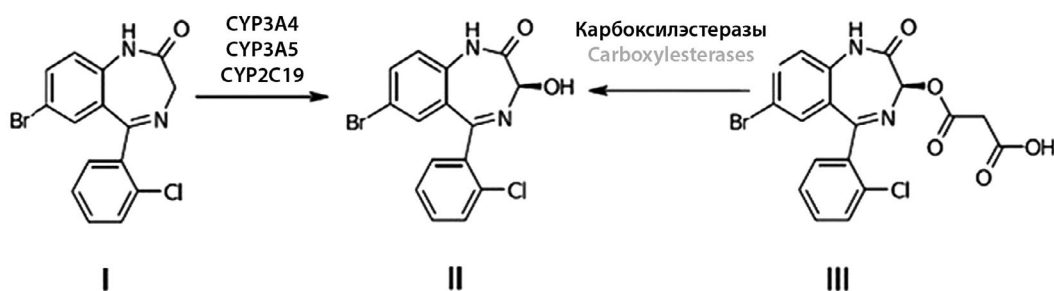


Рисунок 1. I – феназепам, II – 3-гидроксифеназепам, III – циназепам

Figure 1. I – phenazepam, II – 3-hydroxyphenazepam, III – cinazepam

200 нг/мл) был узким, а НПКО 3-ОН-ФЕН – высоким (16–1000 нг/мл).

Таким образом, в настоящее время в литературе отсутствует описание методики одновременного определения ФЕН и 3-ОН-ФЕН для ТЛМ с быстрым и простым методом пробоподготовки, широким аналитическим диапазоном и низким НПКО. Поэтому было решено разработать и валидировать соответствующую методику самостоятельно на основе ВЭЖХ-МС/МС.

Существенным этапом разработки методики количественного определения является выбор метода экстракции с учетом физико-химических свойств измеряемого вещества. Самыми распространенными методами пробоподготовки являются жидкостно-жидкостная экстракция (LLE, от англ. «liquid-liquid extraction») и SPE. В одних методиках применяли LLE [8, 13, 15, 19], в других – SPE [7, 17]. Однако в последнее время набирает популярность жидкостная экстракция с поддержкой (SLE), гибридный метод, сочетающий принципы и преимущества обоих подходов – LLE и SPE. SLE по сравнению с LLE позволяет получать экстракты с более низким содержанием примесей. При этом нивелируется возможность матричного эффекта из-за связывания с сорбентом картриджа (обычно кремнеземом) фосфолипидов и прочих компонентов матрицы, что повышает прецизионность методики в целом. Кроме того, SLE позволяет повышать степень экстракции, а также сокращает длительность пробоподготовки. Поэтому методы SPE и SLE для проведения ТЛМ были выбраны как предпочтительные.

ФЕН (CAS: 51753-57-2) и 3-ОН-ФЕН (CAS: 70030-11-4) – слабые основания с прогнозируемыми величинами 3,3 и 2,5 для липофильности (log P), а также 10,8 и 11,58 для константы диссоциации (pKa) соответственно. Внутренний стандарт (ВС) – метопролол (CAS: 51384-51-1, pKa = 9,56 и log P = 1,88) также является слабым основанием, не реагирует с исследуемыми аналитами, стабилен и имеет иное время удерживания по сравнению с ФЕН и 3-ОН-ФЕН.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты, реактивы, оборудование и программное обеспечение

Субстанция феназепам (чистотой не менее 99,0 %, АО «Валента Фарм», Россия); метопролола тартрат (стандартный образец, количественное содержание 99,0–101,0 %, Sigma-Aldrich, США); стандартный образец 3-ОН-ФЕН (чистота не менее 99,0 %, ФГБНУ НИИ фармакологии, Россия); муравьиная кислота (класс «98 % pure», Sigma-Aldrich, США), метил-трет-бутиловый эфир (категория «LC-MS grade», Tedia Company, Inc., США); метанол (MeOH) и ацетонитрил (класс «LC-MS grade», Dima Technology Inc., США). Картриджи: AccuBond SPE ODS-C18 (Agilent Technologies, США) и HyperSep™ SLE (pH7) (Thermo Fisher Scientific, США).

Оборудование для ВЭЖХ-МС/МС включало жидкостный хроматограф UltiMate 3000 (Dionex, США), оснащенный бинарным насосом, дегазатором, автоинжектором и модулем колонок, сопряженный с квадрупольным масс-спектрометром TSQ Quantiva (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве распыляющего и вспомогательного газа использовали азот от генератора Genius 1022 (PEAK Scientific, Великобритания), для деионизации воды использовали систему высокой очистки Simplicity® UV System (Millipore Corporation, США).

Анализ хроматограмм выполняли с использованием программного обеспечения Thermo Xcalibur.

