

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ АНАЛИЗА НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО АДЕНИНА, ОБЛАДАЮЩЕГО ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Л. А. Смирнова, Е. А. Сучков, А. Ф. Рябуха, К. А. Кузнецов, А. А. Озеров

*Научно-исследовательский институт фармакологии,
Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра фармацевтической и токсикологической химии*

Разработаны оптимальные хроматографические условия метода высокоэффективной жидкостной хроматографии количественного определения производного аденина VMA-99-82. Метод высокочувствителен и селективен и может быть использован для определения в биологическом материале. Способ пробоподготовки подобран оптимально и практически не влияет на среднюю ошибку измерения хроматографического метода количественного определения.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, производные аденина, количественное определение.

CHROMATOGRAPHY OF A NEW ADENINE DERIVATIVE WITH ANTIVIRAL ACTIVITY

L. A. Smirnova, E. A. Suchkov, A. F. Riabuha, K. A. Kuznetsov, A. A. Ozerov

An optimal chromatographic condition of HPLC method of quantitative determination of the adenine derivative VMA-99-82 was developed. This is a highly sensitive and highly selective method and can be quite helpful in bioassays. The method of sample preparation has been adjusted optimally; it does not have any effect on the standard error of quantitative determination.

Key words: HPLC, adenine derivatives, quantitative determination.

Поиск и внедрение в практику новых биологических активных соединений является одной из актуальных проблем современной медицины. Для ее решения проводится как направленный синтез аналогов существующих биологически активных веществ, так и скрининговые исследования различных групп соединений. Для дальнейшего изучения веществ, продемонстрировавших лучшие показатели, необходима разработка адекватных аналитических методов количественного определения в различном биологическом материале. В настоящее время методом, наиболее полно соответствующим поставленным задачам, является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [4].

Соединение VMA-99-82 (адепрофен) является веществом лидером по противовирусной активности, отобранным в результате скрининговых исследований из целого ряда 9-производных аденина, синтезированных на кафедре фармацевтической и токсикологической химии ВолгГМУ. Данное соединение продемонстрировало высокую ингибиторную активность в отношении различных ДНК- и РНК-содержащих вирусов, в частности цитомегаловируса человека и ВИЧ-1 [2, 3, 6].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

На примере разработки метода ВЭЖХ количественного определения производного аденина соединения VMA-99-82 будут рассмотрены аналитические проблемы, наиболее характерные при разработке новых хроматографических методов анализа.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Количественное определение проводилось методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе (Shimadzu, Япония) с диодноматричным ультрафиолетовым детектором, длина волны 205 нм. Хроматографическое разделение осуществлялось на колонке SUPELCOSIL LC-18 (5 мкм; 150 мм x 4,6 мм). Мобильная фаза включала в себя ацетонитрил (УФ 210) (Россия) и буферную систему из 50 мМ р-ра однозамещенного калия фосфата (рН 5,65) в соотношении 40 % : 60 % v/v.

Зависимость площадей пиков от концентрации соединения VMA-99-82 анализировалась методом регрессионного анализа. Статистическая обработка результатов проводилась при помощи компьютерной программы Microsoft Excel [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что соединение VMA-99-82 практически не растворимо в большинстве применяемых в хроматографии растворителей, что поставило дополнительную аналитическую задачу подбора оптимального растворителя. Он должен быть подобран с учетом допустимости введения его в хроматографическую систему, а также обеспечивать степень растворимости, позволяющую использовать раствор соединения VMA-99-82 в качестве абсолютного стандарта.

В результате экспериментального подбора в качестве растворителя исследуемой субстанции была выбрана смесь 90%-го этанола и ацетонитрила в соот-

ношении 50 % : 50 % v/v. В качестве альтернативы, обеспечивающей аналогичную степень растворимости, рассматривался диметилсульфоксид. Итоговым выбором стала смесь этанола и ацетонитрила (50 % : 50 % v/v) из-за большей стойкости при хранении раствора изучаемого соединения и предпочтительности физико-химических свойств для введения в хроматографическую систему. Прочие растворители показывали более низкую степень растворимости соединения VMA-99-82 по сравнению с вышеуказанными сольвентами.

