

Л. А. Смирнова, А. И. Ращенко, А. Ф. Рябуха, К. А. Кузнецов, Е. А. Сучков

Волгоградский государственный медицинский университет,  
кафедра фармакологии, лаборатория фармакокинетики НИИ фармакологии ВолгГМУ

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОЕДИНЕНИЯ РУ-1205 В БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБАХ

УДК 615.3:616-073

Разработан метод количественного определения нового биологически активного соединения производного бензимидазола РУ-1205 с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Были определены чувствительность метода, время удерживания вещества, максимум поглощения соединения в ультрафиолетовом спектре, а также произведен выбор экстрагента вещества из биологических проб.

*Ключевые слова:* ВЭЖХ, количественное определение, бензимидазол.

L. A. Smirnova, A. I. Raschenko, A. F. Riabuha, K. A. Kuznecov, E. A. Suchkov

## ASSAY OF COMPOUND RU-1205 IN BIOLOGICAL SAMPLES

We developed a method for chromatographic assay of a new biologically active compound, a benzimidazole derivative, RU-1205 using high performance liquid chromatography (HPLC). Sensitivity, time of substance retention, maximal absorption of the compound in the UV spectrum were determined. We also performed a selection of an extracting agent from biological samples.

*Key words:* HPLC, assay, benzimidazole.

Фармакокинетические показатели имеют большое значение при изучении новых высокоактивных соединений, так как они определяют тактику разработки лекарственных форм и изучение фармакодинамики данных веществ [3]. Актуальной задачей является создание новых эффективных опиоидных анальгетиков, с отсутствующими серьезными побочными эффектами [4]. В данной области каппа-селективные агонисты представляют одну из наиболее перспективных групп соединений для создания новых отечественных препаратов [2]. Результаты предварительных исследований показывают, что производные бензимидазола могут считаться потенциальными обезболивающими средствами с каппа-опиоидной активностью [1].

В ходе настоящего исследования разработан метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с диодноматричным детектированием для проведения фармакокинетических исследований соединения РУ-1205, позволяющий определять изучаемое вещество в биологическом материале.

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработка метода количественного определения производного бензимидазола соединения РУ-1205 с использованием ВЭЖХ.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовался жидкостной хроматограф (Shimadzu, Япония). Определение соеди-

нения РУ-1205 осуществлялось при помощи диодноматричного ультрафиолетового детектора при длине волны 205 нм, на колонке SUPELCOSIL LC-18 (5 мкм; 100 × 4,6 мм). Мобильная фаза включала ацетонитрил (УФ210) (Россия) и буферную систему, состоящую из однозамещенного фосфата калия 50 мМоль.

В качестве модификаторов мобильной фазы рассматривались следующие соединения: гептансульфоная кислота, тетрагидрофуран, триэтиламин и додецилсульфат в различных процентных концентрациях.

Извлечение соединения РУ-1205 из биологического материала осуществлялось ацетонитрилом в соотношении 1:1.

Для количественного определения вещества применялся метод абсолютной калибровки. Зависимость площадей пиков от концентрации РУ-1205 анализировалась методом регрессионного анализа. Статистическая обработка результатов проводилась при помощи компьютерной программы Excel.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При разработке метода использовались буферные системы с диапазоном pH от 2,5 до 7,0. При отклонении pH в кислую сторону было отмечено снижение времени удерживания вещества на хроматографической колонке. При pH = 3,0 время удерживания составило 3,5—4,0 мин. Значе-

ния pH выше 5,5—6 вызвали увеличение времени удерживания и снижение стабильности определения.

Температурный режим подбирался в диапазоне 30—75 °С. Уменьшение температуры приводило к резкому снижению чувствительности. В диапазоне 60—75 °С не выявлено значительных колебаний, соответственно окончательный выбор остановлен на значении 60 °С.

Соотношения водной и органической фаз: 30 % : 70 % v/v; 35 % : 65 % v/v; 40 % : 60 % v/v; 50 % : 50 % v/v и 55 % : 45 % v/v соответственно. Увеличение процента водной фазы приводило к значительному увеличению времени удерживания и снижению чувствительности. Увеличение доли органической фазы свыше 60 % вызывало уменьшение времени удерживания до 3—5 мин, неоправданно увеличивая риск интерференции эндогенными пиками биоматериала.