Растворы, калибровочные стандарты и образцы контроля качества

Маточный раствор смеси ФЕН и 3-ОН-ФЕН с концентрацией каждого аналита 1,0 мг/мл готовили в MeOH. Рабочие растворы для калибровочных стандартов получали путем серийного разбавления MeOH до концентраций 10; 25; 50; 100; 500; 1000; 2500; 5000 и 10000 нг/мл. Отдельно приготавливали растворы для образцов контроля качества (QC) с получением итоговых концентраций аналитов 30; 200; 2000; 5000; 7500 нг/мл в MeOH. Метопролол (BC) растворяли в 100 % MeOH до концентрации 1,0 мг/мл и далее доводили до концентрации 100 нг/мл раствором H₂O:MeOH (50/50 % v/v). Все растворы хранили при температуре 4 °C не более 1 месяца. Калибровочные образцы готовили добавлением к 400 мкл интактной человеческой плазмы (от 6 здоровых доноров) по 50 мкл рабочего раствора и ВС. Для приготовления образцов QC к 400 мкл интактной человеческой плазмы добавляли по 50 мкл рабочего раствора и ВС.

Пробоподготовка

SPE. Картриджи AccuBond SPE ODS-C18 кондиционировали 3 × 1 мл MeOH и уравнивали 3 × 1 мл деионизированной воды. Далее 0,5 мл плазмы разбавляли 0,5 мл воды, перемешивали на вибровстряхивателе типа Vortex и центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин. Супернатант наносился на картридж, далее проводили промывку 3 × 1 мл 5 % водным раствором MeOH, после чего аналиты элюировали 1 мл этанола 1 мин. Полученный элюат упаривали досуха под током азота при температуре 40 °C. Далее осадок растворяли в 250 мкл подвижной фазы перемешиванием на Vortex.

SLE. 0,5 мл плазмы разбавляли 0,5 мл воды, перемешивали на Vortex, центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин и наносили на картриджи HyperSep™ SLE. Для начала загрузки патронов применяли пульсирующий вакуум в течение 5 с. Затем после 5-минутного ожидания образцы элюировали 1 мл метил-трет-бутилового эфира с дальнейшим выпариванием в токе азота при 40 °C и перерастворением в 250 мкл подвижной фазы.

Условия хроматографического анализа

Подвижная фаза: 0,2%-й водный раствор муравьиной кислоты (элюент А) и 100%-й ацетонитрил (элюент В).

ФЕН, 3-ОН-ФЕН и ВС разделяли на колонке Hyper-sil GOLD™ (3,5 мкм, внутренний диаметр 50 × 2,1 мм, Thermo Fisher Scientific, США) с предколонкой HyPU-RITY Aquastar 4,0 × 10,0 мм (Thermo Fisher Scientific, США) и термостатированием при 20 °С.

Скорость подвижной фазы составляла 0,2 мл/мин при объеме инъекции 2 мкл. Оптимальное разделение пиков аналитов было достигнуто при использовании градиентного режима (таблица 1).

Таблица 1. Градиентный состав подвижной фазы

Table 1. Gradient composition of the mobile phase

Время, мин Time, min	Скорость потока ПФ, мл/мин Flow rate, ml/min	0,2%-й раствор муравьиной кислоты в воде 0.2 % aqueous formic acid	100%-й ацетонитрил Acetonitrile 100 %
0	0,2	85	15
0,5	0,2	85	15
7	0,2	15	85
10	0,2	85	15
12	0,2	85	15
12	Окончание анализа Stop analysis		

Примечание. ПФ – подвижная фаза.

Note. MP – mobile phase.

В указанных условиях время удерживания ФЕН составило $4,9 \pm 0,2$ мин, 3-ОН-ФЕН – $1,5 \pm 0,1$ мин, ВС – $2,1 \pm 0,1$ мин. Выбор метопролола в качестве ВС обусловлен схожестью его хроматографических характеристик с аналитами (рисунок 2).

Режим масс-спектрометрической детекции

Параметры масс-спектрометрического детектирования оптимизировали с использованием шприцевого насоса. В качестве метода ионизации использовали электроспрей (ESI) при положительной полярности (с образованием протонированных молекулярных ионов) и напряжении на капилляре 4000 В. Температура ион-трансферного капилляра и испарителя (азот) составляла 350 и 333 °С соответственно. Давление оболочечного (sheath), вспомогательного (aux) и очищающего (sweep) газа устанавливали на 30, 15 и 1 отн. ед. соответственно. Аргон высокой чистоты в камере соударений находился под давлением 1,5 мТорр.

Детектор работал в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). Во время сбора данных время задержки (dwell time) составляло 100 мс. Параметры масс-спектрометрической детекции для аналитов и ВС – MRM-переходы и напряжение камеры соударений (CE) – представлены в таблице 2.

Спектр дочерних ионов 3-ОН-ФЕН иллюстрирует этап определения параметров MRM (рисунок 3).

