
ФАРМАКОЛОГИЯ, ТОКСИКОЛОГИЯ

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

Лаборатория фармакокинетики НИИ фармакологии ВолгГМУ,
кафедра фармакологии ВолгГМУ, ГУ ВМНЦ

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 651:547.785.5

Проведен анализ существующих хроматографических методов анализа производных бензимидазола и имидазобензимидазола в биологических пробах. Определены особенности подбора условий экстракции и хроматографирования, обеспечивающие оптимальные валидационные характеристики.

Ключевые слова: ВЭЖХ, количественное определение, бензимидазолы, имидазобензимидазолы.

**L. A. Smirnova, A. A. Spasov, A. I. Raschenko, E. A. Suchkov,
A. F. Riabuha, K. A. Kuznetsov**

ANALYTICAL FEATURES OF CHROMATOGRAPHIC METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF BENZIMIDAZOLE DERIVATIVES

An analysis of current chromatographic methods of quantitative determination of benzimidazole of and imidazobenzimidazole derivatives in biological samples was performed. We determined the specific conditions of chromatographic analysis and extraction from biological samples providing optimum validation parameters.

Key words: HPLC, quantitative determination, benzimidazoles, imidazobenzimidazoles.

В медицинской практике широко используются лекарственные препараты на основе бензимидазола, проявляющие различную фармакологическую активность (дибазол, омепразол, пимозид, мебендазол, бемитил, этомерзол, афабазол и др.). Более 30 лет назад в Волгоградском государственном медицинском институте под руководством профессора Г. В. Ковалева было начато изучение фармакологической активности конденсированных производных бензимидазола, а именно имидазо(1,2- α)бензимидазола. Синтез данных соединений осуществлен в Ростовском государственном университете под руководством А. М. Симонова и В. А. Анисимовой. В настоящее время в Волгоградском государственном медицинском университете и НИИ фармакологии находится на различных стадиях доклинических и клинических испытаний [2] ряд лекарственных веществ – эноксифол (це-

ребропротекторное средство), антиаритмические средства амфедазол и ритмидазол, противодиабетическое средство диабенол, соединение с противоязвенной активностью РУ-64 и соединение РУ-1205 с местноанестезирующей активностью [1, 3, 4].

Производные имидазо(1,2- α)бензимидазола синтезированы в НИИ ФОХ РГУ. Химические структуры и химическая чистота (99,5 %) соединений подтверждена методами ИК-, ЯМР- и УФ-спектроскопии, а также методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Химические структуры лекарственных препаратов дибазол, бемитил, ритмидазол, эноксифол, амфедазол, диабенол и соединения РУ-64 и РУ-1205 представлены в табл. 1.

Большое значение имеет выбор метода анализа при фармакокинетических исследованиях. Избранный метод должен иметь высокую чувствительность, возможность работы с малыми

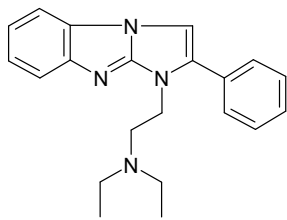
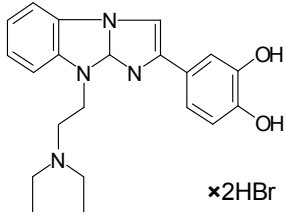
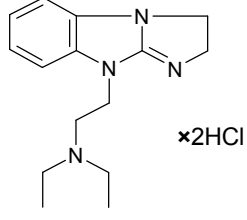
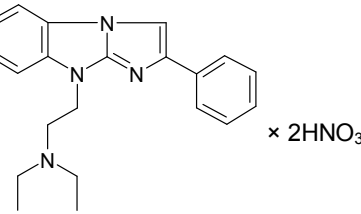
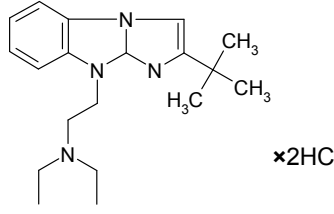
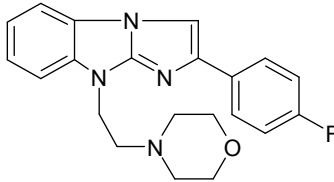
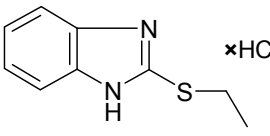
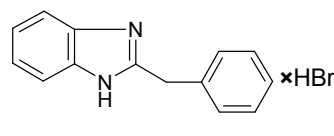
объемами проб, большую специфичность и избирательность, надежность, воспроизводимость и универсальность метода.