Модификаторы мобильной фазы не оказали положительного влияния на количественное определение соединения. Так, например, применение додецилсульфата приводило к резкому снижению высоты пика и увеличению его основания. При добавлении тетрагидрофурана происходило значительное снижение времени удерживания.

При разработке метода извлечения соединения РУ-1205 из биологического материала в качестве возможных экстрагентов рассматривались спирт этиловый, ацетонитрил, смесь спирт этиловый : ацетонитрил в соотношении 1 : 1, а также спирт этиловый, подкисленный 0,1н соляной кислотой.

Образцы встряхивались в течение десяти минут в ультразвуковой ванне для преципитации белков и центрифугировали в течение 15 минут при 3000 об/мин на центрифуге Eppendorf, после чего надосадочная жидкость отбиралась и вводилась в инжектор с объемом петли 20 мкл.

В результате в качестве экстрагента был выбран ацетонитрил, обеспечивающий достаточную степень экстракции и удовлетворительную очистку пробы. Степень экстракции соединения РУ-1205 составила не менее 90 %.

Таким образом, оптимальными условиями количественного определения субстанции РУ-1205 являются следующие: буферная система, состоящая из 50 мМ однозамещенного фосфата калия, pH = 5; соотношение водной и органической фазы 50 % : 50 % v/v; температурный режим 60 °С; длина волны детекции 205 нм; скорость потока 1 мл/мин. При данных условиях время удерживания составило 8—8,5 мин (рис. 1, 2).

Количественное определение проводилось в диапазоне концентраций от 0,5 до 25 мкг/мл. В результате было установлено, что калибровочные кривые носят линейный характер, с коэффициентом регрессии ( $R^2$ ) равным 0,998 (рис. 3).

Были определены внутрисуточные процентные колебания (повторяемость метода), которые не превышали 20 % в изучаемых диапазонах концентраций. Междневные процентные колебания (воспроизводимость метода) для изучаемого соединения не превышали в основном 15 % (табл.).

При повторном проведении анализа, после 72 часов хранения водных растворов соединения при комнатной температуре, средние абсолютные процентные колебания находились в тех же пределах, показывая стабильность изучаемого вещества.

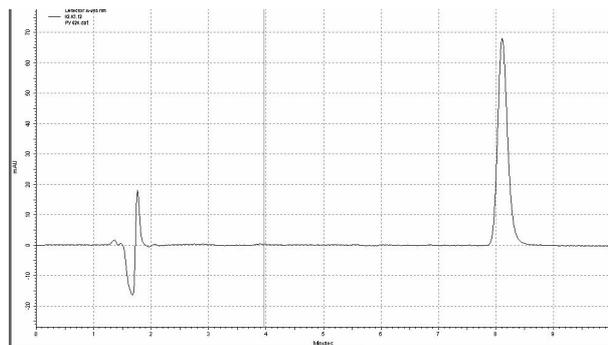


Рис. 1. Хроматограмма соединения РУ-1205 в водном растворе

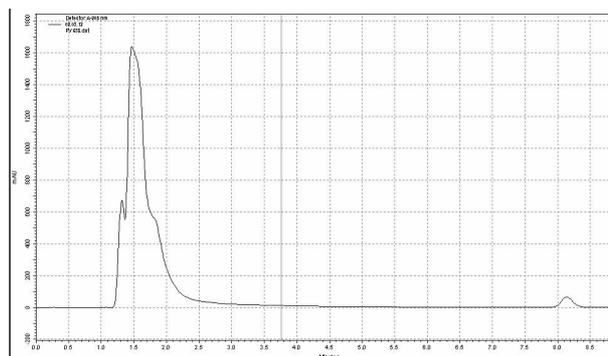


Рис. 2. Хроматограмма соединения РУ-1205 в биологическом материале

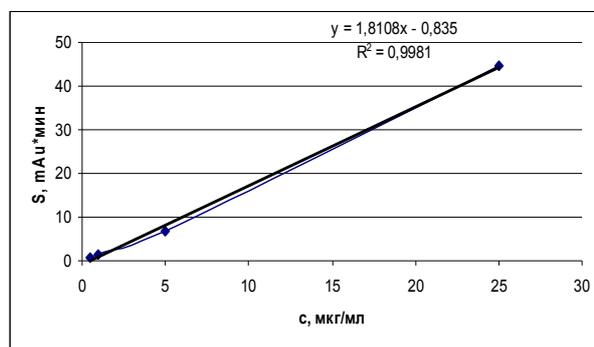


Рис. 3. Зависимость площади под хроматографическим пиком от концентрации вещества РУ-1205

Чувствительность метода для изучаемого соединения составляет 1 мкг/мл. Средняя ошибка измерения не превышает 15 %.