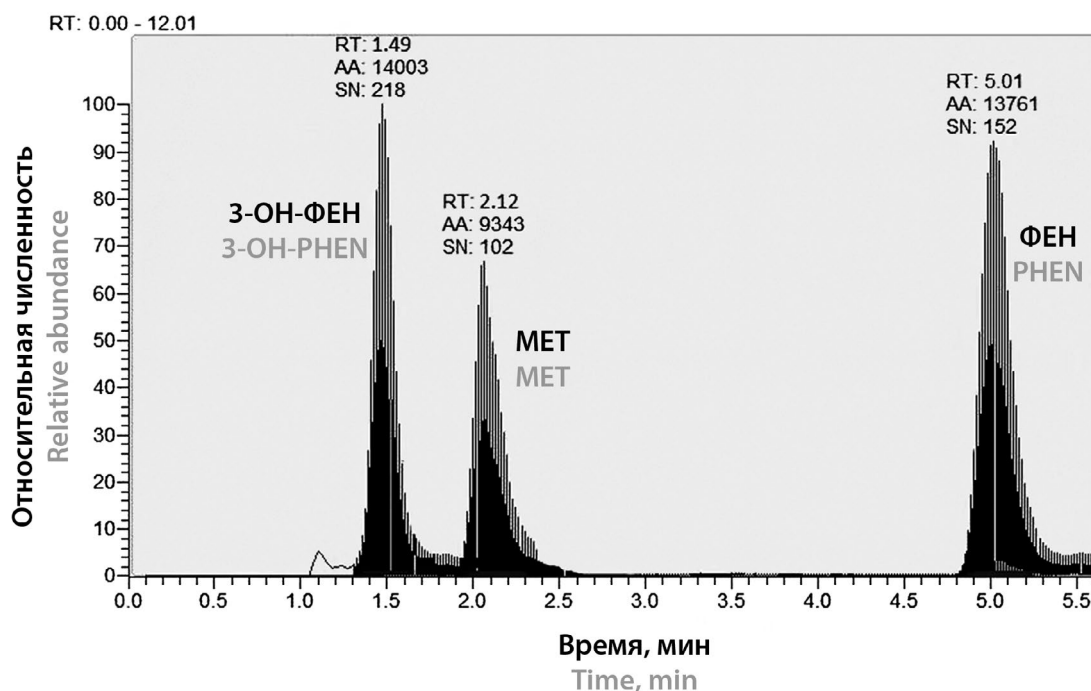


Рисунок 2. Хроматограмма феназепама и 3-гидроксифеназепама образца контроля качества (300 нг/мл)

Figure 2. Phenazepam and 3-hydroxyphenazepam chromatogram of quality control sample (300 ng/ml)

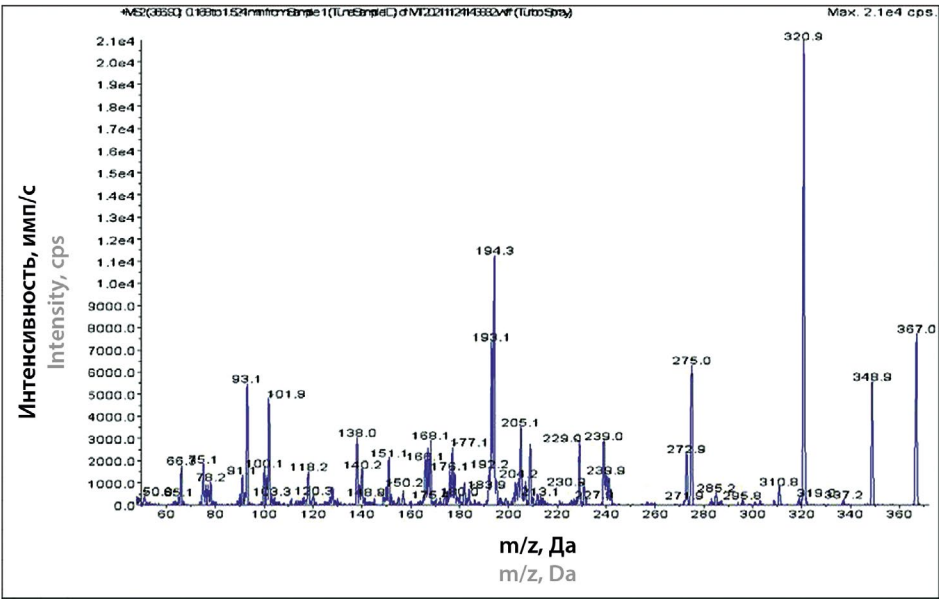


Рисунок 3. Спектр дочерних ионов 3-гидроксифеназепама
Figure 3. Daughter-ions spectrum of 3-hydroxyphenazepam

Таблица 2. Параметры
масс-спектрометрической детекции

Table 2. Parameters of mass spectrometric detection

Аналит Analyt	Ион-прекурсор, m/z Precursor ion, m/z	Дочерний ион, m/z Daughter ion, m/z	CE, В CE, V
ФЕН PHEN	349,0	206,0 (184,0)	7
3-ОН-ФЕН 3-OH-PHEN	366,9	320,9 (194,3)	7
BC IS	268,0	116,0	30

Примечание. В скобках приведены подтверждающие ионы.

Note. There are confirming ions in parentheses.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидация проводилась в соответствии с требованиями ЕАЭС (Евразийского экономического союза), а также руководств ЕМА и FDA^{1,2} [20].

¹ Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: <https://www.alta.ru/tamdoc/16sr0085/?ysclid=ls2wqwk0oy569347177>. Ссылка активна на 06.10.2023.

