

Л. А. Смирнова, И. Н. Тюренков, В. Н. Перфилова, А. Ф. Рябуха, Е. А. Сучков

Волгоградский государственный медицинский университет,
лаборатория фармакокинетики НИИ фармакологии,
кафедра фармакологии и биофармации ФУВ,
лаборатория фармакологии сердечно-сосудистых средств НИИ фармакологии, ГУ ВМНЦ

ОСОБЕННОСТИ РАЗРАБОТКИ МЕТОДОВ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ

УДК 651:547.466.3

Проведен анализ существующих хроматографических методов анализа 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, I. N. Turenkov, V. N. Perfilova, A. F. Riabuha, E. A. Suchkov

ANALYTICAL FEATURES OF CHROMATOGRAPHIC METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF GABA DERIVATIVES

Analysis of current chromatographic methods of quantitative determination of GABA derivatives in biological samples was studied. Conditions of chromatographic analysis and extraction from biological samples providing optimal validation parameters were developed.

Key words: HPLC, quantitative determination, GABA derivatives.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Найти и внедрить в практику новые биологически активные соединения – является одной из актуальных проблем современной медицины. Одним из важнейших этапов при работе по данной проблематике является проведение фармакокинетических исследований. Полученные при этом данные позволяют объективно оценить и рекомендовать оптимальный путь введения, определить диапазон эффективных концентраций, обуславливающих желаемый эффект соединения, выявить фармакокинетические детерминанты действия препарата [1–3].

Для проведения фармакокинетических исследований необходимы адекватные методы количественного определения исследуемых соединений в биологическом материале. Избранный метод 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.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Количественное определение изучаемых веществ в биологическом материале проводили

методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Shimadzu (Япония) с диодноматричным ультрафиолетовым и флуоресцентным детекторами, колонка SUPELCOSIL LC-18 (5 мкм; 100 мм x 4,6 мм).

Для приготовления мобильной фазы использовали ацетонитрил (УФ210) (Россия) и буферную систему, состоящую из однозамещенного фосфата калия 50 мМоль (Россия). Для увеличения коэффициента емкости фенибута и цитрокарда в элюент вводили 0,12 % ион-парного реагента – натриевой соли гептансульфоново́й кислоты [4]. Соотношение водной и органической фазы для фенибута и цитрокарда составило 88 : 12 % v/v, для глутарона 90 : 10 % v/v. Скорость потока элюента – 1 мл/мин. Температура хроматографирования – 30 °С.

Извлечение изучаемых веществ, а также одновременное осаждение белков производили из цитратной плазмы крыс 10%-м ТХУ в соотношении 1 : 0,5. Образцы встряхивали в течение десяти минут в ультразвуковой ванне для преципитации белков и центрифугировали в течение 15 минут при 3 тыс. об./мин на центрифуге Eppendorf, после чего надосадочную жидкость отбирали и вводили в инжектор с объемом петли 20 мкл.

Статистическую обработку результатов осуществляли при помощи компьютерной программы Microsoft Excel [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Производные ГАМК фенибут, цитрокард и глутарон обладают достаточно сходными хроматографическими свойствами, поэтому параметры метода ВЭЖХ количественного определения для них будут весьма близки.

Однако в силу большего отличия по структуре для глутарона была разработана методика с флуоресцентной детекцией. А для фенибута и цитрокарда – метод ион-парной хроматографии с ультрафиолетовым детектором.

Идентификацию изучаемых веществ и расчет концентрации проводили по методу абсолютных стандартов. Время удерживания для фенибута и цитрокарда составило 9–11 мин, для глутарона – 5,5–6,5 мин.

Для количественного определения веществ использовали метод абсолютной калибровки. Зависимость площадей пиков от концентрации анализировалась методом регрессионного анализа в диапазоне концентраций от 0,5 до 200 мкг/мл. В результате было установлено, что калибровочные кривые носят линейный характер, с коэффициентом регрессии (R^2) равным 0,999 – 1 (рис. 1–3).