При разработке метода извлечения исследуемого соединения из биологического материала необходимо решить две основные задачи: добиться стабильно высокой степени экстракции и максимально очистить пробу. В ходе эксперимента был опробован ряд экстрагентов: 90%-й этанол, ацетонитрил, смесь 90%-го этанола и ацетонитрила, концентрированная соляная кислота, 10%-й раствор трихлоруксусной кислоты (рис. 1). Затем на основании полученных данных была выбрана смесь 90%-го этанола и ацетонитрила (50 % : 50 % v/v), которая обеспечивала высокую степень экстракции соединения VMA-99-82 из биологического материала, стабильность результатов, а также позволяла одновременно с экстракцией провести преципитацию белков плазмы.



Рис. 1. Степени экстракции соединения VMA-99-82 из биологического материала различными экстрагентами: А – 90%-й этанол, В – ацетонитрил, С – смесь 90%-го этанола и ацетонитрила, D – концентрированная соляная кислота, E – 10%-й раствор трихлоруксусной кислоты

При работе с экстракционной смесью 90%-й этанол : ацетонитрил было установлено, что изменение соотношения ее компонентов, начиная от 10 %, вызывает снижение степени экстракции и потерю воспроизводимости результатов. Четкой зависимости между изменением соотношения компонентов экстракционной смеси и колебанием степени экстракции выявить не удалось из-за значительного разброса результата параллельных измерений.

Еще одной трудностью при разработке метода пробоподготовки соединения VMA-99-82 явилось то, что

аналит оседал с форменными элементами крови при получении плазмы путем центрифугирования. Эту проблему удалось решить экстрагированием изучаемого соединения непосредственно из цельной крови двойным объемом экстрагента.

Итоговый метод извлечения соединения VMA-99-82 из биологического материала выглядит следующим образом. К цельной крови добавляли экстракционную смесь (90%-й этанол : ацетонитрил 50 % : 50 % v/v) в соотношении 1 : 2, затем встряхивали в ультразвуковой ванне (Сапфир, Россия) в течение 15 мин для преципитации белков и центрифугировали 15 мин при 3000 об./мин на центрифуге (Eppendorf, Германия). Полученную надосадочную жидкость вводили в хроматографическую систему. Степень экстракции соединения VMA-99-82 составила не менее 90 %.

Далее с использованием подобранных условий пробоподготовки был разработан селективный (рис. 2, 3) и чувствительный метод количественного определения.

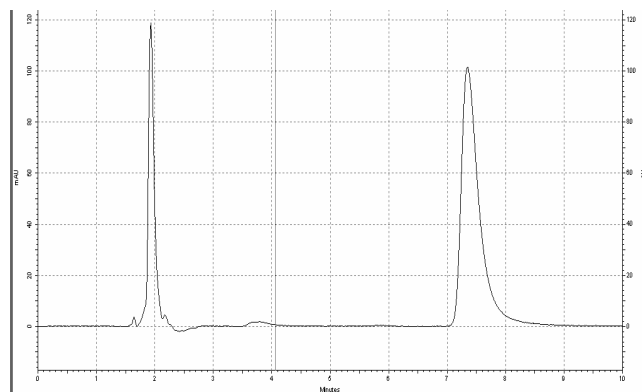


Рис. 2. Образец хроматограммы стандартного раствора (90%-й этанол : ацетонитрил 50 % : 50 % v/v) соединения VMA-99-82

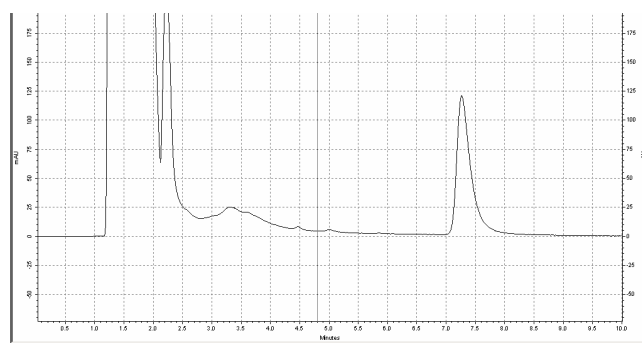


Рис. 3. Образец хроматограммы соединения VMA-99-82 в биологическом материале

Для количественного определения вещества использовали метод абсолютной калибровки. Зависимость площадей пиков от концентрации VMA-99-82 анализировалась методом регрессионного анализа в диапазоне концентраций от 0,5 до 50 мкг/мл. По каждому значению концентрации проводилось 5 параллельных измерений. В результате было установлено, что калиб-