Существует большое количество методов высокоэффективной жидкостной хроматографии

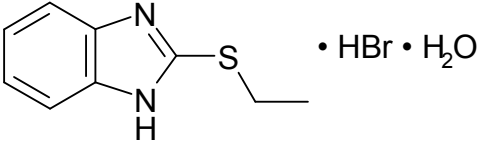
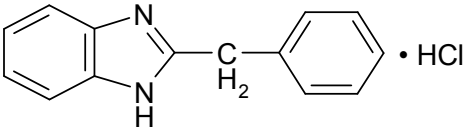
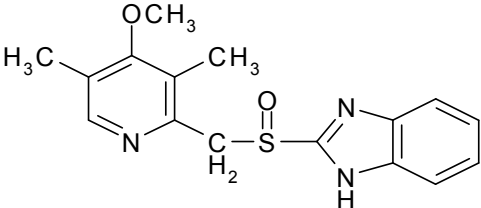
(ВЭЖХ) для анализа лекарственных средств, производных бензимидазола. Основные хроматографические методы анализа лекарственных средств производных бензимидазола представлены в табл. 2.

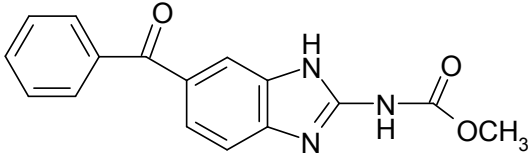
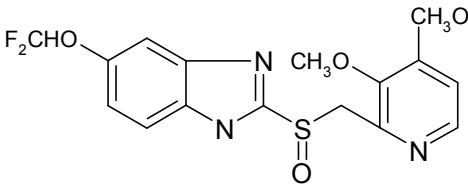
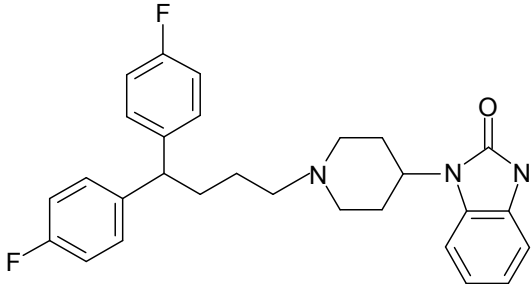
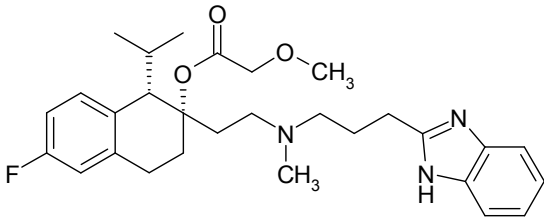
Таблица 1

Химические структуры изучаемых соединений

Производные имидазобензимидазола		
N ₁ - производные	N ₉ - производные	
	Циклические производные	Ациклические производные
 <p>Амфедазол – 1-диэтиламиноэтил – 2-фенилимидазо(1,2-α)БИ ×2HCl</p>	 <p>Эноксифол – 9-этиламиноэтил- 2-дигидроксифенилимидазо(1,2-α)БИ ×2HBr</p>	 <p>Диабенол – 9-диэтиламиноэтил-2,3- дигидроимидазо(1,2-α)БИ ×2HCl</p>
	 <p>РУ-64 – 9-этиламиноэтил – 2-фенилимидазо(1,2-α)БИ × 2HNO₃</p>	 <p>Ритмидазол – 9-диэтиламиноэтил – 2-третбутилимидазо(1,2-α)БИ ×2HCl</p>
N₉- производные морфолин-содержащие		
 <p>РУ – 1205 – 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2-α]бензимидазол</p>		
Производные бензимидазола		
 <p>Бемитил – 2-этилтиобензимидазол ×HCl</p>	 <p>Дибазол – 2-бензилбензимидазол ×HBr</p>	

