

# ОДНОВРЕМЕННОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ КЛОЗАПИНА, НОРКЛОЗАПИНА, КЛОЗАПИН-N-ОКСИДА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И ОРГАНАХ

О.Л. Романова\*, Е.С. Степанова, С.С. Барсегян, кандидат фармацевтических наук,  
Д.В. Сундуков, доктор медицинских наук, В.В. Чистяков, доктор фармацевтических наук

Российский университет дружбы народов;

Российская Федерация, 117198, Москва, ул.Миклухо-Маклая, д. 6

**Введение.** В последнее время случаи применения клозапина в криминальных действиях отмечаются значительно чаще. Методики, позволяющей одновременно измерять содержание клозапина и его метаболитов в плазме крови и гомогенатах печени, почек, сердца, легких крыс, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) ранее не было разработано.

**Цель исследования** – разработка и валидация методики одновременного определения клозапина и его метаболитов в сыворотке крови и гомогенатах внутренних органов для применения в токсикокинетических исследованиях.

**Материал и методы.** Использовали субстанции клозапина, норклозапина, клозапин-N-оксида и amitriptilina (Sigma Aldrich). Клозапин и его метаболиты экстрагировали из плазмы крыс путем осаждения метиловым спиртом (сыворотка крови) и ацетонитрилом (гомогенаты органов). Анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе с масс-детектором Alligent Technologies 6430 Triple Quad LC/MS.

**Результаты.** Подобраны условия масс-спектрометрического детектирования объектов исследования. Для количественного анализа была проведена оптимизация режима МС/МС-детектирования для достижения максимальной чувствительности. При валидации разработанной методики оценивали селективность, воспроизводимость и точность, предел обнаружения и извлечение.

**Заключение.** Разработана и валидирована простая, быстрая и чувствительная методика одновременного определения клозапина и его метаболитов в биообъектах с использованием жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией. Методика может быть применена в изучении токсикокинетики клозапина.

**Ключевые слова:** клозапин, норклозапин, клозапин-N-оксид, определение, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия.

\*E-mail: olgpharm@yandex.ru

## ВВЕДЕНИЕ

В последнее время наблюдается резкое увеличение числа случаев использования клозапина с целью преднамеренного опьянения граждан для осуществления криминальных действий по отношению к ним. Летальность при отравлении клозапином высока и составляет 10–18% [1, 2]. Судебно-химическое исследование клозапина представляет собой непростую аналитическую задачу в связи с необходимостью изолирования небольшого количества вещества, введенного в организм, из достаточно большого объема биоматериала.

Основными метаболитами клозапина (Кл) являются норклозапин (НКл) и клозапин-N-оксид (Кл-НО), обладающие самостоятельными токсическими свойствами [3, 4]. В ранее опубликованных работах были описаны методики измерения концентрации Кл, НКл и Кл-НО в плазме крови и мозге крыс после однократного введения Кл методом ВЭЖХ-МС [5], изучали на крысах фармакокинетические и фармакодинамические особенности Кл (объект исследования – плазма

при внутривенном и пероральном введении [6], распределение Кл и НКл между плазмой и мозгом крыс с применением ВЭЖХ-МС с УФ-детектированием [7]. В то же время ранее не было методики, позволяющей одновременно измерять содержание Кл и его метаболитов в плазме крови и гомогенатах печени, почек, сердца, легких крыс методом ВЭЖХ-МС/МС.

Цель работы – разработка и валидация методики одновременного определения Кл и его метаболитов (НКл и Кл-НО) в сыворотке крови и гомогенатах органов (печень, почки, легкие, сердце) для применения в токсикокинетических исследованиях.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для проведения исследования использовали субстанции Кл, НКл, Кл-НО и amitriptilina (внутренний стандарт, ВС), заказанные в Sigma Aldrich. Сыворотку крови после декапитации интактных беспородных крыс-самцов получали центрифугированием цельной крови на «Sigma 2-16P» при скорости 3000 об/мин. Для получения гомогенатов к образцам взвешенных органов (около 2 г) прибавляли по 5 мл 0,9% водного раствора хлорида натрия и гомогенизи-

**РЕЗУЛЬТАТЫ СТАТИСТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ГРАФИКА ЛИНЕЙНОЙ ЗАВИСИМОСТИ КЛОЗАПИНА, НОРКЛОЗАПИНА, КЛОЗАПИН-N-ОКСИДА В БИООБЪЕКТАХ**

Показатель	Вещество					
	сыворотка крови			гомогенаты органов		
	Кл	НКл	Кл-NO	Кл	НКл	Кл-NO
Коэффициент корреляции ( $r^2$ )	0,995	0,999	0,998	0,989	0,998	0,997
Угловой коэффициент (b)	0,348	0,155	0,091	0,011	0,011	0,003
Свободный член (a)	-0,0005	- 0,000009	0,0002	0,093	0,0015	0,00028

ровали на Ultra Turrax Tube Drive control, «IKA» 2 мин при скорости 4000 об/мин.

