

Л. А. Смирнова, А. Ф. Рябуха, К. А. Кузнецов, Е. А. Сучков, В. Н. Перфилова

НИИ фармакологии ВолгГМУ, ГУ ВМНЦ

РАЗРАБОТКА МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБАХ

УДК 615:547.466.3

Проведен анализ существующих хроматографических методик определения производных ГАМК в биологических пробах. Определены особенности подбора условий экстракции и хроматографирования, обеспечивающие оптимальные валидационные характеристики.

Ключевые слова: ВЭЖХ, количественное определение, производные ГАМК.

L. A. Smirnova, A. F. Riabuha, K. A. Kuznetsov, E. A. Suchkov, V. N. Perfilova

DEVELOPMENT OF METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF NEW GABA DERIVATES IN BIOLOGICAL SAMPLES

An analysis of current chromatographic methods of determination of GABA 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, GABA derivatives.

Биологические жидкости – очень сложные объекты для выполнения анализа, так как они представляют собой многокомпонентные смеси, включающие большое число неорганических и органических соединений различной химической структуры. Большое значение имеет выбор метода проведения биофармацевтического анализа, он должен иметь высокую чувствительность, возможность работы с малыми объемами проб, большую специфичность и избирательность, надежность, воспроизводимость и универсальность. Данным требованиям отвечает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), являющийся одним из основных аналитических методов при проведении фармакокинетических исследований. Этот этап обязателен при проведении доклинических и клинических исследований новых лекарственных препаратов с использованием методов доказательной медицины [1].

Среди путей создания новых лекарственных препаратов наиболее перспективным и продуктивным остается принцип модификации структуры эндогенных физиологически активных соединений, в частности, производных гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК). Так получен целый ряд лекарственных препаратов: пираретам, группа рацетамов, аминалон, оксипутират натрия, фенибут, баклофен, пикамилон, фенотропил и др., нашедшие широкое применение в клинической практике [3].

Ранее нами был разработан метод ВЭЖХ с диодноматричным УФ-детектированием для проведения фармакокинетических исследований фенибута и цитрокарда [2].

При количественном определении нового производного ГАМК, имеющего естественную

флуоресценцию, нами был разработан метод ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием, обладающий большей чувствительностью и селективностью по сравнению с использованием УФ-детектора.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработать методы количественного определения нового производного ГАМК в биологических пробах для проведения дальнейших фармакокинетических исследований.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание вещества определяли методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Shimadzu (Япония) с флуоресцентным детектором RF-10Ax1, колонка SUPELCO SIL LC-18 (5 мкм; 150 мм x 4,6 мм).

Для приготовления мобильной фазы использовали ацетонитрил (УФ210, Россия) и буферную систему, состоящую из однозамещенного фосфата калия 50 мМоль, рН 4,65 (Россия) в соотношении 12 : 88.

Субстанцию фиксировали при длине волны экстинции 210 нм и длине волны эмиссии 285 нм. Чувствительность метода составляет 0,5 мкг/мл. Идентификацию исследуемого вещества и расчет концентрации проводили по методу абсолютных стандартов. Время удерживания для производного ГАМК составило 7–8 минут.

Извлечение производного ГАМК, а также одновременное осаждение белков из биологических проб производили из плазмы, сыворотки и цельной крови, а также из 20%-х водных гомогенатов органов и тканей крыс. В качестве

экстрагентов использовали ацетонитрил, метанол и концентрированную соляную кислоту. Наилучшей экстракции удалось достичь с использованием концентрированной HCl в соотношении с плазмой 1 : 0,2.

Образцы встряхивали 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 надосадочную жидкость отбирали и вводили в инжектор с объемом петли 20 мкл. Степень

извлечения для исследуемого вещества составляет 90 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для количественного определения вещества использовали метод абсолютной калибровки. Зависимость площадей пиков от концентрации производного ГАМК анализировалась методом регрессионного анализа в диапазоне концентраций от 0,1 до 10 мкг/мл (рис. 1, 2).

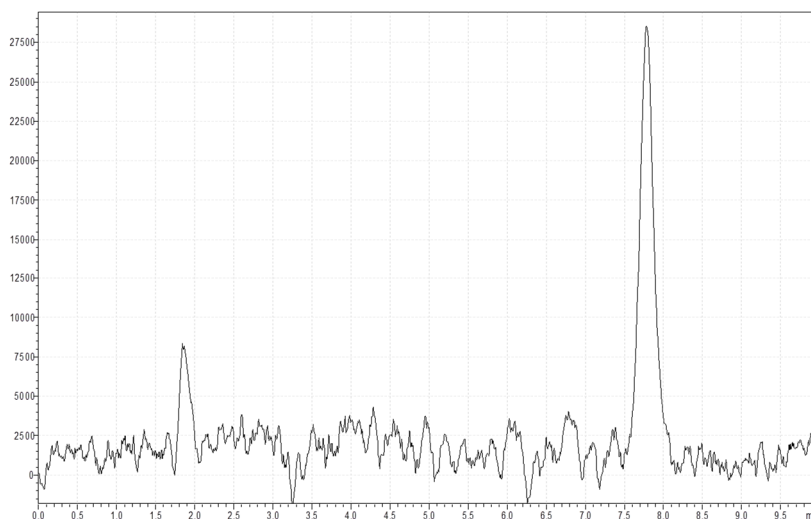


Рис. 1. Хроматограмма производного ГАМК в воде (1 мкг/мл)