**Хроматографические методы анализа со спектральной детекцией,
разработанные для лекарственных средств, производных бензимидазола [3]**

Препарат	Метод определения
<p>Бемитил 2-этилмеркаптобензимидазола гидробромид моногидрат</p> 	<p>1. Газожидкостная хроматография: а) колонка: 5 % силикон ХЕ – 60 на хезасорбе AW – HMDS 0,200 мм (Чехия); $t_{\text{кол.}} = 210 \text{ }^\circ\text{C}$; $t_{\text{исп.}} = 300 \text{ }^\circ\text{C}$; газ-носитель – N_2 о. ч. – 30 мл/мин; $T_{\text{уд.}} = 8$ мин; детектор пламенно-ионизационный; чувствительность – 10 нг/м; б) $l_{\text{кол.}} = 2$ м, сорбент – 5 % силоксан SE – 30; $t_{\text{кол.}} = 200 \text{ }^\circ\text{C}$, $t_{\text{дет.}} = 250 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_{\text{уд.}} = 5$ мин; в) сорбент 5% E – 30; условия: $t_{\text{кол.}} = 185 \text{ }^\circ\text{C}$, $t_{\text{исп.}} = 325 \text{ }^\circ\text{C}$; $T_{\text{уд.}} = 7$ мин. 2. ВЭЖХ с УФ-детектированием: колонка с сорбентом Separon SGX C18 размером 4×250 мм, d частиц 5 мм («Элсико»); элюент – ацетатный буфер (рН = 3,6) и ацетонитрил в соотношении 1:1; давление в колонке 132–133 бар, $U_{\text{потока}} = 1$ мл/мин, $\lambda = 280$ нм, чувствительность – 1 нг/мл</p>
<p>Дибазол 2-бензилбензимидазола гидрохлорид</p> 	<p>1. Кислотноосновное титрование в неводных средах. 2. Спектрофотометрия. 3. Экстракционно-фотометрические методы. 4. Потенциометрические методы. 5. Колориметрические методы. 6. ВЭЖХ с УФ-детектированием: а) колонка с сорбентом Separon SG-X C18 размером 4×250 мм, d частиц 5 мкм («Элсико»); элюент: ацетатный буфер (рН = 3,6) и ацетонитрил (1:1); давление в колонке 132–133 бар, $U_{\text{потока}} = 1$ мл/мин; $T_{\text{уд.}} = 12$ мин; $\lambda = 280$ нм, чувствительность – 50 нг/мл; б) $\lambda = 254$ нм, $t_{\text{уд.}} = 16$ мин, чувствительность – 100 нг/мл; в) колонка с корасилом-1 или корасилом-2; сорбент – Poly g = 300, элюент – гептан-этанол (колонка с лихросорбом Si = 60, элюент – дихлорметан-этанол-вода); г) ВЭЖХ с флюорометрическим детектированием: колонка с катионитом «Partisil-10SGX» (4,6×25 мм, «Altex», США); элюент: ацетонитрил-вода-диэтил-формаид-ортофосфорная кислота = 61:138:0,67:0,6; $U_{\text{потока}} = 1,5$ мл/мин; $\lambda_{\text{возб.}} = 219$ нм; $\lambda_{\text{дет.}} = 350$ нм; чувствительность – 0,01 мкг/мл</p>
<p>Омепразол (Гастрозол) 5-метокси-2-[[[4-метокси-3,5-диметил-2-пиридил)метил]сульфинил]бензимидазол</p> 	<p>1. ВЭЖХ с УФ-детектированием: колонка: 150×4,5 мм с Lichrosorb SI 60, 5 мкм или Waters Radial – PAK C8, 10 мкм (100×5 мм); для определения в плазме крови и моче – Poligosil C 18, 5 мкм; элюент: ацетонитрил (34 %) – фосфатный буфер с рН = 7,7 (76 %); $U_{\text{потока}} = 1$ мл/мин; $\lambda = 302$ нм; чувствительность – 25 нмоль/л. 2. Радиогграфия: ^{14}C – меченный омепразол; доза для крыс – 10–100 мкмоль/кг, доза для людей – 20 мкКи (20 мг); элюент: ацетонитрил (34%) – фосфатный буфер с рН = 7,7 (76%); чувствительность в органах крыс – 0,002–0,2 нмоль/мл</p>