В работе использовали высокоэффективный жидкостный хроматограф с масс-детектором Alligent Technologies 6430 Triple Quad LC/MS. Для получения и обработки хроматограмм применяли программу Aligent Mass Hunter Workstation for series tripple Quadrupole vers. B 06.00 build 6.0.6.25.4sp4 и Aligent

Mass Hunter Quantitive Analys vers. B 07.00 build 7.0.457.0.

Для валидации методики количественного определения Кл, НКл и Кл-NO в сыворотке крови крыс и гомогенатах органов были приготовлены отдельно калибровочные растворы и растворы контроля качества (QC). Все растворы хранили при температуре 3,8°C в течение 3 мес.

Таблица 2

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОЧНОСТИ И ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ КЛОЗАПИНА, НОРКЛОЗАПИНА, КЛОЗАПИН-N-ОКСИДА В БИООБЪЕКТАХ**

Образцы контроля качества QC, мкг/мл	Точность (средняя), %	Воспроизводимость (средняя), %
<i>Клозапин в сыворотке крови</i>		
QC-1-0,125	QC-1-98,48	QC-1-15,42
QC-2-0,5	QC-2-103,28	QC-2-2,91
QC-3-2,5	QC-3-106,76	QC-3-4,92
QC-4-5,0	QC-4-106,76	QC-4-4,96
<i>Норклозапин в сыворотке крови</i>		
QC-1-0,025	QC-1-99,61	QC-1-3,58
QC-2-0,075	QC-2-109,64	QC-2-13,24
QC-3-3,75	QC-3-110,84	QC-3-3,86
QC-4-7,50	QC-4-99,92	QC-4-2,16
<i>Клозапин-N-оксид в сыворотке крови</i>		
QC-1-0,03	QC-1-95,67	QC-1-19,19
QC-2-0,10	QC-2-104,92	QC-2-8,95
QC-3-0,30	QC-3-104,92	QC-3-3,54
QC-4-3,00	QC-4-100,65	QC-4-5,73
<i>Клозапин в органах</i>		
QC-1-17,15	QC-1-102,20	QC-1-14,61
QC-2-42,82	QC-2-91,38	QC-2-4,21
QC-3-85,75	QC-3-93,33	QC-3-3,59
QC-4-128,63	QC-4-106,88	QC-4-1,28
<i>Норклозапин в органах</i>		
QC-1- 0,86	QC-1-88,59	QC-1-2,43
QC-2- 2,57	QC-2-105,23	QC-2-2,68
QC-3- 8,58	QC-3-100,83	QC-3-9,26
QC-4- 25,61	QC-4-99,51	QC-4-0,64
<i>Клозапин-N-оксид в органах</i>		
QC-1-1,03	QC-1-105,11	QC-1-9,94
QC-2-3,43	QC-2-99,72	QC-2-4,91
QC-3-10,29	QC-3-101,60	QC-3-1,53
QC-4-102,90	QC-4-97,65	QC-4-7,23

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Перед проведением анализа осуществляли пробоподготовку: к 100 мкл сыворотки (гомогената органов) добавляли по 10 мкл соответствующих стандартных растворов Кл, НКл, Кл-NO, ВС и добавляли метиловый спирт до объема 500 мкл, перемешивали на «Vortex» 5 с, центрифугировали на Centrifuge 5425 «Eppendorf» в течение 10 мин и 3 мкл раствора инжесктировали в хроматографическую колонку.

Для подбора условий масс-спектрометрического детектирования растворы Кл, НКл, Кл-NO и ВС анализировали путем прямого ввода в масс-спектрометр. При сканировании в режиме МС/МС (MRM) определяли ионы-фрагменты ВС и аналитов. Для количественного анализа была проведена оптимизация режима МС/МС-детектирования для достижения максимальной чувствительности.

В результате были установлены параметры определения. Хроматографические параметры: колонка Thermo part C18, 3 μM, 2,1×150 мм. Соотношение элюента А (0,1% водный раствор муравьиной кислоты) и элюента В

(0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле) 80:20. Температура колонки 35°C, объем инъекции 3 мкл, скорость потока 0,4 мл/мин. Время удерживания в этих условиях: Кл – 3,4 мин, НКл – 3,1 мин, Кл-НО – 3,6 мин, ВС – 4,1 мин. Общее время анализа – 6 мин. МС/МС-параметры определения: ионизация в электроспрее с регистрацией положительных наиболее интенсивных переходов  $m/z$  327,14→270,1 (Кл),  $m/z$  343,1→256,1 (Кл-НО),  $m/z$  313,1→270,1 (НКл) и  $m/z$  278,2→105,1 (ВС). Температура источника 300°C, напряжение на капилляре – 5 кВ, газ-небулайзер и газ фрагментации – азот. Общее время анализа для каждой хроматограммы составляло 6,0 мин.

При валидации разработанной методики оценивали селективность, воспроизводимость и точность, предел обнаружения и извлечение. Для проведения валидации готовили калибровочные растворы. Полученные данные для калибровочных уравнений представлены в табл.1. Графики калибровки имели вид  $Y = bX + a$ , где  $X$  – концентрации, мкг/мл;  $Y$  – отношение сигналов аналит/ВС.