² ICH M10 on bioanalytical method validation – Scientific guideline. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation-scientific-guideline>. Accessed: 15.01.2024.

Селективность

Для оценки селективности проводили анализ образцов интактной плазмы крови, образцов с добавлением рабочих растворов смеси аналитов с получением концентрации 1,0 нг/мл для каждого из них (на уровне НПКО), а также раствора ВС (для итоговой концентрации 10 нг/мл). При обоих методах пробоподготовки отклик сигнала детектора для интактной плазмы, соответствующий MRM-переходам ФЕН и 3-ОН-ФЕН, не превышал 20 % от уровня сигнала образцов с добавлением рабочих растворов, а также 5 % от сигнала ВС. Таким образом, методика продемонстрировала селективность независимо от метода пробоподготовки.

Калибровочная зависимость

Калибровочные зависимости для ФЕН и 3-ОН-ФЕН были линейны в диапазоне концентраций 1–1000 нг/мл с НПКО, равным 1,0 нг/мл. Соотношение сигнал/шум на уровне НПКО было более чем в 10 раз (S/N = 15) больше уровня сигнала холостого образца.

Для обоих методов экстракции для каждого аналита были построены калибровочные зависимости. Коэффициент детерминации во всех случаях превосходил величину 0,999 (таблица 3).

Все концентрации калибровочных стандартов, вычисленные обратным пересчетом, находились в пределах 20 % от номинальных значений на уровне НПКО и 15 % для всех других уровней концентрации.

Таблица 3. Калибровочные кривые, полученные с помощью линейной регрессии

Table 3. Calibration curves generated by a linear regression

	SPE	SLE
ФЕН PHEN	$Y = 0,2265 + 0,0075 \cdot X$ ($R^2 = 0,9995$)	$-0,1469 + 0,0073 \cdot X$ ($R^2 = 0,9998$)
3-ОН-ФЕН 3-OH-PHEN	$-0,0570 + 0,0259 \cdot X$ ($R^2 = 0,9992$)	$-0,0458 + 0,0272 \cdot X$ ($R^2 = 0,9995$)

Примечание. Y – отношение площади пика каждого анализируемого вещества к IS; X – концентрация аналита; R^2 – коэффициент детерминации.

Note. Y – peak area ratios of each analyte to IS; X – the concentration of analyte; R^2 – coefficient of determination.

Точность и прецизионность

Правильность и прецизионность метода в пределах одного дня (intra-day) оценивались путем анализа QC в 5 повторах на 5 уровнях концентрации (1; 3; 50; 500 и 750 нг/мл).

Междневную правильность и прецизионность (inter-day) определяли анализом образцов QC на каждом уровне концентрации в течение 3 последовательных дней. Средние величины рассчитанных концентраций находились в пределах $\pm 15\%$ от номинальных значений для образцов QC, а для уровня НПКО – в пределах $\pm 20\%$ от номинальных значений (таблица 4).

Анализ ANOVA для параметров «правильность» и «прецизионность» включал следующие факторы: уровень концентрации, тип валидации (внутридневная или междневная), аналит (ФЕН или 3-ОН-ФЕН), а также метод пробоподготовки (SPE или SLE). Было установлено, что метод пробоподготовки не влияет на параметр «правильность» (p -величина F -теста составила 0,9773). При этом было показано, что величина, отражающая прецизионность (RSD), при методе SLE была достоверно меньше по сравнению с методом SPE (p -величина F -теста составила 0,0294). Таким образом, случайная ошибка измерения при SLE ниже, чем при SPE.

Степень экстракции и эффект матрицы (ЭМ)

Степень экстракции оценивали как $(\text{tg } \alpha / \text{tg } \beta) \times 100\%$, где α – угол калибровочной зависимости, построенной путем добавления стандартных растворов к подвижной фазе, а β – угол калибровочной зависимости, построенной для калибровочных образцов (с добавлением ВС). Степень экстракции составила 89,5 и 86,5 % для метода SPE, а также 96,4 и 92,9 % для метода SLE для ФЕН и 3-ОН-ФЕН соответственно.

ЭМ оценивали на уровне концентраций образцов QC как отношение площадей пиков аналита, разбавленного в бланковой плазме и разведенной в 10 раз плазме подвижной фазе. ЭМ для обоих аналитов не превышал 5 % отклонения, составляя 94,3 и 92,5 % для ФЕН и 3-ОН-ФЕН при SPE, а также 98,9 и 96,4 % для ФЕН и 3-ОН-ФЕН при SLE. ЭМ, нормализованный по ВС, составил 93,1 и 94,6 % для ФЕН и 3-ОН-ФЕН при SPE, а также 98,4 и 97,1 % для ФЕН и 3-ОН-ФЕН при SLE. Как видно из представленных показателей, метод SLE по сравнению с SPE показал снижение вли-

яния матрицы на отклик масс-спектрометрического детектора. Нормализованный по ВС ЭМ подтверждает верность выбора метопролола в качестве ВС.