Препарат	Метод определения
<p>Мебендазол (Вермокс) 5-бензоил-2-метоксикарбониламино-бензимидазол</p> 	<p>Радиография: ^3H – меченный мебендазол с удельной радиактивностью 12,7 мКи/г (0,47 ГБк/г); сцинтилляционный раствор: 6 г/л РРО (2,5-дифенилоксазол) в смеси толуол-этилцеллозольв (5:3); чувствительность – 11 (имп/мин)/нг</p>
<p>Пантопразол 5-диформетокси-2-[(3,4-диметокси-2-пиридинилметил)-сульфинил]-1Н-бензимидазол</p> 	<p>ВЭЖХ: $\lambda = 286 \text{ нм}$; чувствительность – 0,03 мкг/мл</p>
<p>Пимозид 1-[1-[4,4-бис-(п-фторфенил)бутил]-4-пиперидил]бензимидазолин-2</p> 	<p>Радиография: ^3H – меченный пимозид; сцинтилляционный раствор: 2 мл этанолового извлечения + 10 мл раствора (2,5-бис-2-(5-третбутилбенз-оксазол)тиопен в толуене)</p>
<p>Мибефрадил</p> 	<ol style="list-style-type: none"> ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием: элюент: ацетонитрил (38 %) и водный раствор (KH_2PO_4 39,3 ммоль/л и натрий-пентансульфоновая кислота 8,2 ммоль/л) (62 %); $T_{\text{уд.}} = 10,7 \text{ мин}$; $U_{\text{потока}} = 2 \text{ мл/мин}$; $\lambda_{\text{возб.}} = 270 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{исп.}} = 300 \text{ нм}$; Газовая хроматография с ионизационно-пламенным детектированием: колонка: HP fused-silica capillary column (50 % phenyl methyl silicone) длиной 15м и с внутренним $d = 0,53 \text{ мм}$; $t_{\text{кол.}} = 247 - 285 \text{ }^\circ\text{C}$; чувствительность – 0,1 нг/мл

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработать высокочувствительные и селективные методы количественного определения в биологическом материале новых лекарственных средств, производных бензимидазола.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Для количественного определения соединений нами был разработан метод ВЭЖХ. Использовались жидкостные хроматографы «Hewlett Packard» серии 1050 с УФ-детектором (США), Gilson серии 6000 с флуоресцентным детектором

(Франция) и Shimadzu серии LC-10AD с диодно-матричным детектором (Япония). Для приготовления мобильной фазы использовали ацетонитрил (УФ210) («Лекбиофарм», Россия) и ацетатный буфер, состоящей смеси «х. ч. ледяной» уксусной кислоты («Реахим», Россия) и ацетата натрия (х. ч., «Реахим», Россия), а также раствор однозамещенного фосфата калия (х. ч., «Реахим», Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Препарат «**Эноксифол**» и продукт его окисления определяли на жидкостном хроматографе Gilson серии 6000 с флуоресцентным детектором на колонке C18 4,6 × 250 мм, 5μм. Подвижная фаза составляет смесь ацетонитрила (60 %) и ацетатного буфера pH 5,0 (40 %). Длина волны возбуждения 270 нм, длина волны эмиссии 330 и 410 нм. Чувствительность метода составляет для эноксифола 1 μг/мл и для продуктов его окисления 100 нг/мл. Идентификацию исследуемых веществ и расчет их концентрации проводили по методу абсолютных стандартов. Время удерживания для эноксифола составило 4,4–4,8 мин, для продукта окисления – 5,8–6,0 мин.