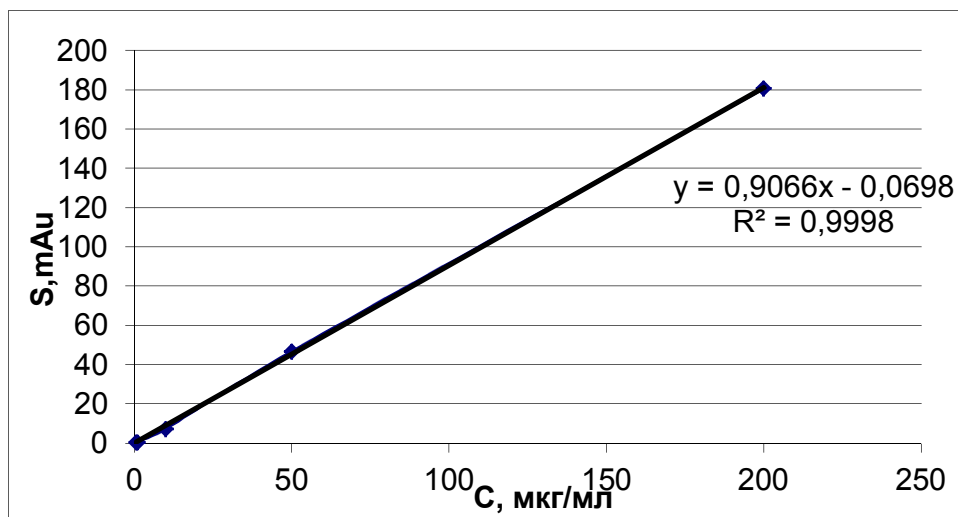


Рис. 1. Зависимость площади под хроматографическим пиком от концентрации фенибута:
* S – площадь под хроматографическим пиком, mAU × мин; * C – концентрация цитрокарда, мкг/мл

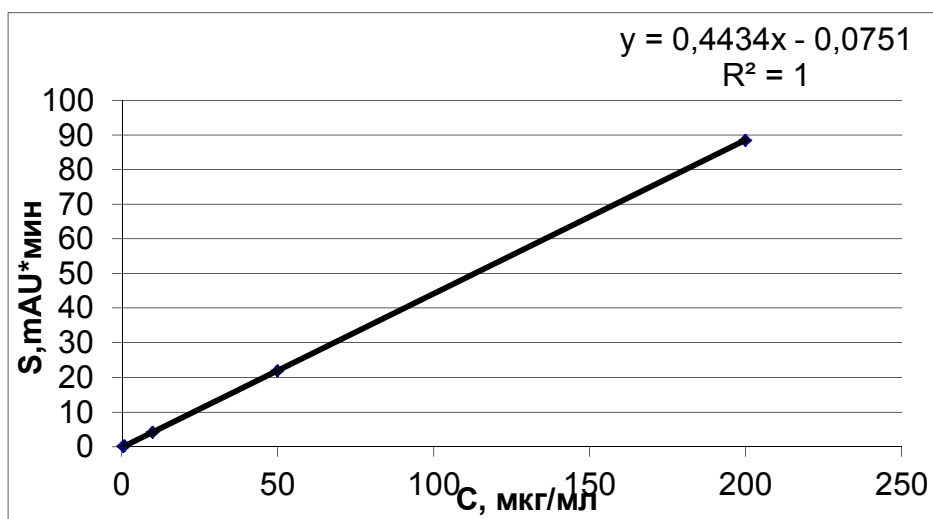


Рис. 2. Зависимость площади под хроматографическим пиком от концентрации цитрокарда:
* S – площадь под хроматографическим пиком, mAU × мин; * C – концентрация цитрокарда, мкг/мл

Далее были определены внутривневные процентные колебания (повторяемость метода), которые не превышали 14 % в изучаемых диапазонах концентраций. Междневные процентные колебания (воспроизводимость метода) для изучаемого соединения не превы-

шали в среднем 10 %. Точность 96 %. Чувствительность метода (предел количественного обнаружения) для изучаемого соединения составляет 1 мкг/мл. Предел обнаружения – 200 нг/мл. Средняя ошибка измерения не превышает 10 % (табл.).