Таблица 4. Правильность и точность методик определения ФЕН и 3-ОН-ФЕН при разных процедурах экстракции ($n = 5$)

Table 4. Accuracy and precision of methods for determining FEN and 3-OH-FEN for different extraction procedures ($n = 5$)

Концентрация добавленная (нг/мл) Concentration added (ng/ml)	Правильность (E, %) Accuracy (E, %)	Прецизионность (RSD, %) Precision (RSD, %)	Правильность (E, %) Accuracy (E, %)	Прецизионность (RSD, %) Precision (RSD, %)
	SPE		SLE	
Внутридневная Insideday	ФЕН PHEN			
1	-0,14	16,05	7,41	11,44
3	6,93	8,29	10,00	3,53
50	3,31	11,78	4,31	10,09
500	6,39	10,34	6,04	10,51
750	4,33	10,76	4,33	10,76
Внутридневная Insideday	3-ОН-ФЕН 3-OH-PHEN			
1	6,28	15,61	8,44	12,13
3	-3,69	11,20	-5,64	7,30
50	2,09	8,16	6,71	5,79
500	0,75	10,60	-0,32	8,51
750	12,92	6,14	3,03	5,37
Междневная Interday	ФЕН PHEN			
1	8,76	13,19	7,27	10,86
3	10,54	6,62	9,03	4,42
50	5,45	2,36	5,78	1,94
500	9,64	2,90	9,52	3,10
750	3,47	1,20	3,47	1,20
Междневная Interday	3-ОН-ФЕН 3-OH-PHEN			
1	9,61	15,43	7,27	9,3
3	-2,84	6,21	-3,49	6,44
50	3,40	2,14	4,94	2,38
500	-0,54	1,41	-0,70	1,21
750	6,30	5,73	6,30	5,73

Результаты валидации подтвердили соответствие методики современным регуляторным требованиям ЕАЭС, ЕМА и FDA.

Эффект переноса

Эффект переноса оценивали, вводя холостые образцы после градуировочных растворов в концентрации 1000 нг/мл. Перенос в холостой образец не должен превышать 20 % величины НПКО для аналита и 5 % для ВС. Эффект переноса не наблюдали при обоих методах пробоподготовки, ни для аналитов, ни для ВС.

Стабильность

Стабильность исходных и рабочих растворов анализируемого вещества и ВС. При хранении рабочих растворов аналитов и ВС в течение одного месяца при температуре 4 °С снижение уровня измеряемой концентрации составило 16,8 и 17,6 % для ФЕН и 3-ОН-ФЕН, не влияя при этом на стабильность рабочего раствора ВС (снижение на 1,7 %). Снижение уровня измеряемой концентрации при хранении рабочих растворов аналитов в течение 10 дней не превышало 5 % для обоих аналитов.

Стабильность замороженного и размороженного биологического образца, содержащего анализируемые вещества. Для оценки стабильности образцов при замораживании – оттаивании определяли стабильность QC-образцов для трех уровней концентраций ФЕН и 3-ОН-ФЕН (QC1, QC3 и QC5) в плазме после 3 циклов замораживания – оттаивания (при комнатной температуре). При этом была продемонстрирована стабильность обоих аналитов: отклонения не превышали 15 % (при анализе обоими методами пробоподготовки).

Краткосрочная стабильность аналитов в матрице при комнатной температуре. Для оценки стабильности аналитов в плазме крови человека использовали образцы QC2 (соответствующие ЗНПКО – 3 нг/мл) и QC5 (750 нг/мл), которые хранились при комнатной температуре в течение 24 и 48 ч до пробоподготовки. Далее проводился анализ хранившихся образцов наряду со свежеприготовленными в составе одной аналитической серии. Рассчитанную концентрацию после хранения образцов вычитали из величины концентрации свежеприготовленных образцов, далее делили на концентрацию свежеприготовленных образцов и умножали на 100 %. При хранении матрицы свыше 48 часов отклонение превышало 15 % для 3-ОН-ФЕН, составив 33,2 и 36,5 % при SPE и 34,6 и 33,4 % при SLE, для образцов QC2 и QC5 соответственно. При хранении в пределах 24 ч для 3-ОН-ФЕН, а также при хранении в пределах 24 или 48 ч для ФЕН оценка стабильности не превышала 15%-й порог.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложены и валидированы 2 экспрессные, высокочувствительные и специфичные методики определения содержания ФЕН и его активного метаболита

в плазме крови человека при разных типах экстракции (SPE и SLE). Время пробоподготовки при обоих методах экстракции не превышало 15 мин. Обе методики успешно прошли валидацию, результаты которой показали их соответствие современным требованиям. SLE достоверно снижала случайную ошибку измерения, оцененную как прецизионность, а также несколько снижала матричный эффект. Независимо от метода пробоподготовки длительность хранения рабочих растворов ФЕН и 3-ОН-ФЕН не должна превышать 10 дней, а длительность хранения этих аналитов в матрице при комнатной температуре не должна превышать 24 ч. Близкое время удерживания метопролола с аналитами при хроматографическом разделении, хорошая стабильность при хранении его рабочих растворов, а также снижение влияния матрицы при нормализации по ВС подтверждают правильность выбора метопролола в качестве ВС.

