

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО
СОЕДИНЕНИЯ, ПРОИЗВОДНОГО
3-ГИДРОКСИ-3-ПИРРОЛИН-2-ОНА, В ПЛАЗМЕ КРОВИ
МЕТОДОМ ТАНДЕМНОЙ
ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

Е. А. Булгакова, Ю. Н. Карпенко, Т. И. Ярыгина

ФГБОУ ВО Пермская государственная фармацевтическая академия Минздрава России
Поступила в редакцию 08.09.2016 г.

Аннотация. Работа посвящена выбору условий хроматомасс-спектрометрического определения нового биологически активного соединения КОН-1 в плазме крови для изучения его фармакокинетики. В процессе эксперимента были выбраны оптимальные условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования, проведена валидация биоаналитической методики в соответствии с современными требованиями.

Ключевые слова: ноотропы, биоаналитическая методика, ВЭЖХ-МС/МС, валидация, фармакокинетика.

Abstract. The work is devoted to the selection of conditions of chromatography-mass spectrometry determination of a new biologically active compound of KON-1 in the blood plasma to study its pharmacokinetics. In the course of the experiment the optimal conditions of chromatographic separation and mass spectrometric detection were chosen, validation of bioanalytical methods carried out in accordance with modern requirements.

Keywords: nootropics, bioanalytical method, HPLC-MS/MS, validation, pharmacokinetics.

Биологически активное соединение КОН-1, производное 3-гидрокси-3-пирролин-2-она (рис.1), синтезировано в Пермской государственной фармацевтической академии под руководством профессора Гейна В.Л. Соединение показало выраженное антиамнестическое действие и в настоящее время находится на стадии доклинических исследований в качестве ноотропного средства [1]. Необходимым этапом доклинического изучения потенциального лекарственного препарата является исследование его фармакокинетики. В связи с этим возникает необходимость в разработке высокочувствительных методик определения КОН-1 в биологических субстратах.

На сегодняшний день для количественного определения лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах при проведении фармакокинетических исследований, лекарственном терапевтическом мониторинге, исследованиях биоэквивалентности широкое применение находят «гибридные» методы, сочетающие хроматографические методы разделения и масс-спектрометрическое детектирование. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в данном случае является предпочтительным, поскольку позволяет анализировать нелетучие и термолabile вещества [2, 3]. В настоящей работе представлены результаты эксперимента по разработке методики определения КОН-1 в плазме крови методом жидкостной тандемной хроматомасс-спектрометрии.

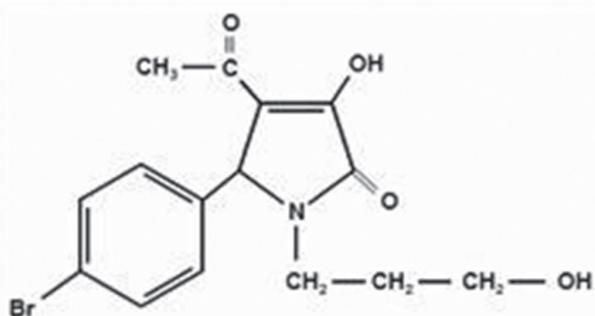


Рис. 1. Структурная формула КОН-1

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты.

В работе использовали субстанции КОН-1 и фенотропила, соответствующие требованиям нормативной документации [4, 5], а также следующие реагенты: ацетонитрил (HPLC grade, Merck), метанол (HPLC grade, Merck), хлороформ (ГФ XIII, Том 1, Реактивы ОФС 1.3.0001-15), н-бутанол (ГФ XIII, Том 1, Реактивы ОФС 1.3.0001-15). Вода для приготовления элюентов была получена с помощью системы очистки воды Simplicity UV (Millipore, Merck).

Приготовление стандартных растворов.

Исходный раствор КОН-1 (1 мг/мл) готовили растворением навески субстанции в метаноле. Рабочие растворы КОН-1 с необходимыми концентрациями получали путем разведения исходного раствора водой. Калибровочные стандарты и контрольные образцы КОН-1 для проведения валидационной оценки разработанной методики готовили из рабочих растворов, добавляя их соответствующие количества в «бланковую» плазму.

Образцы «бланковой» и исследуемой плазмы хранили в сверхнизкотемпературном морозильном аппарате при температуре не выше -40°C . Стандартные растворы хранили в холодильнике при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$.

Оборудование.

