

# Исследование фармакокинетики мебеверина в форме капсул с пролонгированным высвобождением

Хохлов А.Л.<sup>1,2</sup>, Джурко Ю.А.<sup>2</sup>, Шитов Л.Н.<sup>1,2</sup>, Яичков И.И.<sup>1,2</sup>, Шитова А.М.<sup>2</sup>, Хозова Л.А.<sup>2</sup>, Мирошников А.Е.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» МЗ РФ, г. Ярославль

<sup>2</sup> – ООО «Квинта-Аналитика Ярославль», г. Ярославль

**Резюме.** Было проведено исследование фармакокинетики мебеверина в форме капсул с пролонгированным высвобождением на 24 здоровых добровольцах. Известно, что данное лекарственное вещество полностью метаболизируется на пресистемном этапе. Поэтому измерялись фармакокинетические параметры только его основных метаболитов – мебевериновой кислоты и деметилированной мебевериновой кислоты. Для определения концентрации данных метаболитов в плазме крови разработана биоаналитическая методика с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

**Ключевые слова:** мебеверин, мебевериновая кислота, деметилированная мебевериновая кислота, фармакокинетика, ВЭЖХ-МС/МС

## Pharmacokinetic study of prolonged release capsules of mebeverine

Khokhlov A.L.<sup>1,2</sup>, Dzhurko Yu.A.<sup>2</sup>, Shitov L.N.<sup>1,2</sup>, Yaichkov I.I.<sup>1,2</sup>, Shitova A.M.<sup>2</sup>, Khozova L.A.<sup>2</sup>, Miroshnikov A.E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – The Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl

<sup>2</sup> – Quinta-Analytica Yaroslavl LLC, Yaroslavl

**Resume.** Pharmacokinetic study of prolonged release capsules of mebeverine was carried out on 24 volunteers. It is known that the drug substance is completely metabolized due to first-pass effect. Therefore, pharmacokinetic parameters of the main metabolites – mebeverine acid and desmethyl mebeverine acid were measured. Bioanalytical method was developed to measurement of concentrations of these metabolites in blood plasma by using HPLC-MS/MS.

**Keywords:** mebeverine, mebeverine acid, desmethyl mebeverine acid, pharmacokinetic, HPLC-MS/MS

Автор, ответственный за переписку:

Яичков Илья Игоревич – аспирант кафедры клинической фармакологии с курсом ИПДО ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» МЗ РФ; 150043, г. Ярославль, ул. Автозаводская, д. 29, кв. 97; +7 (910) 977-74-98; e-mail: [ilya\\_1993\\_08@mail.ru](mailto:ilya_1993_08@mail.ru)

## Введение

Мебеверин является миотропным спазмолитиком, механизм действия которого основан на блокаде быстрых натриевых и медленных кальциевых каналов на мембране миоцита, что замедляет её деполяризацию и препятствует сокращению мышечных волокон. Он обладает высокой селективностью в отношении гладкомышечных клеток желудочно-кишечного тракта, поэтому его используют, в основном, при спазмах различных отделов пищеварительной системы. Данный препарат обеспечивает как надёжный антиспастический эффект, так и препятствует развитию атонии (прокинетическое действие) [1].

Мебеверин, являющийся сложным эфиром, быстро гидролизует на этапе пресистемной элиминации ферментами-эстеразами до 3,4-диметоксибензойной (вератровой) кислоты и мебеверинового спирта. Основными метаболитами данного препарата являются мебевериновая кислота (МК) и деметилмебевериновая кислота (ДММК) (рис. 1) [2].

Период полувыведения ДММК при приёме капсул с пролонгированным высвобождением, по данным

[1, 3], составляет 5–6 ч, максимальная концентрация в крови ( $C_{max}$ ) после однократного приёма составляет – 679 нг/мл, после двукратного приёма – 804 нг/мл, время достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ ) около 2,92 ч. Площадь под фармакокинетической кривой «концентрация–время» от нуля до последнего отбора крови ( $AUC_{0-t}$ ) для ДММК, согласно [3], равна 4 552 нг × ч/мл, константа элиминации равна 0,147 ч<sup>-1</sup>. Значения фармакокинетических параметров для МК не опубликованы. Поэтому получение новых данных о фармакокинетике мебеверина в форме капсул с модифицированным высвобождением является актуальным.