Низкий уровень НПКО – 1 нг/мл для обоих аналитов, широкий аналитический диапазон (1–1000 нг/мл), а также отсутствие необходимости в дейтерированном ВС обозначают перспективу применения разработанных аналитических методик как в исследованиях фармакокинетики и биоэквивалентности, ТЛМ, так и в токсикологических лабораториях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Moosmann B., Huppertz L. M., Hutter M., Buchwald A., Ferlaino S., Auwärter V. Detection and identification of the designer benzodiazepine flubromazepam and preliminary data on its metabolism and pharmacokinetics. *Journal of Mass Spectrometry*. 2013;48(11):1150–1159.
2. Воронина Т. А., Середенин С. Б. Перспективы поиска новых анксиолитиков. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2002;65(5):4–17.
3. Городничев А. В., Костюкова Е. Г. Место феназепама в современном применении бензодиазепиновых транквилизаторов. *Современная терапия психических расстройств*. 2011;2:26–29.
4. Середенин С. Б., Воронина Т. А., Незнамов Г. Г., Жердев В. П. Феназепам: 25 лет в медицинской практике. Москва: Наука; 2007. 222 с.
5. Осадший Ю. Ю., Вобленко Р. А., Арчаков Д. С., Тараканова Е. А. Место бензодиазепинов в современной терапии психических расстройств (обзор доказательных исследований). *Современная терапия психических расстройств*. 2016;1:2–10.
6. Brunetti P., Giorgetti R., Tagliabracchi A., Huestis M. A., Bussardò F. P. Designer benzodiazepines: a review of toxicology and public health risks. *Pharmaceuticals*. 2021;14(6):560. DOI: 10.3390/ph14060560.
7. Kerrigan S., Mellon M. B., Hinnens P. Detection of phenazepam in impaired driving. *Journal of Analytical Toxicology*. 2013;37(8):605–610. DOI:10.1093/jat/bkt075.
8. Stephenson J. B., Golz D. E., Brasher M. J. Phenazepam and its Effects on Driving. *Journal of Analytical Toxicology*. 2013;37(1):25–29. DOI: 10.1093/jat/bks080.
9. Воронина Т. А., Ларионов В. Б., Головенко Н. Я., Неробкова Л. Н., Гайдуков И. О. Роль 3-оксиметаболита феназепама и леваны в реализации их нейротропного действия. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2014;1:44–49.
10. Zastrozhin M. S., Skryabin V. Yu., Sorokin A. S., Petukhov A. E., Smirnov V. V., Pankratenko E. P., Grishina E. A.,