Исследования проводили на жидкостном хроматомасс-спектрометре «LCMS - 8050» (Shimadzu) с масс-спектрометрическим детектором типа тройной квадруполь с двойным источником ионизации (электроспрей и химическая ионизация при атмосферном давлении). Разделение осуществляли на хроматографической колонке Luna 3uC18(2) 100A, $150 \times 3,0$ мм (Phenomenex). Масс-спектры получены с помощью ионизации электроспреем в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Напряжение на капилляре составляло 4000 В, температура источника – 300°C . Хроматограммы обрабатыва-

ли с использованием программного обеспечения «LabSolution» (версия 5.60 SP2).

Пробоподготовка образцов плазмы.

Извлечение КОН-1 из плазмы крови осуществляли по ранее разработанной методике путем жидкость-жидкостной экстракции [6]. Для этого 1 мл плазмы крови помещали в пробирку типа Эппендорф, добавляли 0.5 мл воды, 100 мкл раствора внутреннего стандарта (метанольного раствора фенотропила с концентрацией 100 мкг/мл), 50 мкл раствора кислоты хлористоводородной и 0.5 мл смеси хлороформ-бутанол (9:1). Пробирку встряхивали на лабораторном шейкере в течение 2 минут. Образовавшуюся эмульсию разрушали путем центрифугирования при 13000 об/мин в течение 5 мин. Органический слой переносили в хроматографическую вials, сухой остаток после удаления экстрагента в токе теплого воздуха растворяли в 500 мкл метанола. 1 мкл раствора вводили в инжектор хроматографа.

Валидация методики.

Валидацию разработанной методики проводили в соответствии с современными требованиями, предъявляемыми к биоаналитическим методикам, по показателям специфичность, линейность, нижний предел количественного определения, точность, прецизионность [7, 8, 9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

На этапе выбора оптимального состава подвижной фазы были апробированы стандартные для ВЭЖХ-МС водно-ацетонитрильные и водно-метанольные смеси с добавлением муравьиной кислоты или ацетатного буферного раствора. Однако, при использовании «кислых» элюентов форма хроматографического пика КОН-1 была крайне неудовлетворительной и характеризовалась сильно затянутым задним фронтом. Переход на градиентное элюирование принципиально ситуацию не улучшил. Удовлетворительной формы пика исследуемого соединения удалось достигнуть, используя подвижную фазу ацетонитрил – вода в условиях градиента, при линейном возрастании доли ацетонитрила в элюенте от 20 % до 50% за 7 минут.

В процессе разработки условий детектирования был получен масс-спектр стандартного раствора КОН-1 с концентрацией 1 мкг/мл в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Масс-спектр содержит интенсивный пик иона с m/z 354, соответствующий протонированной молекуле соединения (рис.2).

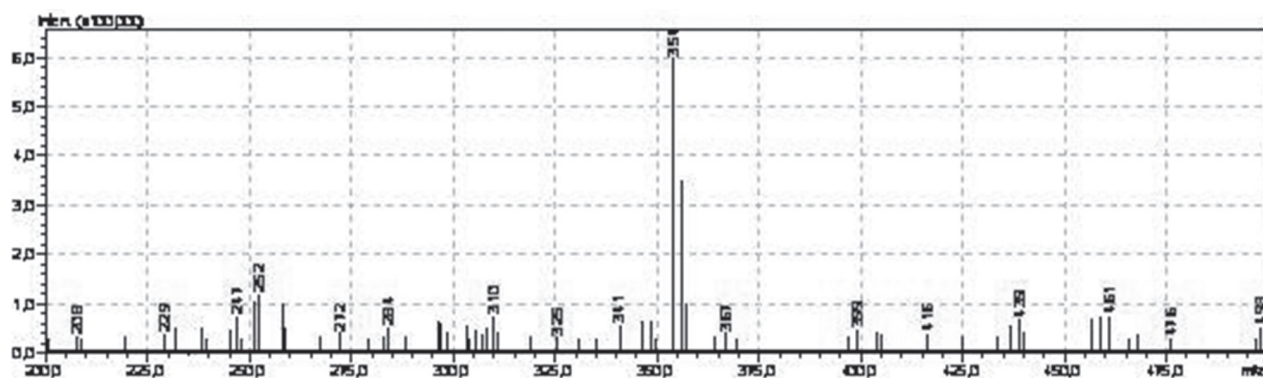


Рис. 2. МС – спектр КОН-1

Для выбора оптимальных ионных переходов были сняты масс-спектры в режиме Product Ion Scan при сканировании на третьем квадруполе масс-анализатора (рис. 3).