Известны методики количественного определения метаболитов мебеверина в плазме крови методами ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС/МС [2–6]. Недостатками данных методик является длительная пробоподготовка с использованием твёрдофазной и жидкостно-жидкостной экстракции и низкая чувствительность.

В связи с этим целью данной работы является изучение фармакокинетики лекарственного препарата мебеверина в форме капсул (Дюспаталин) и разработка новой чувствительной и экспрессной биоаналитиче-

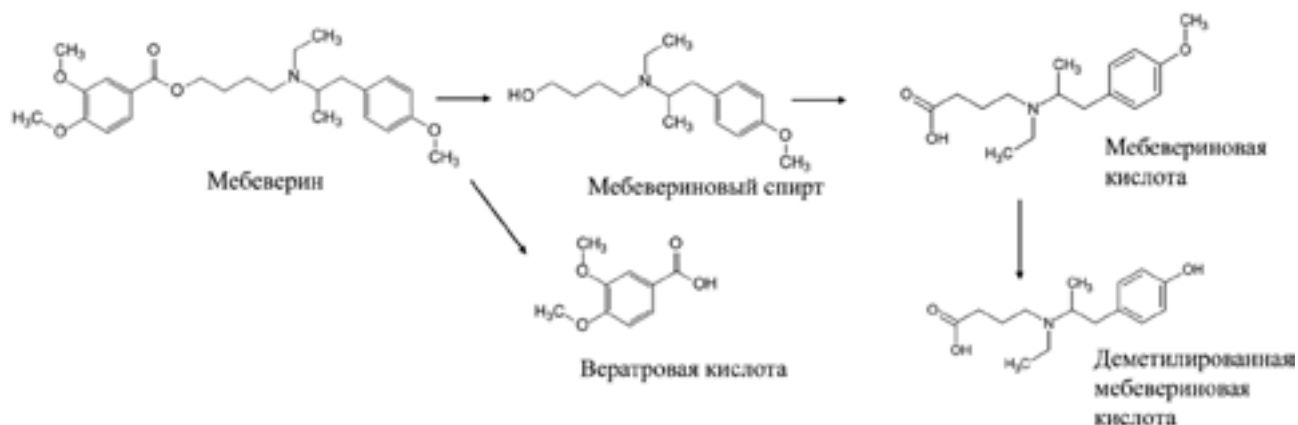


Рис. 1. Схема метаболизма мебеверина

ской методики для определения концентрации его метаболитов в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС.

### Материалы и методы

Для измерения концентраций метаболитов мебеверина в плазме крови использовалась ВЭЖХ-МС/МС-система, оснащённая трёхквadrупольным масс-спектрометрическим детектором Thermo Scientific TSQ Quantum Ultra. Подготовка проб осуществлялась методом осаждения белков; процедуры пробоподготовки включали внесение в образцы внутренних стандартов – мебевериновою кислоты-D5 (МК-D-5) и деметилированной мебевериновою кислоты-D5 (ДММК-D5) (рис. 2). Разделение

компонентов биологической матрицы проводили на двух хроматографических колонках Phenomenex Luna 5uC8, (150 × 4,6 мм, 5 мкм) и Phenomenex Luna 5uC8, (150 × 4,6 мм, 5 мкм) с использованием подвижной фазы на основе ацетонитрила и формиатного буферного раствора при градиентном режиме элюирования. Масс-спектрометрический детектор работал в режиме регистрации положительных ионов последующим MRM-переходам: для МК  $m/z$  – 280 → 121, для ДММК  $m/z$  – 266,2 → 107, для МК-D5  $m/z$  – 285 → 121, для ДММК-D5  $m/z$  – 271 → 107. Время анализа составило 6 мин.

Валидация аналитической методики выполнялась в соответствии с требованиями руководств ЕМЕА [7], FDA [8] и Руководства по экспертизе лекарственных средств НЦЭСМП (Т.1) [9]. Полученные результаты валидационных тестов представлены в табл. 1, они отвечают всем установленным критериям приемлемости. Определение концентраций обоих аналитов проводилось в диапазоне от 10 до 2 000 нг/мл. Были использованы следующие калибровочные точки: 10, 50, 200, 500, 750, 1 000, 1 500, 2 000 нг/мл. Содержание определяемых веществ в образцах контроля качества составило 10, 30, 400, 800, 1 600, 2 000 нг/мл.