- Ryzhikova K. A., Panov A. S., Savchenko L. M., Bryun E. A., Sychev D. A. CYP3A subfamily activity affects the equilibrium concentration of Phenazepam® in patients with anxiety disorders and comorbid alcohol use disorder. *Pharmacogenomics*. 2020;21(7):449–457. DOI: 10.2217/pgs-2019-0071.
11. Pennings E., van Amsterdam J. G. C., Schoones J. W., Kershaw S. Phenazepam Pre-Review Report Agenda item 5.8 Expert Committee on Drug Dependence Thirty-seventh Meeting. *World Health Organization*. 2015.
12. Жердев В. П., Воронина Т. А., Гарибова Т. Л., Колыванов Г. Б., Литвин А. А., Сариев А. К., Тохмахчи В. Н., Васильев А. Е. Оценка фармакокинетики и эффективности феназепама у крыс при трансдермальном и энтеральном способах введения. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2003;66(1):50–53.
13. Ékonomov A. L., Zherdev V. P. Method of quantitative gas-chromatographic determination of phenazepam and its metabolite 3-hydroxyphenazepam in plasma. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 1980;14(8):579–582.
14. O'Connor L. C., Torrance H. J., McKeown D. A. ELISA detection of phenazepam, etizolam, pyrazolam, flubromazepam, diclazepam and delorazepam in blood using Immunoanalysis® benzodiazepine kit. *Journal of Analytical Toxicology*. 2016;40(2):159–161. DOI: 10.1093/jat/bkv122.
15. Mastrovito R. A., Papsun D. M., Logan B. K. The Development and Validation of a Novel Designer Benzodiazepines Panel by LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*. 2021;45(5):423–428. DOI: 10.1093/jat/bkab013.
16. Yang C.-A., Tsai C.-Y., H.-C. Liu, Liu R. H., Lin D.-L. Designer benzodiazepines and their metabolites in post- and antemortem specimens: Quantitation by UHPLC-MS/MS and findings in Taiwan. *Toxicologie Analytique et Clinique*. 2022;34(3):S180. DOI: 10.1016/j.toxac.2022.06.312.
17. Mei V., Concheiro M., Pardi J., Cooper G. Validation of an LC-MS/MS Method for the Quantification of 13 Designer Benzodiazepines in Blood. *Journal of Analytical Toxicology*. 2019;43(9):688–695. DOI: 10.1093/jat/bkz063.
18. Pettersson Bergstrand M., Beck O., Helander A. Urine analysis of 28 designer benzodiazepines by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Clinical Mass Spectrometry*. 2018;10:25–32. DOI: 10.1016/j.clinms.2018.08.004.
19. Crichton M. L., Shenton C. F., Drummond G., Beer L. J., Seetohul L. N., Maskell P. D. Analysis of phenazepam and 3-hydroxyphenazepam in post-mortem fluids and tissues. *Drug Testing and Analysis*. 2015;7(10):926–936. DOI: 10.1002/dta.1790.
20. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. New Hampshire: Biopharmaceutics; 2018. 44 p.
- formed consensus. *Current Therapy of Mental Disorders*. 2016;1:2–10. (In Russ.)
6. Brunetti P., Giorgetti R., Tagliabracchi A., Huestis M. A., Busardò F. P. Designer benzodiazepines: a review of toxicology and public health risks. *Pharmaceuticals*. 2021;14(6):560. DOI: 10.3390/ph14060560.
7. Kerrigan S., Mellon M. B., Hinners P. Detection of phenazepam in impaired driving. *Journal of Analytical Toxicology*. 2013;37(8):605–610. DOI:10.1093/jat/bkt075.
8. Stephenson J. B., Golz D. E., Brasher M. J. Phenazepam and its Effects on Driving. *Journal of Analytical Toxicology*. 2013;37(1):25–29. DOI: 10.1093/jat/bks080.
9. Voronina T. A., Larionov V. B., Golovenko N. Y., Nerobkova L. N., Gaidukov I. O. Role of 3-oximetabolite phenazepam and levan in realize their neurotropic efficacy. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2014;1:44–49 (In Russ.)
10. Zastrozhin M. S., Skryabin V. Yu., Sorokin A. S., Petukhov A. E., Smirnov V. V., Pankratenko E. P., Grishina E. A., Ryzhikova K. A., Panov A. S., Savchenko L. M., Bryun E. A., Sychev D. A. CYP3A subfamily activity affects the equilibrium concentration of Phenazepam® in patients with anxiety disorders and comorbid alcohol use disorder. *Pharmacogenomics*. 2020;21(7):449–457. DOI: 10.2217/pgs-2019-0071.
11. Pennings E., van Amsterdam J. G. C., Schoones J. W., Kershaw S. Phenazepam Pre-Review Report Agenda item 5.8 Expert Committee on Drug Dependence Thirty-seventh Meeting. *World Health Organization*. 2015.
12. Zherdev V. P., Voronina T. A., Garibova T. L., Kolyvanov G. B., Litvin A. A., Sariev A. K., Tohmahchi V. N., Vasil'ev A. E. A comparative study of the pharmacokinetics and efficacy of fenazepam upon transdermal and enteral administration. *Экспериментальная и Клиническая Фармакология*. 2003;66(1):50–53 (In Russ.)
13. Ékonomov A. L., Zherdev V. P. Method of quantitative gas-chromatographic determination of phenazepam and its metabolite 3-hydroxyphenazepam in plasma. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 1980;14(8):579–582.
14. O'Connor L. C., Torrance H. J., McKeown D. A. ELISA detection of phenazepam, etizolam, pyrazolam, flubromazepam, diclazepam and delorazepam in blood using Immunoanalysis® benzodiazepine kit. *Journal of Analytical Toxicology*. 2016;40(2):159–161. DOI: 10.1093/jat/bkv122.
15. Mastrovito R. A., Papsun D. M., Logan B. K. The Development and Validation of a Novel Designer Benzodiazepines Panel by LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*. 2021;45(5):423–428. DOI: 10.1093/jat/bkab013.
16. Yang C.-A., Tsai C.-Y., H.-C. Liu, Liu R. H., Lin D.-L. Designer benzodiazepines and their metabolites in post- and antemortem specimens: Quantitation by UHPLC-MS/MS and findings in Taiwan. *Toxicologie Analytique et Clinique*. 2022;34(3):S180. DOI: 10.1016/j.toxac.2022.06.312.
17. Mei V., Concheiro M., Pardi J., Cooper G. Validation of an LC-MS/MS Method for the Quantification of 13 Designer Benzodiazepines in Blood. *Journal of Analytical Toxicology*. 2019;43(9):688–695. DOI: 10.1093/jat/bkz063.
18. Pettersson Bergstrand M., Beck O., Helander A. Urine analysis of 28 designer benzodiazepines by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Clinical Mass Spectrometry*. 2018;10:25–32. DOI: 10.1016/j.clinms.2018.08.004.
19. Crichton M. L., Shenton C. F., Drummond G., Beer L. J., Seetohul L. N., Maskell P. D. Analysis of phenazepam and 3-hydroxyphenazepam in post-mortem fluids and tissues. *Drug Testing and Analysis*. 2015;7(10):926–936. DOI: 10.1002/dta.1790.
20. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. New Hampshire: Biopharmaceutics; 2018. 44 p.

