
ФАРМАКОЛОГИЯ, ТОКСИКОЛОГИЯ

*К. А. Кузнецов, Л. А. Смирнова, О. В. Магницкая, А. Ф. Рябуха,
Е. А. Сучков, Б. Е. Толкачев*

Волгоградский государственный медицинский университет,
лаборатория фармакокинетики НИИ фармакологии

ПРИМЕНЕНИЕ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ ДЛЯ ПРОБОПОДГОТОВКИ ПРИ АНАЛИЗЕ ИВАБРАДИНА В БИОПРОБЕ

УДК 615.224

Была разработана методика пробоподготовки с использованием твердофазной экстракции для количественного определения ивабрадина и его метаболита с использованием внутреннего стандарта.

Ключевые слова: твердофазная экстракция, ивабрадин, домперидон.

*К. А. Kuznetsov, L. A. Smirnova, O. V. Magnitskaya, A. F. Riabuha,
E. A. Suchkov, B. E. Tolkachev*

SOLID-PHASE EXTRACTION IN SAMPLE PREPARATION FOR ANALYSIS OF IVABRADINE IN BIOLOGICAL PROBES

The authors discuss a technique of sample preparation method using solid-phase extraction for quantitative determination of ivabradine and its metabolite with internal standard.

Key words: Solid-phase extraction, ivabradine, domperidone.

При анализе фармакокинетических параметров лекарственных средств встает вопрос определения концентраций лекарственного препарата в плазме крови и других биологических пробах.

Наиболее эффективным и чувствительным методом для данной цели в настоящее время является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Данный метод позволяет определять концентрации практически всех экзогенных и эндогенных субстанций в биологических образцах в минимальных концентрациях. Существует большое количество разнообразных типов хроматографических детекторов – ультрафиолетовый, флуоресцентный, электрокондуктометрический, масс-спектрометрический и т. д., что позволяет подбирать оптимальные условия для каждого соединения.

Но одной из проблем данного метода является влияние чистоты пробы на уровень количественного и качественного определения химического соединения, поскольку наличие посторонних соединений и примесей негативно влияет на возможность точной идентификации

каждого соединения на хроматограмме, а также способно снизить чувствительность метода из-за слияния пиков на конечной хроматограмме. Особенно это является актуальным для биологических проб, так как они содержат большое количество как эндогенных, так и экзогенных соединений.

В связи с этим большую важность приобретает проблема очистки биологических проб перед определением в них искомого вещества или группы веществ.

Для очистки биологической пробы от посторонних примесей разработано и существует множество различных методик – экстракция (как жидкостная, так и твердофазная), осаждение посторонних примесей, дериватизация определяемого соединения и т. д. Но необходимо также учитывать, что концентрация определяемого соединения может быть ниже порога определения, что приведет к невозможности его идентификации даже при условии тщательной очистки пробы. Поэтому пробоподготовка в большинстве случаев включает в себя этап концентрирования для повышения чувствительности методики.

При концентрировании образца необходимо добиться таких условий, чтобы метод был воспроизводим и позволял определять данное вещество количественно.

Поэтому наиболее оптимальным методом представляется экстракция на твердом сорбенте, так как он позволяет, с одной стороны, очистить пробу от посторонних примесей, и, с другой – сконцентрировать определяемое вещество до необходимой концентрации выше порога определения.

В данном исследовании мы разрабатывали метод пробоподготовки лекарственного препарата «Ивабрадина» в моче и плазме крови. Ивабрадин является представителем нового класса лекарственных кардиотропных препаратов – ингибиторов f-каналов, но в связи с наличием у него некоторого количества побочных эффектов, а также возможного его влияния на систему цитохрома P-450 3A4 представляется необходимым контролировать его метаболизм, в частности, концентрацию ивабрадина и его метаболита в биологических жидкостях.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Подобрать оптимальные условия извлечения ивабрадина, его метаболита и внутреннего стандарта, необходимого для количественного определения ивабрадина из биологических жидкостей – крови и мочи.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовались стандарт ивабрадина (производства компании Servier, France), стандарт метаболита ивабрадина – N-деметил-ивабрадин (Toronto Research Chemicals, Canada). В качестве внутреннего стандарта использовалась субстанция домперидона (Toronto Research Chemicals, Canada).

Количественное определение проводили на хроматографе Shimadzu LC-20AD с флуоресцентным детектором Shimadzu RF-10Ax1.

Для концентрирования исследуемых соединений использовался манифолд Isolute VacMaster и картриджи для концентрирования Isolute SPE-CN 1 ml, Isolute SPE-C18 1 ml.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения оптимальных условий пробоподготовки были опробованы различные варианты концентрирования биопроб: использование картриджей с различной привитой фазой (-C18 и -CN), различные варианты смыва с картриджем (метанол и ацетонитрил порциями различного объема), вариация значений pH (нейтральная и щелочная фазы), а также концентрирование при помощи упаривания.

В результате проведенного исследования было установлено, что наиболее оптимальным является использование картриджей с привитой -CN-фазой, которые показывают лучшие результаты по сравнению с -C18. В качестве пробы использовалось 1 мл плазмы, отцентрифугированной при 3 тыс. об./мин в течение 15 минут. После нанесения пробы на картридж в дальнейшем производился смыв пробы метанолом объемом 3 мл, после чего метанол упаривался под вакуумом при помощи водоструйного насоса. Получившийся сухой остаток при этом растворялся в 100 мкл метанола, и получившийся раствор наносился на хроматографическую колонку.

При данных условиях достигалась максимальная степень извлечения всех необходимых веществ – ивабрадина, его метаболита и внутреннего стандарта – домперидона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, для пробоподготовки изучаемых соединений разработан метод твердофазной экстракции с использованием картриджей с привитой -CN-фазой с последующим упариванием.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоусов Ю. Б. Клиническая фармакокинетика. – М.: Литтерра, 2005. – 228 с.
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. – 384 с.