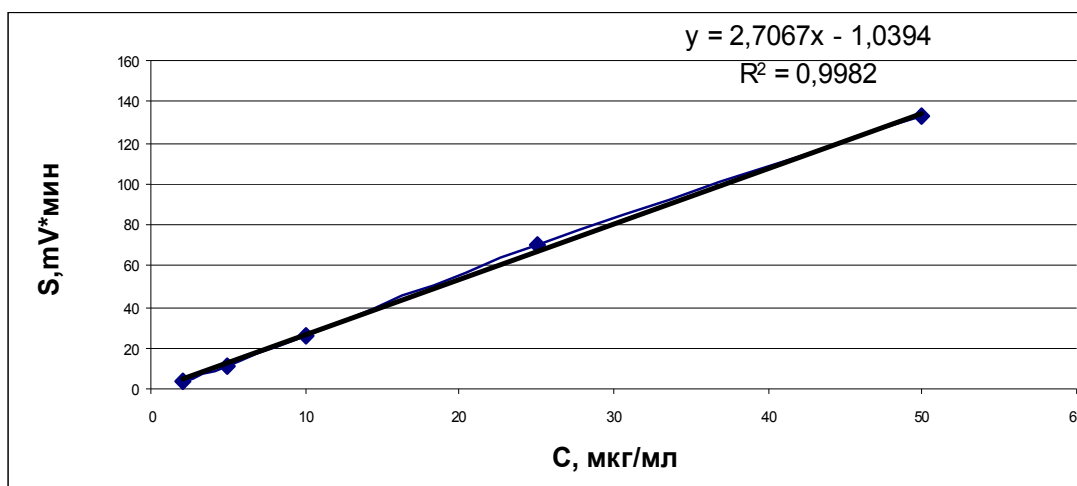


Рис. 3. Зависимость площади под хроматографическим пиком от концентрации глутарона:
* S – площадь под хроматографическим пиком, мAU × мин; * C – концентрация цитрокарда, мкг/мл

Основные аналитические параметры метода ВЭЖХ количественного определения фенибута, цитрокарда и глутарона

Параметр	Фенибут	Цитрокард	Глутарон
Внутридневные колебания (повторяемость), %	15	14	14
Междневные колебания (воспроизводимость), %	10	10	10
Точность, %	94	93	96
Чувствительность, мкг/мл	1	1	1
Предел обнаружения, нг/мл	500	500	100
Средняя ошибка измерения, %	9	9	8

При повторном проведении анализа, после 72 часов хранения стандартных растворов соединения при комнатной температуре, средние абсолютные процентные колебания находились в тех же пределах, показывая стабильность исследуемого вещества. При изучении влияния процессов замораживания и таяния, было обнаружено, что средние абсолютные процентные колебания для VMA-99-82 находились в тех же пределах, что определяет стабильность вещества под влиянием данных факторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, для количественного определения изучаемых соединений разработан метод высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращеннофазной колонке C18 с флуоресцентным и УФ-детектированием.

Способ извлечения подобран оптимально и практически не влияет на среднюю ошибку

измерения хроматографического метода количественного определения.

Разработанный метод количественного определения является высокоселективным и высокочувствительным, что позволяет эффективно использовать его для проведения фармакокинетических исследований различных производных ГАМК и их возможных метаболитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоусов Ю. Б. Клиническая фармакокинетика. – М.: Литтерра, 2005.
2. Дерфель К. Статистика в аналитической химии. – М.: Мир, 1994. – 267 с.
3. Каркищенко Н. Н., Хоронько В. В., Сергеева С. А. и др. Фармакокинетика. – Ростов н/Д: Феникс, 2001.
4. Петров В. И. // Вестник ВолгГМУ. – 2011. – № 2. – С. 3–8.
5. Tyurenkov I. N., Perfilova V. N., Smirnova L. A., et al. / Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2010. – № 44 (12). – P. 702–704.