REFERENCES

1. Moosmann B., Huppertz L. M., Hutter M., Buchwald A., Ferlino S., Auwärter V. Detection and identification of the designer benzodiazepine flubromazepam and preliminary data on its metabolism and pharmacokinetics. *Journal of Mass Spectrometry*. 2013;48(11):1150–1159.
2. Voronina T. A., Seredenin S. B. Prospects of search for new anxiolytics. *Экспериментальная и Клиническая Фармакология*. 2002;65(5):4–17. (In Russ.)
3. Gorodnichev A. V., Kostyukova E. G. The place of phenazepam in the modern use of benzodiazepine tranquilizers. *Current Therapy of Mental Disorders*. 2011;2:26–29 (In Russ.)
4. Seredenin S. B., Voronina T. A., Neznamov G. G., Zherdev V. P. Phenazepam: 25 years in medical practice. Moscow: Nauka; 2007. 222 p. (In Russ.)
5. Osadshiy Y. Y., Voblenko R. A., Archakov D. S., Tarakanova E. A. Benzodiazepines. An attempt to arrive at an informed consensus. *Current Therapy of Mental Disorders*. 2016;1:2–10. (In Russ.)
6. Brunetti P., Giorgetti R., Tagliabracchi A., Huestis M. A., Busardò F. P. Designer benzodiazepines: a review of toxicology and public health risks. *Pharmaceuticals*. 2021;14(6):560. DOI: 10.3390/ph14060560.
7. Kerrigan S., Mellon M. B., Hinners P. Detection of phenazepam in impaired driving. *Journal of Analytical Toxicology*. 2013;37(8):605–610. DOI:10.1093/jat/bkt075.
8. Stephenson J. B., Golz D. E., Brasher M. J. Phenazepam and its Effects on Driving. *Journal of Analytical Toxicology*. 2013;37(1):25–29. DOI: 10.1093/jat/bks080.
9. Voronina T. A., Larionov V. B., Golovenko N. Y., Nerobkova L. N., Gaidukov I. O. Role of 3-oximetabolite phenazepam and levan in realize their neurotropic efficacy. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2014;1:44–49 (In Russ.)
10. Zastrozhin M. S., Skryabin V. Yu., Sorokin A. S., Petukhov A. E., Smirnov V. V., Pankratenko E. P., Grishina E. A., Ryzhikova K. A., Panov A. S., Savchenko L. M., Bryun E. A., Sychev D. A. CYP3A subfamily activity affects the equilibrium concentration of Phenazepam® in patients with anxiety disorders and comorbid alcohol use disorder. *Pharmacogenomics*. 2020;21(7):449–457. DOI: 10.2217/pgs-2019-0071.
11. Pennings E., van Amsterdam J. G. C., Schoones J. W., Kershaw S. Phenazepam Pre-Review Report Agenda item 5.8 Expert Committee on Drug Dependence Thirty-seventh Meeting. *World Health Organization*. 2015.
12. Zherdev V. P., Voronina T. A., Garibova T. L., Kolyvanov G. B., Litvin A. A., Sariev A. K., Tohmahchi V. N., Vasil'ev A. E. A comparative study of the pharmacokinetics and efficacy of fenazepam upon transdermal and enteral administration. *Экспериментальная и Клиническая Фармакология*. 2003;66(1):50–53 (In Russ.)
13. Ékonomov A. L., Zherdev V. P. Method of quantitative gas-chromatographic determination of phenazepam and its metabolite 3-hydroxyphenazepam in plasma. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 1980;14(8):579–582.
14. O'Connor L. C., Torrance H. J., McKeown D. A. ELISA detection of phenazepam, etizolam, pyrazolam, flubromazepam, diclazepam and delorazepam in blood using Immunoanalysis® benzodiazepine kit. *Journal of Analytical Toxicology*. 2016;40(2):159–161. DOI: 10.1093/jat/bkv122.
15. Mastrovito R. A., Papsun D. M., Logan B. K. The Development and Validation of a Novel Designer Benzodiazepines Panel by LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*. 2021;45(5):423–428. DOI: 10.1093/jat/bkab013.
16. Yang C.-A., Tsai C.-Y., H.-C. Liu, Liu R. H., Lin D.-L. Designer benzodiazepines and their metabolites in post- and antemortem specimens: Quantitation by UHPLC-MS/MS and findings in Taiwan. *Toxicologie Analytique et Clinique*. 2022;34(3):S180. DOI: 10.1016/j.toxac.2022.06.312.
17. Mei V., Concheiro M., Pardi J., Cooper G. Validation of an LC-MS/MS Method for the Quantification of 13 Designer Benzodiazepines in Blood. *Journal of Analytical Toxicology*. 2019;43(9):688–695. DOI: 10.1093/jat/bkz063.
18. Pettersson Bergstrand M., Beck O., Helander A. Urine analysis of 28 designer benzodiazepines by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Clinical Mass Spectrometry*. 2018;10:25–32. DOI: 10.1016/j.clinms.2018.08.004.
19. Crichton M. L., Shenton C. F., Drummond G., Beer L. J., Seetohul L. N., Maskell P. D. Analysis of phenazepam and 3-hydroxyphenazepam in post-mortem fluids and tissues. *Drug Testing and Analysis*. 2015;7(10):926–936. DOI: 10.1002/dta.1790.
20. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. New Hampshire: Biopharmaceutics; 2018. 44 p.