ровочные кривые носят линейный характер, с коэффициентом аппроксимации (R^2), равным 1 (рис. 4).

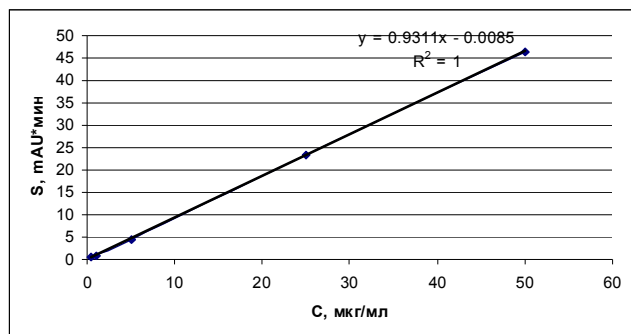


Рис 4. Зависимость площади под хроматографическим пиком от концентрации вещества VMA-99-82

Валидация метода проводилась согласно Guideline on bioanalytical method validation (EMEA 2012) [6]. По полученным результатам измерений были рассчитаны точность и прецизионность (средняя ошибка измерения). Данные представлены в табл. 1.

Точность составила в среднем 97,84 %. Прецизионность (средняя ошибка измерения) 5,63 %.

Были определены внутрисуточные процентные колебания (повторяемость метода), которые не превышали 14 % в изучаемых диапазонах концентраций. Междневные процентные колебания (воспроизводимость метода) для изучаемого соединения не превышали в среднем 10 %. Чувствительность метода (предел количественного обнаружения) для изучаемого соединения составляет 1 мкг/мл. Предел обнаружения – 200 нг/мл (табл. 2).

При повторном проведении анализа, после 72 ч хранения стандартных растворов соединения при комнатной температуре, средние абсолютные процентные колебания находились в тех же пределах, показывая стабильность исследуемого вещества. При изучении влияния процессов замораживания и таяния было обнаружено, что средние абсолютные процентные колебания для VMA-99-82 находились в тех же пределах, что определяют стабильность вещества под влиянием данных факторов.

Таблица 1

Валидационные характеристики метода ВЭЖХ количественного определения соединения VMA-99-82

Номинальная концентрация, мкг/мл	Средние результаты измерения, mAU × мин., ($M \pm m$)	Средняя ошибка (прецизионность), %	Расчетная концентрация, мкг/мл	Точность, %
0,5	0,58 ± 0,08	14,42925	1,011814	202,3628
1	0,86 ± 0,09	10,82059	0,933895	93,38954
5	4,54 ± 0,33	7,316464	4,885888	97,71775
25	23,34 ± 0,51	2,203783	25,07974	100,319
50	46,52 ± 1,01	2,175144	49,96805	99,9361

Таблица 2

Основные аналитические параметры метода ВЭЖХ количественного определения соединения VMA-99-82

Параметры	Количество
Внутрисуточные колебания (повторяемость), %	14
Междневные колебания (воспроизводимость), %	10
Точность, %	97,84
Чувствительность, мкг/мл	1
Предел обнаружения, нг/мл	200
Средняя ошибка измерения, %	5,63

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при разработке методов количественного определения малорастворимых веществ в биологических пробах главными аналитическими проблемами являются извлечение из биоматрицы и выбор соответствующего растворителя. Для решения этих проблем необходимо использовать более широкий спектр сольвентов, в том числе нехарактерных для классической обращеннофазной хроматографии.

Также необходимо учитывать специфику биологического материала.