### Исследование фармакокинетики

Исследование фармакокинетики препарата Дюспаталин проводилось в соответствии с требованиями ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика», нормативных документов FDA [10] и ЕМЕА [11], а также в соответствии с этическими принципами, изложенными в Хельсинкской Декларации [12].

В популяцию для оценки фармакокинетических параметров было включено 24 испытуемых в возрасте от 18 до 45 лет, в том числе 13 женщин и 11 мужчин европейской расы, отобранных согласно критериям включения и не включения. В скрининге приняло участие 37 кандидатов. Средний возраст добровольцев составил  $25,8 \pm 7,1$  лет, рост –  $171,5 \pm 9,4$  см, масса –  $68,1 \pm 10,5$  кг, ИМТ –  $23,3 \pm 2,8$  кг/м<sup>2</sup>.

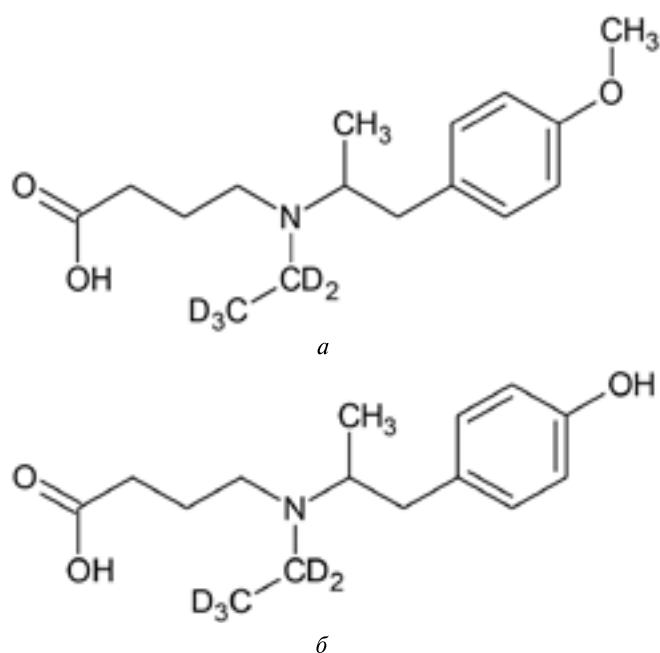


Рис. 2. Структурные формулы изотопно-меченных внутренних стандартов для определения мебевериновою кислоты (а) и деметилированной мебевериновою кислоты (б)

Валидационные характеристики разработанной методики

№ п/п	Валидационный параметр	Результаты		
1	Селективность	Анализ 6 образцов бланковой плазмы крови (полученной из разных источников) и плазмы, содержащей определяемые вещества показал, что интерференция в области времени удерживания аналитов не превышала 20% от уровня LLOQ, а в области времени удерживания внутренних стандартов – не превышала 5% от их концентрации (рис. 3)		
2	Нижний предел количественного определения (LLOQ)	МК	10 нг/мл (точность 101,39% от теоретической, прецизионность (CV*) – 15,75%)	
		ДММК	10 нг/мл (точность 108,22% от теоретической, прецизионность (CV) – 9,34%)	
3	Линейность	МК	Диапазон концентраций: 10–2 000 нг/мл. Коэффициент корреляции калибровочной кривой ( $r^2$ ): 0,9987–0,9999	
		ДММК	Диапазон концентраций: 10–2 000 нг/мл. Коэффициент корреляции калибровочной кривой ( $r^2$ ): 0,9965–0,9999	
4	Прецизионность и точность	МК	Точность от 101,39% до 107,42%; CV от 6,31% до 15,75%	
		ДММК	Точность от 108,09 до 110,48%; CV от 4,01% до 9,34%	
5	Степень извлечения	МК	91,48 %	
		ДММК	91,98%	
6	Отсутствие влияния разведения (двукратное разведение образцов с концентрацией аналитов 3 200 нг/мл)	МК	Точность – 112,23%	
		ДММК	Точность – 110,58%.	
7	Эффект влияния матрицы	МК	NMF** находился в диапазоне от 1,053 до 1,063; CV от 2,24 до 3,23%	
		ДММК	NMF** находился в диапазоне от 1,060 до 1,127; CV от 2,89 до 2,95%	
8	Стабильность	Краткосрочная (24 ч)	МК	97,81% от номинальной концентрации
			ДММК	98,46% от номинальной концентрации
		Долгосрочная (28 дней)	МК	105,45% от номинальной концентрации
			ДММК	110,33% от номинальной концентрации
		При замораживании/размораживании	МК	110,79% от номинальной концентрации
			ДММК	110,98% от номинальной концентрации

