

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 каппа-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

наиболее полно соответствующим поставленным задачам является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

На примере разработки метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) количественного определения производного аденина соединения VMA-99-82 рассмотреть аналитические проблемы, наиболее характерные при работе с малорастворимыми веществами.

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.

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 сольвента. 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 соотношении 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:

A – 90%-й этанол; B – ацетонитрил; C – 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%-го, 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 анализ 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 % этанол : ацетонитрил 50 % : 50 % v/v) в соотношении 1 : 2, затем встряхивали в ультразвуковой ванне (Сапфир, Россия) в течение 15 минут для преципитации белков и центрифугировали 15 минут 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. Чувствительность метода для изучаемого соединения составляет 1 мкг/мл. Внутривневные процентные колебания (повторяемость метода) и междневные процентные колебания (воспроизводимость метода) не превышали в основном 20 %. Средняя ошибка измерения не превышает 15 %.

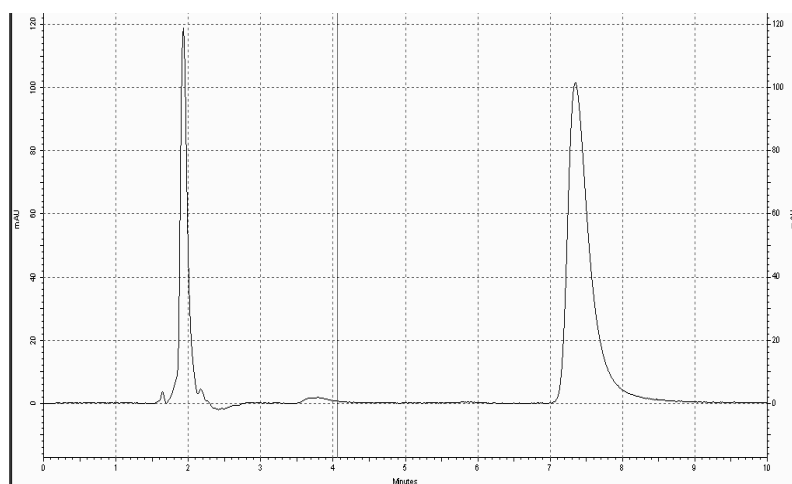


Рис. 2. Образец хроматограммы стандартного раствора (90%-й этанол : ацетонитрил 50 % : 50 % v/v) соединения VMA-99-82

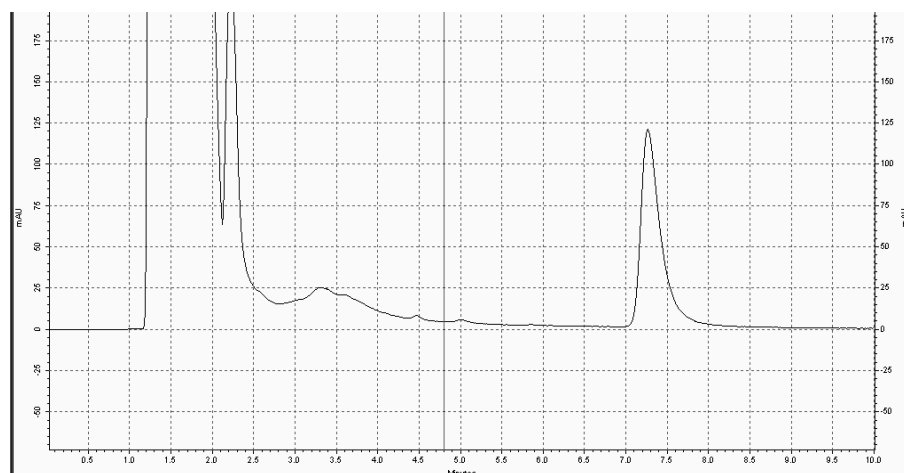


Рис. 3. Образец хроматограммы соединения VMA-99-82 в биологическом материале

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 растворителей, в том числе нехарактерных для классической обращеннофазной хроматографии. Также необ-

ходимо учитывать специфику биологического материала.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М., 2005. – С. 217–229.
2. Petrov V. I., Ozerov A. A., Novikov M. S., et al. 9-(2-aryloxyethyl) derivatives of adenine – a new class of non-nucleosidic antiviral agents.