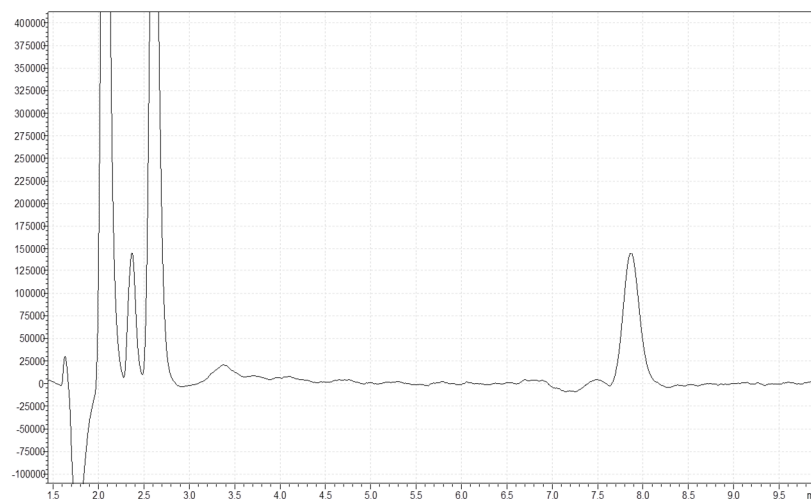


Рис. 2. Хроматограмма производного ГАМК в плазме (10 мкг/мл)

В результате было установлено, что калибровочные кривые носят линейный характер, с коэффициентом регрессии (R^2) равным 0,99 (рис. 3). Были определены внутридневные процентные колебания (повторяемость метода), которые не превышали 20 % в изучаемых диапазонах концентраций. Междневные процентные колебания (воспроизводимость метода) для изучаемого соединения не превышали в основном 10 % (см. табл.).

При повторном проведении анализа, после 72 часов хранения водных растворов соедине-

ния при комнатной температуре, средние абсолютные процентные колебания находились в тех же пределах, показывая стабильность изучаемого вещества. При изучении влияния процессов замораживания и таяния, было обнаружено, что средние абсолютные процентные колебания для производного ГАМК находились в тех же пределах, что определяет стабильность вещества под влиянием данных факторов. Чувствительность метода для изучаемого соединения составляет 0,5 мкг/мл. Средняя ошибка измерения не превышает 10 %.

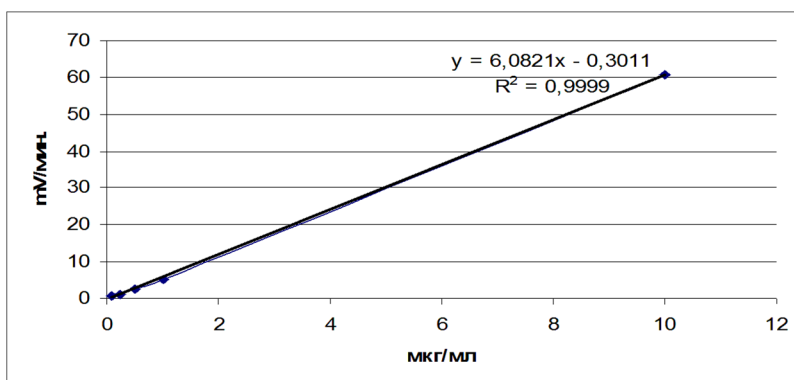


Рис. 3. Зависимость площади под хроматографическим пиком от концентрации производного ГАМК:
 x – площадь под хроматографическим пиком, мAU*мин; y – концентрация производного ГАМК мкг/мл

**Показатели воспроизводимости и повторяемости
 метода количественного определения производного ГАМК с использованием ВЭЖХ
 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 (ср. ошибка измерения), %
	1-й день	2-й день	3-й день	1-й день	2-й день	3-й день	
0,1	0,13 \pm 0,01	0,15 \pm 0,02	0,14 \pm 0,005	28,89	49,82	49,81	42,84
0,25	0,21 \pm 0,02	0,32 \pm 0,01	0,31 \pm 0,04	-15,78	29,77	23,43	22,99
0,5	0,43 \pm 0,04	0,53 \pm 0,05	0,64 \pm 0,09	-14,86	5,97	27,59	16,14
1	0,97 \pm 0,14	1,2 \pm 0,11	1,13 \pm 0,16	-2,85921	20,13	13,15	12,04
10	7,48 \pm 0,47	12 \pm 0,99	12 \pm 0,99	-25,14	20,03	20,07	21,75

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, для анализа производного ГАМК разработан метод хроматографии на обращеннофазной колонке C18 с флуоресцентным детектированием. Данный хроматографический метод обладает достаточной селективностью и позволит определять в биологических пробах как само лекарственное вещество, так и его возможные метаболиты.

Метод извлечения подобран оптимально и практически не влияет на среднюю ошибку измерения хроматографического метода количественного определения.

Таким образом, разработанный метод количественного определения является высокоселек-

тивным и высокочувствительным, что позволяет эффективно использовать его для проведения фармакокинетических исследований различных производных ГАМК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петров В. И. // Вестник ВолгГМУ. – 2011. – № 2. – С. 3–8.
2. Тюренков И. Н., Перфилова В. Н., Смирнова Л. А. // Химико-фармацевтический журнал. – 2010. – Т. 44, № 12. – С. 68–70.
3. Тюренков И. Н., Перфилова В. Н. Кардиоваскулярные и кардиопротекторные свойства ГАМК и ее аналогов. – Волгоград, 2008. – 237 с.