

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2015

УДК: 615.27.074:543.544

**РАЗРАБОТКА ВЭЖХ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА СУКЦИНАТА  
В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС И КРОЛИКОВ**

*И.В. Черных, А.В. Шулькин, М.В. Гацанова, П.Ю. Мыльников*

Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, г. Рязань

**Разработана методика количественного определения этилметилгидрокси-  
пиридина сукцината с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с  
ультрафиолетовым детектированием в плазме крови кроликов и крыс. Методика  
характеризуется высокой точностью, воспроизводимостью, простотой выполнения  
и быстротой анализа.**

**Ключевые слова:** *этилметилгидроксипиридина сукцинат, мексидол, ВЭЖХ.*

Оценка динамики плазменной концентрации лекарственных веществ является существенным разделом анализа их фармакокинетики, позволяющим выявить особенности абсорбции, характера распределения, метаболизма и экскреции. Подобные исследования проводятся как на доклиническом этапе разработки лекарственных средств, так и на этапе их клинической апробации, а также после выпуска препарата на рынок с целью оптимизации фармакотерапии [4].

2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат («Мексидол», ООО НПК «Фармасофт», Россия) – оригинальный отечественный синтетический антиоксидант и антигипоксанта, обладающий высокой биологической активностью. Наиболее выраженный терапевтический эффект этилметилгидроксипиридина сукцинат оказывает при сосудистых и дегенеративных заболеваниях головного мозга, таких как ишемический и геморрагический инсульты, транзиторная ишемическая атака, дисциркуляторная энцефалопатия, болезни Альцгеймера и Паркинсона, травмы головного мозга, судорожные состояния, стрессы, алкогольная энцефалопатия [2].

Для повышения эффективности и безопасности фармакотерапии с использованием этилметилгидроксипиридина сукцината актуально дальнейшее исследование особенностей его фармакокинетики: механизмов проникновения в головной мозг через гематоэнцефалический барьер, распределения в различных отделах головного мозга, принадлежности к субстратам, индукторам, ингибиторам семейства цитохромов P450 и белков-транспортёров [7, 9].

В связи с использованием кроликов и крыс в качестве тест-систем для фармакокинетических исследований на доклиническом этапе целью настоящего исследования являлась разработка методики количественного определения этилметилгидрокси-пиридина сукцината в плазме крови кроликов и крыс методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

**Материалы и методы**

Исследование выполнено на 15 половозрелых кроликах-самцах породы Шиншилла массой 3500-4300 г, полученных из питомника ООО «Касимов-Миакро» и 30 половозрелых крысах-самцах Wistar массой 220-300 г, прошедших карантинный режим вивария Рязанского государствен-

ного медицинского университета. В ходе эксперимента животных содержали в условиях стандартной экспериментальной биологически чистой комнаты при температуре 22-24°C, естественном освещении, на подстилках из опилок деревьев лиственных пород. Кормление осуществляли *ad libitum*, в первой половине дня при свободном доступе к воде. Накануне забора крови животных лишали пищи при свободном доступе к воде.

Экспериментальные исследования осуществляли в соответствии с правилами лабораторной практики (Приложение к приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 года 708н).

Кроликам этилметилгидроксипиридина сукцинат (препарат «мексидол», ООО НПК «Фармасофт», Россия) вводили *per os* в дозе 3 таблетки/кролик (в среднем 100 мг/кг массы) [8], крысам – в дозе 200 мг/кг [6]. Через 15 мин; 30 мин; 1; 1,5; 2; 3; 4 и 5 часов после введения препарата у животных забирали кровь в объеме 2,5 мл из ушной вены (у кроликов) или брюшной вены (у крыс под эфирным наркозом) для определения концентрации этилметилгидроксипиридина сукцината (действующего вещества мексидола). Образцы крови центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Полученную плазму хранили при -29°C до последующего анализа.

#### Результаты и их обсуждение

Концентрацию этилметилгидроксипиридина сукцината в плазме крови кроликов и крыс определяли в изократическом режиме методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ детектированием по оригинальной методике. В работе использовали субстанцию этилметилгидроксипиридина сукцината, предоставленную фирмой-производителем («Фармасофт»).

Матричный раствор этилметилгидроксипиридина сукцината с концентрацией 1 мг/мл готовили с использованием метанола (ч. д. а.), из которого готовили растворы стандартных образцов.

Для экстракции и элюирования использовали вещества категорий «ХЧ», и «Для хроматографии»: этилацетат («ACROS ORGANICS»), ацетонитрил («ACROS ORGANICS»), триэтиламин («ACROS ORGANICS»), кислота ортофосфорная («ХИММЕД»), вода деионизированная.