Примечание: \* – Коэффициент вариации; NMF\*\* – нормализованный фактор матрицы.

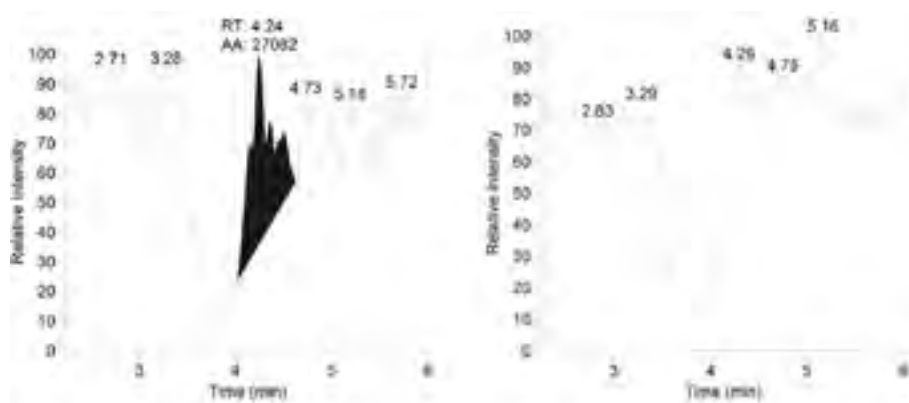
Отбор образцов крови осуществлялся до приёма препарата и через 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 6; 8; 10; 12 и 24 ч после приёма препарата через локтевые катетеры [3, 13]. Плазму немедленно отделяли центрифугированием и замораживают при температуре не выше – 20 °С. В связи с быстрым пресистемным метаболизмом лекарственного вещества определялись концентрации двух основных метаболитов — мебевериновой кислоты и деметилмебевериновой кислоты [1–6].

Для исследования использовался препарат Дюспаталин в форме капсул пролонгированного действия в дозировке 200 мг производства «Эбботт Хелскеа САС» (Франция) (серия 10215, годен до 04.2017).

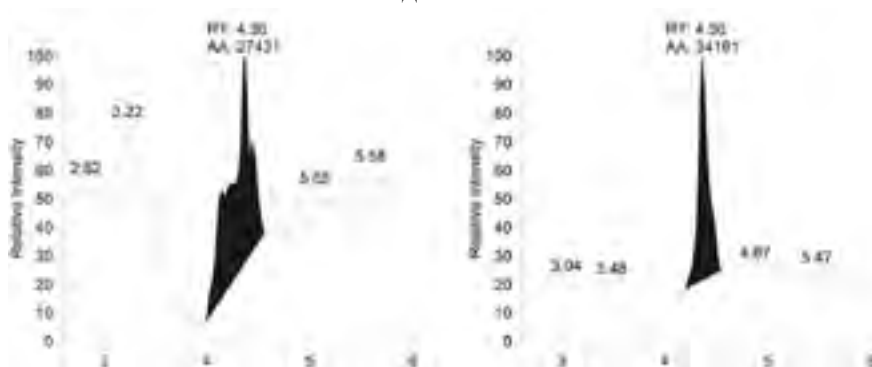
Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью пакетов программного обеспечения Rv. 3.2.1, модуль Bear (Lee, Hsin-yaandLee, Yungjin (2014). bear: Data Analysis Tool for Average Bioequivalence and Bioavailability.Rpackage

version 2.6.4) и StatSoft STATISTICA v.12. Рассчитывались следующие фармакокинетические параметры:

- максимальное измеренное значение концентрации метаболитов в плазме крови ( $C_{max}$ );
- время достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ );
- площадь под фармакокинетической кривой «концентрация–время» от нуля до последнего отбора крови ( $AUC_{0-t}$ ), при котором концентрация метаболитов равна или выше нижнего LLOQ методики;
- площадь под фармакокинетической кривой, начиная с нулевого значения времени до бесконечности ( $AUC_{0-\infty}$ );
- отношение значений  $AUC_{0-t}$  к  $AUC_{0-\infty}$  – относительная скорость всасывания ( $C_{max}/AUC$ );
- константа скорости терминальной элиминации ( $K_{el}$ );

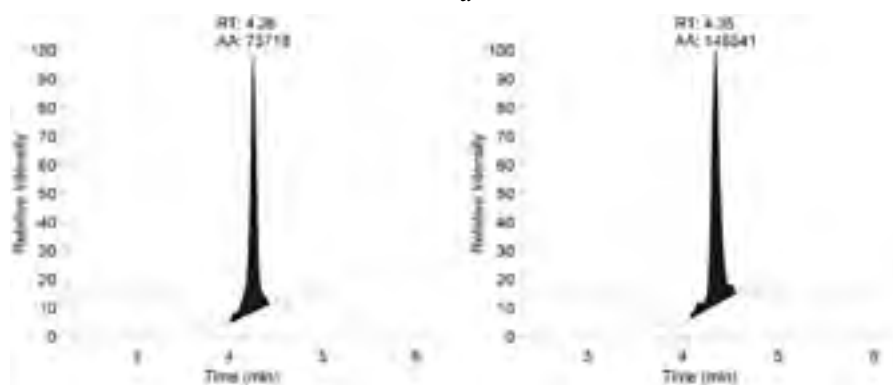


ДМКК МК

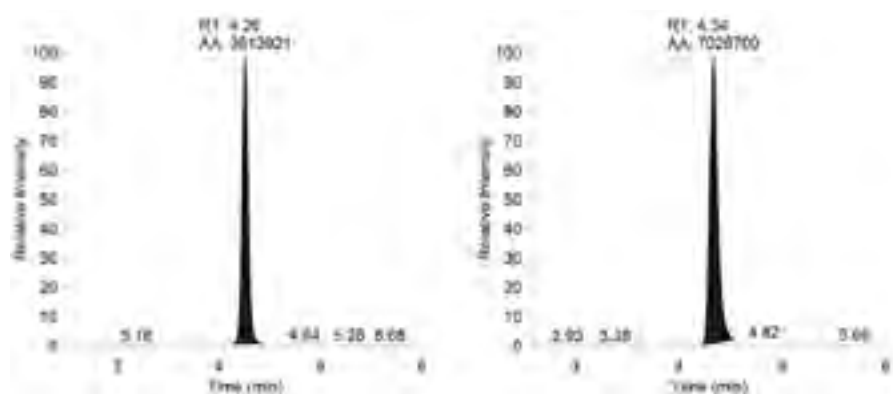


ДМКК-D5 МК-D5

*a*



ДМКК МК



ДМКК-D<sub>5</sub> МК-D<sub>5</sub>

*б*

Рис. 3. Примеры хроматограмм: бланковой плазмы и плазмы с добавлением аналитов (*a*) на уровне LLOQ и внутренних стандартов (*б*)

- период полувыведения метаболитов ( $T_{1/2}$ );
- среднее время удержания метаболитов в крови (MRT).

Полученные результаты представлены в табл. 2 и проиллюстрированы на рис. 4. Среднее значение соотношения  $AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$  для мебевериновой кислоты равнялись 88,51%, для деметилированной мебеверино-

вой кислоты – 86,26%, что указывает на достаточную длительность наблюдения. Средние значения максимальных концентраций МК и ДММК, определяемых в плазме крови добровольцев, составили  $62,52 \pm 35,01$  и  $291,81 \pm 125,92$  нг/мл, соответственно, средние значения  $AUC_{0-t}$  –  $293,94 \pm 151,78$  и  $2191,85 \pm 542,94$  нг × ч/мл, соответственно, средние значения  $T_{max}$  –  $3,27 \pm 1,03$  и