Наиболее интенсивными фрагментными ионами оказались ионы с массовыми числами (m/z) 209 и 181. С помощью опции автоматической оптимизации прибора были оптимизированы энергии соударений (collision energy) для ионных переходов $354 \rightarrow 209$ и $354 \rightarrow 181$. Энергия соударений (CE) для данных переходов составила –28 эВ и –39 эВ соответственно.

В количественном анализе лекарственных веществ в биологических объектах при проведении биоаналитических исследований используется принцип расчета концентрации, основанный на использовании внутреннего стандарта (IS). В качестве вещества – внутреннего стандарта нами выбран фенотропил, который имеет сходное с КОН-1 химическое строение. Фенотропил в выбранных хроматографических условиях элюируется в виде симметричного пика со временем удерживания, близким ко времени удерживания КОН-1, и эффективно извлекается совместно с КОН-1 из плазмы крови при использовании жидкость-жидкостной экстракции.

Таким образом, нами предложены следующие условия ВЭЖХ-МС/МС - анализа биологически

активного вещества КОН-1 в извлечениях из плазмы крови:

- хроматографическая колонка: Luna 3uC18(2) 100A, 150 *3,0 мм (Phenomenex);
- подвижная фаза: ацетонитрил – вода;
- режим элюирования: градиентный (линейное возрастание доли ацетонитрила 20 % до 50% за 7 минут);
- скорость потока элюента – 300 мкл/мин;
- температура колонки: 40°C;
- объем вводимой пробы: 1 мкл.

Условия масс-спектрометрического детектирования:

- ионизация: электроспрей;
- напряжение в источнике ионизации: 4000 V;
- поток газа-распылителя: 3 L/min;
- поток нагревающего газа: 10 L/min;
- поток осушающего газа: 10 L/min;
- температура интерфейса: 300 °C.

Детектирование образующихся ионов осуществляли в режиме регистрации положительных ионов с использованием ионных переходов m/z $354 \rightarrow 209$ и $354 \rightarrow 181$ (для КОН-1) и $218 \rightarrow 174$ (для фенотропила).

Валидация методики.

При оценке селективности предлагаемой биоаналитической методики были проанализи-

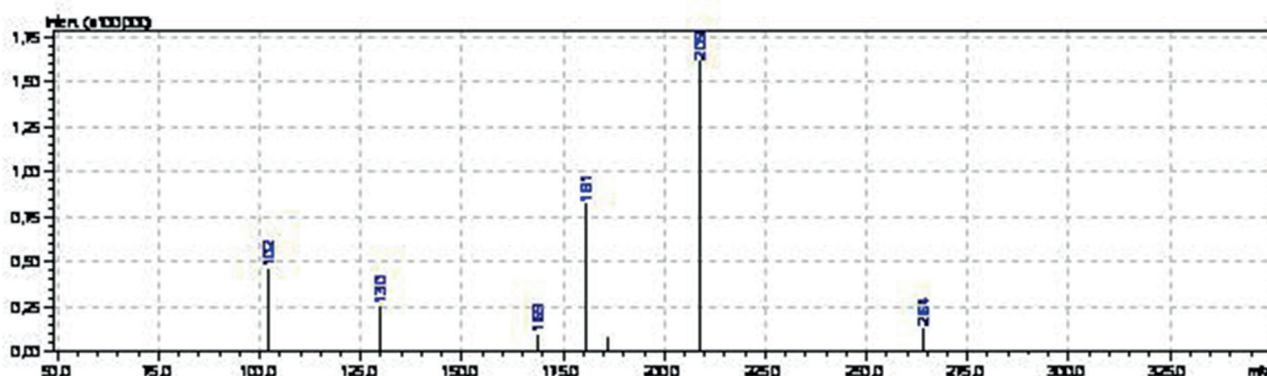


Рис. 3. МС/МС-спектр фрагментных ионов КОН-1

рованы извлечения из интактной плазмы (рис.4), а также модельных образцов плазмы с известным содержанием КОН-1 (рис.5). На хроматограммах

экстрактов интактной плазмы отсутствовали пики, совпадающие по времени удерживания с пиками анализируемого вещества и внутреннего стандарта.