Для хроматографического анализа субстанции **ритмидазола** использовалась колонка Separon SGX C18 (4 × 100 мм), размером частиц 5 мкм фирмы «Элсико». В качестве подвижной фазы использовали элюент, содержащий 70 % ацетонитрила, 30 % ацетатного буфера 0,1M с pH 5,0. Скорость потока 0,5 мл/мин. Детектирование производили при длине волны 280 нм. Время удерживания ритмидазола при данных условиях составило 15 минут. Чувствительность метода 0,5 μг/мл. Для хроматографического анализа субстанции **амфедазола** использовалась колонка Separon SGX C18 (4 × 150 мм), размером частиц 5 мкм фирмы «Элсико». В качестве подвижной фазы использовали элюент, содержащий 70 % ацетонитрила, 30 % ацетатного буфера 0,1M с pH 5,0. Скорость потока 0,5 мл/мин. Детектирование производили при длине волны 270 нм. Время удерживания амфедазола при данных условиях составило 21 минуту. Чувствительность метода 0,1 μг/мл.

Хроматографическое определение **соединения РУ-64** проводили на колонке BIO-SIL ODS-5S, 5 мкм (4 × 100 мм) со скоростью потока элюента (70 % ацетонитрила, 30 % ацетатного буфера pH 5,0) 1 мл/мин с УФ-детекцией при длине волны 265 нм и чувствительности метода 100 нг/мл, время удерживания 15 минут.

Определение препарата «**Диабенол**» на колонке (150 × 2 мм) силосорб С 18 (7 мкм); элюент-ацетонитрил и ацетатный буфер pH 5.0 в соотношении 1 : 1; скорость элюирования – 1 мл/мин; давление в колонке – 126 бар. Детектирование проводили при 280 нм. Чувствительность метода 1 μг/мл. Время удерживания 25 минут.

Соединение РУ-1205 хроматографировали на колонке SUPELCOSIL LC-18 (5 мкм; 100 мм ×

4,6 мм). Для приготовления мобильной фазы использовали ацетонитрил и раствор однозамещенного фосфата калия 50 мМоль, pH = 6,7 в соотношении 1 : 1. Субстанцию вещества фиксировали при длине волны 205 нм. Чувствительность метода составляет 0,5 μг/мл. Время удерживания 8,5–9 мин.

Количественное определение **бемитила** проводили на колонке фирмы «Элсико» с сорбентом Separon SG-X C18 размером 4 × 250 мм, диаметр частиц 5 микрон. В качестве жидкой фазы использовали смесь, содержащую ацетатный буфер с pH 3,6 и ацетонитрил в соотношении 50 / 50 %. Давление в колонке 132–133 бар, скорость потока 1 мл/мин. Длина волны λ = 280 нм. Чувствительность данного метода в 10 раз выше ранее существующих методов и позволяет определять биметил в количестве от 1ng/ml до 100 μg/ml. **Дибазол** определяли на колонке фирмы «Элсико» с сорбентом Separon SG-X C18 размером 4 × 250 мм, диаметр частиц 5 микрон. В качестве жидкой фазы использовали смесь, содержащую ацетатный буфер с pH 3,6 и ацетонитрил в соотношении 50 / 50 %. Давление в колонке около 130 бар, скорость потока 1 мл/мин. Длина волны λ = 254 нм. Время удерживания 16 минут. Чувствительность метода 10 нг/мл.

Экстракцию изучаемых соединений из биологических проб производили ацетонитрилом. Степень извлечения производных имидазобензимидазола из биологических проб составила (95,64 ± 3,99) %. При этом не наблюдалось зависимости степени экстракции от концентрации соединения в пробе. Для количественного определения веществ использовали метод абсолютной калибровки. Зависимость площадей пиков от концентрации веществ анализировалась методом регрессионного анализа в диапазоне концентраций от 0,1 до 50 мкг/мл. В результате было установлено, что калибровочные кривые носят линейный характер, с коэффициентом регрессии (R²) равным 0,99. Для изучаемых соединений были определены внутрисуточные процентные колебания (повторяемость метода), которые не превышали 20 % в изучаемых диапазонах концентраций. Междневные процентные колебания (воспроизводимость метода) для изучаемых соединений не превышала в основном 10 %.