Таблица 2

Фармакокинетические параметры метаболитов мебеверина

Мебевериновая кислота									
	$C_{max}$ , нг/мл	$T_{max}$ , ч	$AUC_{0-t}$ , нг×ч/мл	$AUC_{0-\infty}$ , нг×ч/мл	$AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$ , %	$C_{max}/AUC_{0-t}$ , ч <sup>-1</sup>	$K_{el}$ , ч <sup>-1</sup>	$T_{1/2}$ , ч	MRT, ч
Mean±SD*	$62,52 \pm 35,01$	$3,27 \pm 1,03$	$293,94 \pm 151,78$	$365,85 \pm 140,49$	$82,34 \pm 11,61$	$0,2238 \pm 0,0598$	$0,27584 \pm 0,08426$	$2,87 \pm 1,39$	$5,82 \pm 1,57$
Min	22,3	1,5	54,03	110,01	47,43	0,1649	0,08683	1,61	4,27
Max	173,5	5	601,03	649,49	96,04	0,4128	0,43138	7,98	11,45
CV, %	56,00	31,55	51,64	38,40	14,10	26,72	30,55	48,38	26,91
Деметилированная мебевериновая кислота									
	$C_{max}$ , нг/мл	$T_{max}$ , ч	$AUC_{0-t}$ , нг×ч/мл	$AUC_{0-\infty}$ , нг×ч/мл	$AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$ , %	$C_{max}/AUC_{0-t}$ , ч <sup>-1</sup>	$K_{el}$ , ч <sup>-1</sup>	$T_{1/2}$ , ч	MRT, ч
Mean±SD	$291,81 \pm 125,92$	$3,19 \pm 1,48$	$2191,85 \pm 542,94$	$2551,74 \pm 546,96$	$86,26 \pm 11,62$	$0,1339 \pm 0,0497$	$0,11605 \pm 0,06657$	$7,52 \pm 3,31$	$11,2 \pm 4,25$
Min	114,6	1,5	1081,45	1388,65	40,34	0,0838	0,04631	2,33	5,34
Max	607,4	8	3262,43	3547,35	95,84	0,2969	0,29771	14,97	22,49
CV, %	43,15	46,44	24,77	21,43	13,47	37,15	57,36	44,04	37,97

Примечание: Mean±SD\* – среднее значение ± стандартное отклонение.

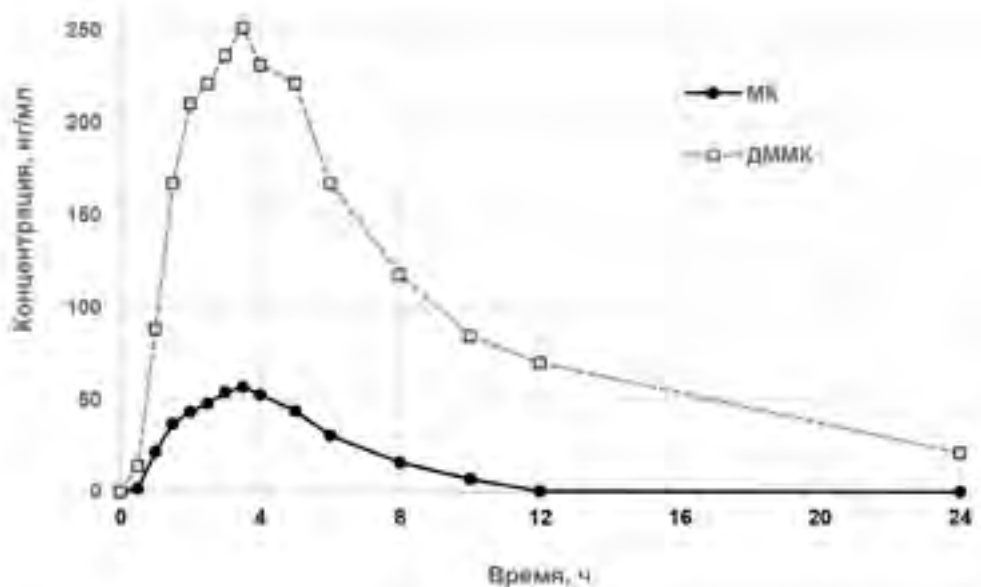


Рис. 4. Усреднённый фармакокинетические профили концентрации мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот в плазме крови добровольцев после однократного приёма капсул Дюспаталин в дозировке 200 мг

3,19±1,48 ч, соответственно. Таким образом, время наступления максимальной концентрации для обоих метаболитов было практически одинаковым, при этом максимальная концентрация в плазме,  $AUC_{0-t}$  у ДММК значительно выше, чем у МК. Это может свидетельствовать о том, что большая часть МК сразу после окисления мебеверинового спирта подвергается деметилированию.