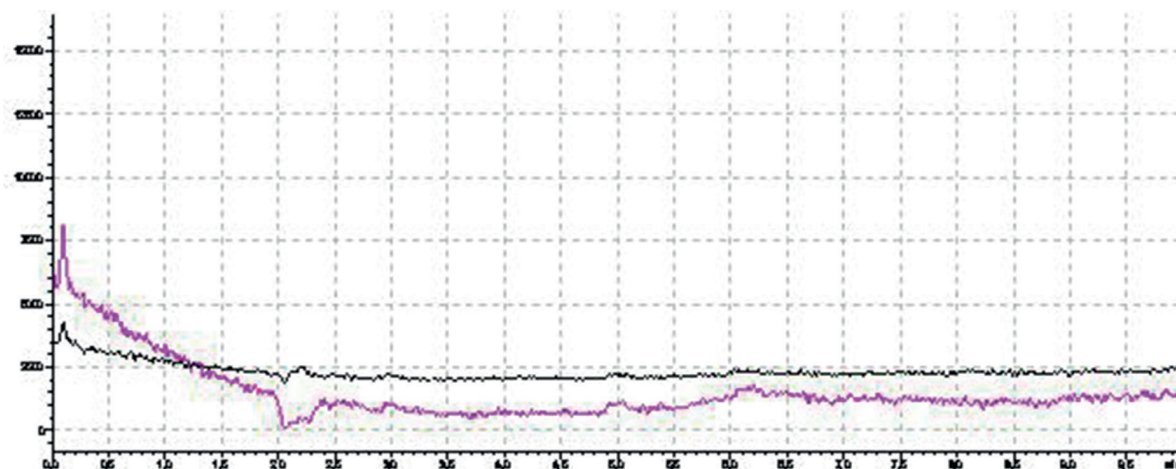


Рис. 4. Хроматограмма экстракта интактной плазмы

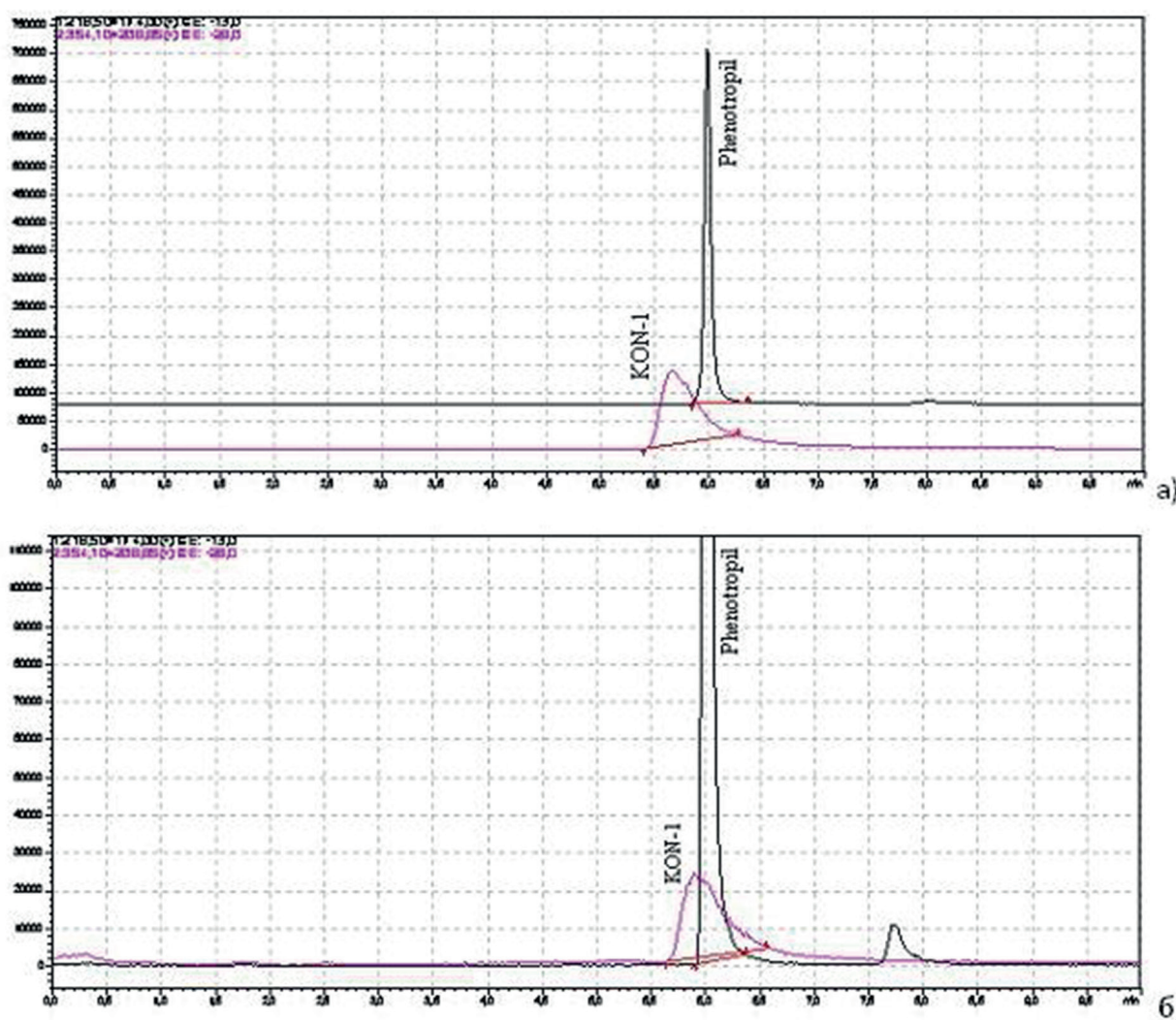


Рис. 5. Хроматограммы извлечений из модельных образцов плазмы крови а) концентрация КОН-1 в модельной смеси (500 нг/мл) б) концентрация КОН-1 в модельной смеси на уровне ПКО (40 нг/мл)

Для установления линейности методики были проанализированы 9 модельных образцов плазмы с содержанием КОН-1 в диапазоне от 43 до 9200 нг/мл. Градуировочный график представлен на рис. 6. Коэффициент корреляции R^2 составил 0.9986041, что свидетельствует о линейности методики в указанном диапазоне концентраций. Отклонения концентраций калибровочных стандартов, рассчитанных по уравнению линейной зависимости ($Y=1.69328X$; где Y – соотношение площадей, X - концентрация), от фактических значений представлены в таблице 1.

Для оценки методики по показателям «Прецизионность» и «Правильность» готовили по 6 модельных биообразцов (образцов контроля качества) на 5 уровнях концентраций КОН-1: 36; 110; 530; 1230; 3680; 6690 нг/мл. Подготовку образцов