**Показатели воспроизводимости и повторяемости метода количественного определения соединения РУ-1205 в диапазоне линейной зависимости площади хроматографического пика от концентрации растворов ( $M \pm m$ )**

Концентрация, мкг/мл	Внутридневные колебания концентрации, мкг/мл			Повторяемость, $\pm \Delta \%$			Воспроизводимость (средняя ошибка измерения), %
	день 1	день 2	день 3	день 1	день 2	день 3	
0,5	0,89 $\pm$ 0,07	0,81 $\pm$ 0,08	1,06 $\pm$ 0,08	77,42	62,98	111,36	83,92
1	1,20 $\pm$ 0,06	1,18 $\pm$ 0,24	1,24 $\pm$ 0,12	20,4	18,04	24,31	20,91667
5	4,24 $\pm$ 0,51	4,25 $\pm$ 0,53	3,91 $\pm$ 0,21	-15,27	-14,99	-21,73	17,33
25	25,13 $\pm$ 6,24	21,6 $\pm$ 3,51	30,05 $\pm$ 5,10	0,54	-13,41	20,19	2,44

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований разработан хроматографический метод количественного определения соединения РУ-1205, обладающий достаточной чувствительностью и селективностью. Чувствительность метода составляет 1 мкг/мл, воспроизводимость 15 %.

Таким образом, разработанный метод количественного определения является высокоселективным и высокочувствительным, что позволяет эффективно использовать его для проведения

фармакокинетических исследований соединения РУ-1205.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гречко О. Ю., Васильев П. М., Черников М. В. и др. // Психофармакол. биол. наркол. — 2007. — Т. 7. — С. 1666.
2. Спасов А. А., Гречко О. Ю., Васильев П. М. и др. // Вопр. биол. мед. фарм. химии. — 2011. — № 8. — С. 52—57.
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Хабриев Р. У. — М., 2005. — С. 217—229.
4. Kivell B., Prisinzano T. E. // Psychopharm. — 2010. — Vol. 210. — P. 109—119.

**О. Ю. Гречко, Н. В. Елисеева, Д. М. Чикун, А. А. Спасов, В. А. Анисимова**

Волгоградский государственный медицинский университет,  
кафедра фармакологии

## ИЗУЧЕНИЕ АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗИМИДАЗОЛА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПУТЯХ ВВЕДЕНИЯ

УДК 615.212.7:616-092.9

Выполнены экспериментальные исследования по изучению эффективности соединения под лабораторным шифром РУ-1203, проявляющего каппа-агонистическую активность, при различных путях введения. Установлено, что соединение РУ-1203 проявляет наибольшую анальгетическую эффективность при внутривенном введении, а также обладает активностью при пероральном применении в отличие от препарата сравнения буторфанола.

*Ключевые слова:* каппа-опиоидный рецептор, агонист, опиоидные анальгетики.

**O. Y. Grechko, N. V. Eliseeva, D. M. Chikun, A. A. Spasov, V. A. Anisimova**

## A STUDY OF ANALGESIC ACTIVITY OF NEW BENZIMIDAZOLE DERIVATIVES WITH DIFFERENT ROUTES OF ADMINISTRATION

We studied the efficacy of RU-1203 compound exhibiting kappa-agonist activity with different routes of administration. It is established that the compound RU-1203 shows the greatest analgesic efficacy when administered intravenously; it is also active when administered orally, in contrast to butorphanol, the reference drug.

*Key words:* kappa-opioid receptor, agonist, opioid analgesics.

Арсенал анальгетических средств в настоящее время достаточно многообразен, среди которых максимальное обезболивание обеспечивают опиоидные анальгетики, которые по-прежнему остаются препара-

тами первого выбора при сильных болевых синдромах, связанных с травмой, хирургическими операциями, злокачественными новообразованиями и инфарктом миокарда [4, 9]. Однако выраженные побочные явления