Рассчитанные фармакокинетические параметры ДММК существенно отличаются от данных ранее опубликованных исследований (табл. 3) [1–3]. Так,

Таблица 3

Сравнение полученных значений фармакокинетических параметров ДММК с данными литературы [1, 3]

Параметр	Полученное значение	Опубликованное значение
$C_{max}$ , нг/мл	291,81±125,92	679
$T_{max}$ , ч	3,19±1,48	2,92
$AUC_{0-t}$ , нг×ч/мл	2191,85±542,94	4553
$AUC_{0-\infty}$ , нг×ч/мл	2551,74±546,96	4863
$K_{el}$	0,11605±0,06657	0,147
$T_{1/2}$ , ч	7,52±3,31	4,91

### Литература

1. *Brittain H.G.* Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients, Vol. 25. California: Academic press, 1998.
2. *Stockis A., Guelen P.J.M., de Vos D.* Identification of Mebeverine Acid as the Main Circulating Metabolite of Mebeverine in Man. *J Pharm Biomed Anal.* 2002; 29: 335–340.
3. *Winsemius A., Meuwisen I.M., Boon C., van der Laan A., Brekle A., de Vries M.* A pharmacokinetic comparison of the modified release capsule and a plain tablet formulation of mebeverine. *Int J Clin Pract.* 2002; 9 (56): 659–662.
4. *Elliott S., Burgess V.* Investigative implications of the Instability and Metabolism of Mebeverine. *J Anal Tox.* 2006; 30: 91–97.
5. *Bergeron M., Bergeron A., Amsterdam P., Furtado M., Garofolo F.* Use of polarity switching for the simultaneous bioanalysis of analytes with three orders of magnitude difference in concentration by HPLC-MS/MS. *Bioanal.* 2013; 5 (15): 1911–1918.
6. *Khatri C.A., Phanikummar Ch V., Jayaveera K., Reddy K.Y.* Development and Validation of Bioanalytical Method for Simultaneous Quantification of Veratric Acid, Mebeverine Acid and Desmethyl Mebeverine Acid in Human Edta Plasma by Using LC-MS/MS. *J Pharm Chem.* 2012; 4 (6): 11–18.

полученные средние значения  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  приблизительно в 2 раза ниже, а измеренный период полувыведения на 2 ч дольше, чем по данным литературы. Это может быть связано с высокой межсубъектной вариабельностью и влиянием ситуационных факторов на процесс гидролиза лекарственного вещества на пресистемном этапе.

### Выводы

Таким образом, разработана и валидирована новая экспрессная, точная и чувствительная ВЭЖХ-МС/МС-методика количественного определения основных метаболитов мебеверина в плазме крови человека, отвечающая всем необходимым требованиям, изложенным в руководствах ЕМЕА, FDA и НЦЭСМП. Предел количественного определения для МК и ДММК составил 10 нг/мл. В результате проведенного с использованием данной методики исследования фармакокинетики капсул в дозировке 200 мг были получены новые данные о фармакокинетических параметрах мебевериновой и деметилмебевериновой кислот, которые могут быть использованы для разработки дизайна исследований биоэквивалентности.

7. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft), European Medicines Agency, Committee for medicinal products for human use; 2010.

8. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), U. S. Government Printing Office, Washington, DC; 2013.

9. *Миронов А.Н., ред.* Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М.: Гриф и К; 2013.

10. Food and Drugs Administration Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on Biopharmaceutics Classification System Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research; 2015.

11. Guidance on the investigation of bioequivalence, European Medicines Agency, Committee for medicinal products for human use; 2010.

12. Declaration of Helsinki of the AMM-Ethical Principles for Medical Research in humans, World Medical Assembly, 64th General Assembly; 2013.

13. *Хохлов А.Л., Лилеева Е.Г., Сеницина О.А., Спешилова С.А., Демарица С.М., Шитов Л.Н.* Проблемы проведения биоаналитической части исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в России. *Фармакокинетика Фармакодинамика.* 2014; 1: 37–43.