для анализа осуществляли в соответствии с описанной методикой. Прецизионность и правильность методики оценивалась по величинам относительного стандартного отклонения (RSD,%) и относительной погрешности (ϵ , %), соответственно. Метрологические характеристики методики представлены в таблице 2.

Полученные результаты контроля не превышают 15%, допускаемых для биоаналитических методик, что свидетельствует об отсутствии значимых систематических ошибок в результатах анализа.

Таким образом, разработана экспрессная, высокочувствительная методика количественного определения КОН-1 в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС и проведена ее оценка по основным валидационным параметрам.

Таблица 1

Отклонения концентраций калибровочных стандартов от фактических значений

С _{факт.}	43	130	263	526	1050	2630	5260	7360	9200
С _{рассчит.}	48	119	237	489,5	995	2687	5515	7262	9148
ϵ , %	10.4	-9.2	-10.9	-7.5	-5.5	2.1	4.6	-1.3	-0.6
Норма	Не более 20%								

Таблица 2

Прецизионность и правильность методики определения КОН-1 в плазме крови методом ВЭЖХ МС/МС

Концентрация КОН-1 в модельной смеси, нг/мл	$\bar{X}$ (n = 6)	SD	RSD, %	ϵ , %
36	38	3.69	9.67	5.3
110	102	11.07	10.86	-7.8
530	520	73.6	14.14	-1.9
1230	1192	87.9	7.38	-3.1
3680	3509	275.0	7.84	-4.8
6690	6663	689.4	10.35	-0.4