Для экстракции этилметилгидроксипиридина сукцината к 1 мл плазмы крови кроликов или крыс добавляли 3 мл этилацетата, встряхивали на приборе Vortex (Elmi, Латвия) и помещали на встряхиватель для пробирок «Shaker» (Elmi, Латвия) на 10 мин, затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Органический слой упаривали на роторно-вакуумном испарителе (Heidolph instruments, Германия). Сухой остаток растворяли в 300 мкл подвижной фазы и 100 мкл раствора вводили в хроматограф.

Анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Beckman Coulter» (США), оснащенный автосамплером «Rheodyne» (США) и УФ спектрофотометрическим детектором «Beckman Coulter» (США) при длине волны 296 нм в изократическом режиме. При анализе использовали хроматографическую колонку – Beckman Coulter (США) 4,6\*150 мм (зернение 5 мкм). Температура разделения – 28°C. Скорость потока – 0,5 мл/мин. Подвижная фаза состояла из ацетонитрила и воды в объемном отношении 20:80 с добавлением триэтиламина до объемной доли 0,05% и ортофосфорной кислоты до pH 4,5. Время удерживания этилметилгидроксипиридина сукцината в данных условиях составило 18,1 мин.

Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки по высоте пиков. Калибровочную кривую получали в результате анализа проб плазмы крови кроликов или крыс с добавками известных количеств стандарта определяемого соединения. Калибровочная зависимость носила линейный характер в диапазоне концентраций 100 – 1000 нг/мл. Данная зависимость для кроликов и крыс описывалась следующими уравнениями:

Кролики:  $C = 10,9747 + 1,3717 \cdot 10^5 \cdot h$  ( $r = 0,9948$ ),

Крысы:  $C = 1,6922 + 1,3796 \cdot 10^5 \cdot h$  ( $r = 0,9926$ ),

где  $h$  – высота хроматографического пика,  $C$  – концентрация этилметилгидроксипиридина сукцината (нг/мл).

Соответствующие калибровочные графики зависимости высоты пика этилметилгидроксипиридина сукцината от его концентрации в плазме крови кроликов и крыс представлены на рисунках 1 и 2.

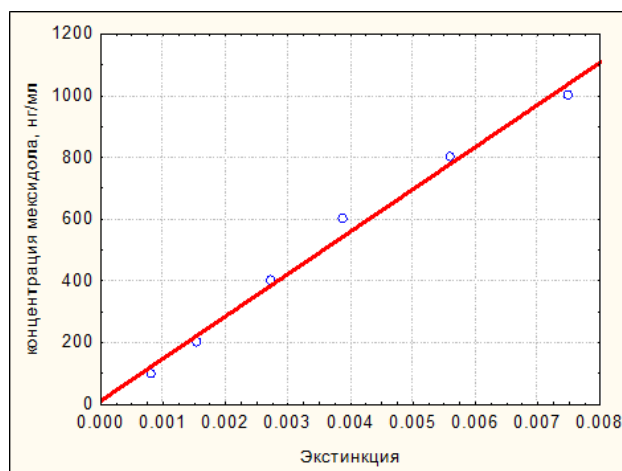


Рис. 1. Калибровочный график зависимости высоты пика этилметилгидроксипиридина сукцината от его концентрации в плазме крови кроликов

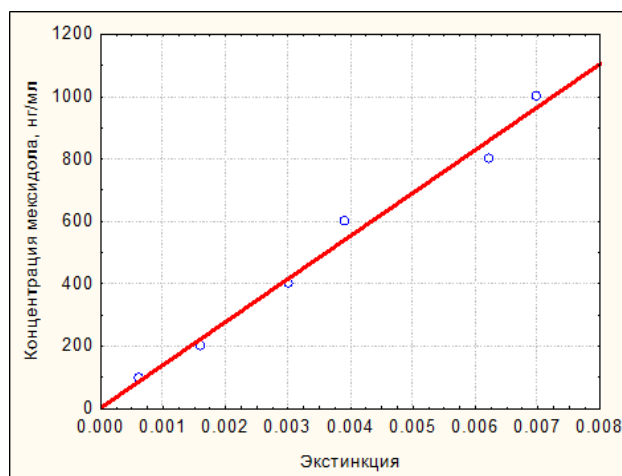


Рис. 2. Калибровочный график зависимости высоты пика этилметилгидроксипиридина сукцината от его концентрации в плазме крови крыс

Образцы полученных хроматограмм представлены на рисунках 3–4. Пики этилметилгидроксипиридина сукцината отделены от пиков эндогенных соединений, что позволяет достоверно определить исследуемое вещество.

Предел количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината для плазмы крови кроликов и крыс составил 40 нг/мл и 20 нг/мл соответственно.