В результате проведенных исследований для количественного определения соединения VMA-99-82 разработан метод высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращеннофазной колонке C18 с УФ-детектированием.

Способ извлечения подобран оптимально и практически не влияет на среднюю ошибку измерения.

ния хроматографического метода количественного определения.

Разработанный метод количественного определения является высокоселективным и высокочувствительным, что позволяет эффективно использовать его для проведения фармакокинетических исследований соединения VMA-99-82.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дерфель К. Статистика в аналитической химии. — М.: Мир, 1994.

2. Петров В. И., Озеров А. А., Новиков М. С. и др. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. — 2004. — № 11. — С. 21—24.

3. Петров В. И., Озеров А. А., Новиков М. С. и др. // Фундаментальные исследования. — 2004. — № 1. — С. 78—79.

4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р. У. Хабриева. — М., 2005.

5. Guideline on bioanalytical method validation (EMA 2012). www.ema.europa.eu

6. Petrov V. I., Ozerov A. A., Novikov M. S. // Chemistry of Heterocyclic Compounds. — 2003. — Vol. 39 (9). — P. 1218—1226.

Контактная информация

Сучков Евгений Александрович — м. н. с. лаборатории фармакологической кинетики НИИ фармакологии, ВолгГМУ, e-mail: ewgenik@gmail.com

УДК 543.544.32:615.453.66

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДЕЙСТВУЮЩЕГО ВЕЩЕСТВА В ТАБЛЕТКАХ КЕМАНТАНА МЕТОДОМ ГАЗО-ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

А. В. Толкачева, Л. Н. Грушевская, Н. И. Авдюнина, Б. М. Пятин, Л. М. Гаевая, А. С. Михеева, В. И. Прокофьева, Е. В. Блынская

Научно-исследовательский институт фармакологии им. В. В. Закусова, Москва, Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова

Задача настоящего исследования состояла в разработке и валидации методики количественного определения кемантана в таблетках методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ-ПИД). Хроматографическое разделение проводили на кварцевой капиллярной колонке — WCOT Fused Silica CP-WAX 52 CB: 50 м, 0,32 мм, 1,2 мкм. Определены параметры пригодности хроматографической системы и факторы устойчивости методики. Разработанная методика валидирована, проведен анализ нескольких серий образцов таблеток кемантана.

Ключевые слова: кемантан, таблетки, 5-гидроксиадамantan-2-он, количественный анализ, валидация, газо-жидкостная хроматография.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ASSAY FOR KEMANTANE TABLETS BY GAS LIQUID CHROMATOGRAPHY

A. V. Tolkacheva, L. N. Grushevskaya, N. I. Avdyunina, B. M. Pyatin, L. M. Gaevaya, A. S. Miheeva, V. I. Prokofeva, E. V. Blinskaya

The objective of this study was to develop and to validate a new assay of the active ingredient in Kemantane tablets by GC-FID. Chromatographic separation was performed on the fused silica capillary column - WCOT Fused Silica CP-WAX 52 CB: 50 m, 0,32mm, 1,2 μm. Parameters of the chromatographic system suitability and robustness of the technique were determined. The developed technique was validated; several serial samples of Kemantane tablets 100 mg were analyzed.

Key words: kemantane, tablets, 5-hydroxyadamantan-2-one, assay, validation, gas liquid chromatography, GLC.

Кемантан (5-гидроксиадамantan-2-он) по своей структуре представляет собой производное адамантана, обладающее выраженной фармакологической активностью. Показано, что кемантан обладает антипаркинсоническим, иммунотропным действием, способностью устранять алкогольный абстинентный синдром, а также высокой цереброваскулярной активностью, усиливая кровоснабжение ишемизированного мозга [2, 3].

В ФГБУ «НИИ фармакологии им. В. В. Закусова» РАМН была создана лекарственная форма кемантана — таблетки дозировкой 100 мг. Ранее для количественного определения кемантана в таблетках применялся спектрофотометрический метод [1]. Однако разработанная методика обладала низкой чувствительностью и воспроизводимостью, в связи с чем было принято решение о разработке новой методики количественного определения с помощью метода газожидкостной хроматографии (ГЖХ).