Определение точности и воспроизводимости методики для всех объектов выполняли при 3-кратном анализе 4 образцов QC: QC-1, QC-2, QC-3, QC-4 в области ожидаемого концентрационного диапазона (табл. 2).

Критерии приемлемости: для концентрации на уровне нижнего предела количественного определения – воспроизводимость и точность < 20%, для остальных концентраций воспроизводимость и точность < 15%. Как видно, при указанных концентрациях методика удовлетворяет критериям линейности ( $r^2=0,99$ ), точности и воспроизводимости. Пределы количественного определения в сыворотке крови и органах составили: Кл – 0,05 мкг/мл, НКл – 0,0025 мкг/мл, Кл-НО – 0,001 мкг/мл при отношении сигнал/шум 0,1 – 0,22.

Степени извлечения аналитов и ВС определяли для 2 концентраций. В качестве референтных образ-

цов использовали 3 репликата интактного гомогената, где добавление аналитов и ВС осуществляли после пробоподготовки на этапе отбора супернатанта после центрифугирования. Степень извлечения оценивали отдельно для аналитов и ВС по отношению средних значений площадей хроматографических пиков в гомогенатах к аналогичным значениям площадей референтных образцов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно результатам исследования, данная методика отвечает требованиям, предъявляемым к использованию аналитических методик в части селективности, линейности, точности и воспроизводимости и может быть применена в изучении токсикокинетики клозапина и его метаболитов в биообъектах (сыворотке крови, гомогенатах печени, почек, сердца, легких).

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Слюндин Д.Г., Ливанов А.С., Анучин В.В. и др. Криминальные отравления клозапином. Анестезиология и реаниматология. 2007; 4: 61–4 (Slyundin D.G., Livanov A.S., Anuchin V.V. et al. Criminal clozapine poisonings Anaesthesiology and reanimatology, 2007; 4: 61–4) (in Russian).
2. Worm K., Kringsholm B., Steentoft A. Clozapine cases with fatal, toxic or therapeutic concentrations. Int. J. Legal Med., 1993; 106: 115–8.
3. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России. Издание 21. М.: 2014; 8. (Vidal. Reference book. Medications in Russia. 21ed. Moscow: AstraPharmServis., 2014; 569) (in Russian).
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства. 16-е изд., часть 1. М.: Новая волна. 2014; 73–4 (Mashkovskiy M.D. Medications. 16 ed., part.1. Moscow: «New Wave», 2014; 73–4) (in Russian).
5. Ross J., Centorrino F., Flood J.G., Volpicelli S., Lyons D., Cohen B. Tissue concentration of Clozapine and its Metabolites in the Rat. Neuropsychopharmacology, 1993; 2 (9): 117–24.
6. Lei Sun, Chyan E. Lau Intravenous and oral clozapine pharmacokinetics, pharmacodynamics, and concentration–effect relations: acute tolerance European Journal of Pharmacology, 2000; 398 (2): 225–38.
7. Weigmann H., Härtter S., Fischer V., Dahmen N., Hiemke C. Distribution of clozapine and desmethylclozapine between blood and brain in rats. European Neuropsychopharmacology, 1999; 9 (3): 253–6.

Поступила 5 февраля 2016 г.

## SIMULTANEOUS DETERMINATION OF CLOZAPINE, NORCLOZAPINE, CLOZAPINE-N-OXIDE IN SERUM AND ORGANS

O.L. Romanova, E.S. Stepanova, S.S. Barsegyan, PhD; D.V. Sundukov, MD; V.V. Chistyakov, PhD  
Peoples' Friendship University of Russia; 6, Miklukho-Maklay St., Moscow 117198, Russian Federation

### SUMMARY

**Introduction.** Clozapine has been reported to be much more commonly used in criminal activity in recent years. Procedures that can simultaneously measure the levels of clozapine and its metabolites in rat plasma and liver, kidney, heart, and lung homogenates by high performance liquid chromatography in combination with mass spectrometry (HPLC-MS/MS) have not been devised.

**Objective.** To devise and validate a procedure for the simultaneous determination of clozapine and its metabolites in the serum and visceral organ homogenates to be used in toxicokinetic examinations.

**Material and methods.** Clozapine, norclozapine, clozapine-N-oxide, and amitriptyline (Sigma Aldrich) were used. Clozapine and its metabolites were extracted from rat plasma via precipitation with methanol (serum) and acetonitrile (organ homogenates). Their analysis was carried out using the Agilent Technologies 6430 Triple Quad HPLC/MS system.

**Results.** Conditions were selected for the mass-spectrometric detection of the study objects. MS/MS detection to achieve maximum sensitivity was optimized for quantitative analysis. Selectivity, reproducibility, and accuracy, detection limit, and extraction were assessed when validating the procedure devised.

**Conclusion.** The developed and validated procedure was simple, rapid, and sensitive in simultaneously determining clozapine and its metabolites in bioobjects by liquid chromatography in combination with tandem mass spectrometry. It may be used to study the toxicokinetics of clozapine.

**Key words:** clozapine, norclozapine, clozapine-N-oxide, determination, high performance liquid chromatography, mass spectrometry.