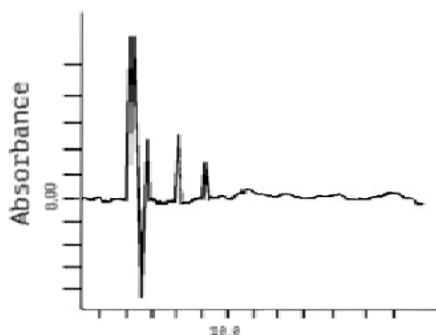


Рис. 3. Хроматограмма пробы интактной плазмы крови кролика

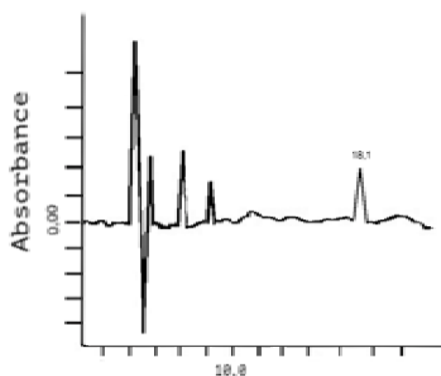


Рис. 4. Хроматограмма пробы плазмы крови кролика при однократном введении этилметилгидроксипиридина сукцината

В доступной литературе нами обнаружено несколько ВЭЖХ-методик определения концентрации этилметилгидроксипиридина сукцината.

В отличие от методики, описанной П.А. Барановым и соавт. (2009) [3], в нашей работе мы применяли не масс-спектрометрический, а более доступный УФ-способ детектирования, а также жидкостную экстракцию вместо твердофазной, что позволяет существенно удешевить метод исследования.

По сравнению с методиками А.К. Сариева и др. (2005) [5] и С.Б. Середина и соавт. (2005) [1] использована более простая подготовка проб и изменен состав подвижной фазы.

#### Выводы

Разработана хроматографическая методика количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината в плазме крови кроликов и крыс, характеризующаяся высокой точностью, воспроизводимостью, простотой выполнения и быстротой анализа.

#### Литература

1. Биотрансформация мексидола у мышей инбредных линий C57BL/6 и BALB/C / С.Б. Середина [и др.] // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2005. – Т. 68, №2. – С. 40-43.
2. Воронина Т.А. Мексидол: спектр фармакологических эффектов / Т.А. Во-

- ронина // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2012. – №12. – С. 86-90.
3. ВЭЖХ-МС метод определения 2-этил-6-метил-3-оксипиридина / П.А. Баранов [и др.] // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2009. – Т. 72, №3. – С. 22-28.
  4. Исследование фармакокинетики и биодоступности в создании новых оригинальных лекарственных средств пептидной структуры и их оптимальных лекарственных форм / Е.В. Иванникова [и др.] // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2013. – №2. – С. 1-17.
  5. Кинетика экскреции мексидола и его глюкуроноконъюгированного метаболита у добровольцев популяций казахов и русских / А.К. Сариев [и др.] // Клинич. фармакокинетика. – 2005. – №1 (2). – С. 23-28.
  6. Мексидол и сочетанная сосудистая патология мозга и сердца / А.В. Гнездилова [и др.] // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2011. – Т. 74, №6. – С. 20-23.
  7. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализационной медицины: руководство для врачей / В.Г. Кукес [и др.]. – М.: ГЭОТАР-МЕДиа, 2008. – 304 с.
  8. Сравнительное исследование противогипоксического, нейропротекторного и обезболивающего действия сукцинатсодержащих препаратов / В.В. Яснецов [и др.] // Авиакосмич. и экол. медицина. – 2012. – Т. 46, №6. – С. 41-45.
  9. Щулькин А.В. Роль гликопротеина-Р в рациональной фармакотерапии в кардиологии / А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, Н.М. Попова // Рац. фармакотерапия в кардиологии. – 2013. – Т. 9, №6. – С. 701-707.

#### DEVELOPMENT OF HPLC METHOD OF ETHYLMETHYLHYDROXYPYRIDINE SUCCINATE QUANTIFICATION IN RAT AND RABBIT PLASMA

*I.V. Chernykh, A.V. Shchulkin, M.V. Gatsanoga, P.Yu. Mylnikov*

**The methods of ethylmethylhydroxy pyridine succinate quantification by HPLC with UV detection in the plasma of rabbits and rats was developed. Techniques are characterized by high accuracy, reproducibility, ease of applying and rapidity of analysis.**

**Keywords:** *ethylmethylhydroxy pyridine succinate, mexidol, HPLC.*

Черных И.В. – к.б.н., ассист. кафедры общей химии с курсом биоорганической и органической химии ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

E-mail: ivchernykh88@mail.ru

Щулькин А.В. – к.м.н., ассист. кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

E-mail: alekseyshulkin@rambler.ru

Гацаного М.В. – интерн ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

E-mail: ivchernykh88@mail.ru

Мьльников П.В. – студент ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

E-mail: DukeViperLR@gmail.com