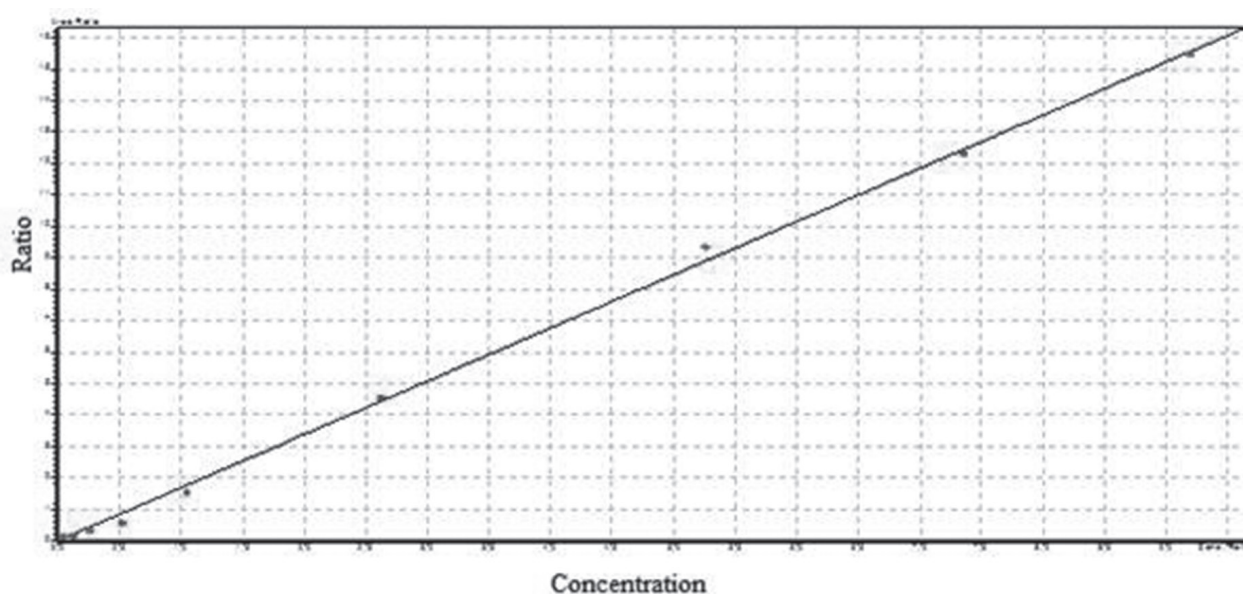


Рис. 6. Градуировочный график количественного определения КОН-1 в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС

Предложенная методика была использована при проведении доклинических фармакокинетических исследований биологически активного соединения КОН-1 на лабораторных животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шуклина Н.С. Поиск соединений, обладающих ноотропной активностью, в ряду 3-пирролин-2-онов: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 14.00.25 / Шуклина Наталья Сергеевна. — Пермь, 2001. — 21 с.
2. ВЭЖХ и СВЭЖХ как методы определения лекарственных веществ в крови (обзор) / Ю.В. Медведев [и др.] // Хим. — фарм. журнал, 2003. — Т. 47, № 4. — С. 45-51.
3. Рейхарт Д.В. Анализ лекарственных средств при фармакокинетических исследованиях / Д.В. Рейхарт, В.В. Чистяков // Казанский медицинский журнал, 2010. — Т. 91, № 4. — С. 532-536.
4. Разработка методов оценки качества субстанции нового биологически активного соединения КОН-1 / О.Н. Кляшева [и др.] // Фармация. — 2012. — № 5. — С. 8-10.

5. ФСП 42-0348-4414-03 Фенотропил.
6. Булгакова Е.А. Разработка методики изолирования биологически активного производного 3-гидрокси-3-пирролин-2-она из плазмы крови методом жидкость-жидкостной экстракции / Е.А. Булгакова, Ю.Н. Карпенко // «Инновационные технологии в фармации». Мат. Всероссийской научно-методической конференции с международным участием, посвященной 70-летию Победы в Великой Отечественной войне. — Иркутск, 2015. — С. 96-98.
7. Руководство по экспертизе лекарственных средств / А.Н. Миронов [и др.]. — М.: Гриф и К, 2013. — Том 1. — 328 с.
8. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation / U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office. — Washington, DC, 2001. — 25 p.
9. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft) / European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. — London, 2009. — 23 p.

Пермская государственная фармацевтическая академия

Булгакова Е.А., аспирант кафедры токсикологической химии

E-mail: bulgakova_pfa@mail.ru

Карпенко Ю.Н., к.ф.н., доцент кафедры токсикологической химии

E-mail: karpenko_pfa@mail.ru

Ярыгина Т.И., д.ф.н., профессор кафедры фармацевтической химии факультета очного обучения

Perm State Pharmaceutical Academy

Bulgakova E.A., post-graduate student of the toxicological chemistry department

E-mail: bulgakova_pfa@mail.ru

Karpenko Y.N. PhD, associate professor of the toxicological chemistry department

E-mail: karpenko_pfa@mail.ru

Yarigina T.I., Full Professor, PhD, Dsci of pharmaceutical department