При повторном проведении анализа, после 72 часов хранения водных растворов соединений при комнатной температуре, средние абсолютные процентные колебания находились в тех же пределах, показывая стабильность изучаемых веществ. При изучении влияния процессов замораживания и таяния было обнаружено, что средние абсолютные процентные колебания для изучаемых веществ находились в тех же пределах, что определяет стабильность веществ под влиянием данных факторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, лекарственные средства, производные бензимидазола и имидазо(1,2-α)

бензимидазола проявляют абсорбционную активность в ультрафиолетовой области спектра. Конденсированные производные бензимидазола обладают способностью к флуоресценции. Лекарственные средства, производные бензимидазола, имеют более интенсивное поглощение в УФ-области спектра. Для лекарственного вещества эноксифол более выражена флуоресцентная эмиссия, чем ультрафиолетовая абсорбция. Таким образом, при разработке хроматографических методов количественного определения необходимо учитывать фотоабсорбционные и фотоэмиссионные особенности изучаемых веществ при выборе детектирования.

Следует учитывать при хроматографическом анализе данных химических структур, что лучшее разделение достигается при большом содержании ацетонитрила и при pH буферных систем от 3,6 до 6,7. Способность данных веществ легко отделяться от компонентов биопробы при пробоподготовке обеспечивает возможность работать по методу абсолютной калибровки, без использования внутренних стандартов, значительно упрощая анализ.

Разработанные хроматографические методы анализа обладают достаточной селективностью и позволяют определять в биологических пробах, как сами лекарственные вещества, так и их возможные метаболиты. При этом времена

удерживания стандартов лекарственных веществ позволяют отделять возможные метаболиты с меньшими временами удерживания от «мертвого объема» и фоновых веществ биологической пробы.

Таким образом, разработанные методы количественного определения являются высоко-селективными и высокочувствительными, что позволяет эффективно использовать их для проведения фармакокинетических исследований конденсированных и не конденсированных производных бензимидазола.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петров В. И. // Вестник ВолгГМУ. – 2011. – № 2. – С. 3–8.
2. Гречко О. Ю., Васильев П. М., Черников М. В. и др. // Психофармакология, биология, наркология. – 2007. – Т. 7. – С. 1666.
3. Сласов А. А., Гречко О. Ю., Васильев П. М. и др. Направленный поиск веществ с капта-опиоидной агонистической активностью среди производных гетероциклических систем // Вопр. биол. мед. фарм. химии. – 2011. – № 8. – С. 52–57.
4. Смирнова Л. А. Фармакокинетика производных бензимидазола как основа для создания новых лекарственных препаратов и оптимальных схем фармакотерапии: дис. ... д-ра биол. наук. – 2004. – 337 с.

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

НИИ фармакологии ВолгГМУ, ГУ ВМНЦ

ОСОБЕННОСТИ ПРОБОПОДГОТОВКИ ДЛЯ МЕТОДА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МАЛОРАСТВОРИМЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 615.1:542.74

Были изучены особенности пробоподготовки малорастворимого производного аденина VMA-99-82. На их основании разработан метод количественного извлечения изучаемого вещества из биологического материала.

Ключевые слова: производные аденина, ВЭЖХ.

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

SPECIFIC OF SAMPLE PREPARATION FOR HPLC METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF SLIGHTLY SOLUBLE COMPOUNDS

Specifics of sample preparation of slightly soluble adenine derivative VMA-99-82 were studied. On the basis of obtained experimental data we developed a method of quantitative extraction from biological material.

Key words: adenine derivatives, HPLC.

Разработка и внедрение в практику новых лекарственных средств является одной из актуальнейших проблем современной медицины. Для ее решения проводится как направленный синтез аналогов существующих биологически активных веществ, так и скрининговые исследо-

вания различных групп соединений. Для дальнейшего изучения веществ, продемонстрировавших лучшие показатели, необходима разработка адекватных аналитических методов количественного определения в различном биологическом материале. На сегодняшний день методом