

УДК 547.743.1:615.033.1:543.544.5

Е.А. Булгакова

ассистент кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России

Ю.Н. Карпенко

канд. фармацевт. наук, доцент кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России, заместитель директора по науке ООО «Парма Клиника»

E.A. Bulgakova

Assistant of the Department of Toxicological Chemistry, Perm State Pharmaceutical Academy

Yu.N. Karpenko

PhD, Associate Professor of the Department of Toxicological Chemistry, Perm State Pharmaceutical Academy, Deputy Director for Science LLC "Parma Clinical"

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО СОЕДИНЕНИЯ КОН-1 В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МИНИМАЛЬНОЙ ПРОБОПОДГОТОВКОЙ: РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ДОКЛИНИЧЕСКИХ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ
DETERMINATION OF A BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUND OF KON-1 IN BLOOD PLASMA BY METHOD OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH MINIMUM SAMPLE PRETREATMENT PROCEDURE: DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD, USE IN PRE-CLINICAL PHARMACOKINETIC RESEARCHES

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Карпенко Юлия Николаевна, канд. фармацевт. наук, доцент кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России, заместитель директора по науке ООО «Парма Клиника»

Адрес: 614990, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2

Тел.: +7 (342) 282-58-64

Е-mail: karpenko_pfa@mail.ru

Статья поступила в редакцию: 25.12.2017

Статья принята к печати: 15.02.2018

CONTACT INFORMATION

Karpenko Yuliya, PhD, Associate Professor of the Department of Toxicological Chemistry, Perm State Pharmaceutical Academy, Deputy Director for Science LLC "Parma Clinical"

Address: 2, Polevaya st., Perm, 614990, Russia

Tel.: +7 (342) 282-58-64

E-mail: karpenko_pfa@mail.ru

Article received: December 25, 2017

Article approved for publication: February 15, 2018

Аннотация

Целью настоящего исследования явилась разработка и валидация методики определения биологически активного соединения КОН-1 с доказанной ноотропной активностью в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ). Предложена простая, экспрессная и нетрудоемкая процедура пробоподготовки плазмы к хроматографическому исследованию, обеспечивающая высокий процент извлечения анализа из биообъекта (более 80 %). В разработанных условиях нижний предел количественного определения КОН-1 в плазме составил 35 нг/мл. Оцененная в результате валидации прецизионность методики не превышала 7 %, границы правильности методики составили 93,5–112,8 %. Разработанная биоаналитическая методика апробирована на образцах крови лабораторных животных и человека и использована в доклинических фармакокинетических исследованиях.

Abstract

The aim of this work was the development and validation of methods for determination of a biologically active compound KON-1 with proven nootropic activity in blood plasma by high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detection (HPLC-UV). A simple, rapid and unlabourious procedure was proposed for sample preparation of plasma for chromatographic analysis, which ensures a high percentage of analyte extraction from the bioobject (more than 80 %). Under the developed conditions, the lower limit of the quantitative determination of KON-1 in plasma was 35 ng/ml. The precision of the method estimated by validation did not exceed 7 %, the accuracy of the method was within 93.5–112.8 %. The developed bioanalytical technique was tested on blood samples of laboratory animals and humans and used in preclinical pharmacokinetic studies.

Ключевые слова: КОН-1, высокоэффективная жидкостная хроматография, валидация, фармакокинетические исследования.

Keywords: KON-1, high-performance liquid chromatography, validation, pharmacokinetic studies.

ВВЕДЕНИЕ

Биологически активное соединение КОН-1 (рис. 1) с выраженной ноотропной активностью из группы 3-гидрокси-3-пирролин-2-она, синтезированное в Пермской государственной фармацевтической академии под руководством Гейна В.Л., находится на стадии доклинических исследований [1]. Неотъемлемой частью данных испытаний является всестороннее исследование фармакокинетики потенциального лекарственного препарата на животных [2].

Проведение доклинических фармакокинетических исследований требует разработки высокочувствительных методик определения исследуемых веществ в биологических жидкостях и тканях лабораторных животных. Наиболее адекватным методом анализа лекарственных веществ и других биологически активных соединений в биологических субстратах является высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым и масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС) [3]. Так, ранее нами была разработана методика определения КОН-1 в моче лабораторных животных методом ВЭЖХ-УФ на основе изократического элюирования с использованием подвижной фазы ацетонитрил — фосфатный буфер с pH 7 [4]. В литературе описаны условия хроматомасс-спектрометрического определения ряда пирролидоновых ноотропов (рацетамов), таких как пирацетам, анирацетам, оксирацетам, в плазме крови человека и животных. Следует отметить, что при использовании метода ВЭЖХ-МС/МС в анализе сложных биологических матриц очень важным этапом является пробоподготовка образца. Наиболее простым и экспрессным способом пробопод-

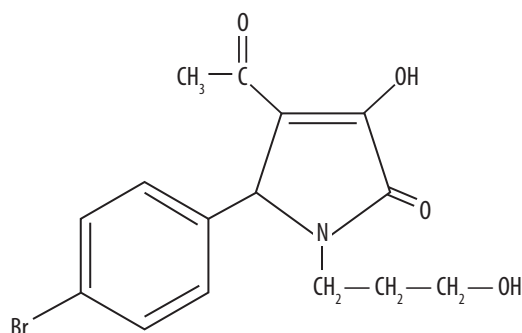


РИС. 1. Структурная формула КОН-1 (4-ацетил-5-(4-бромфенил)-3-гидрокси-1-(3-гидроксипропил)-3-пирролин-2-он)

готовки является осаждение белков плазмы крови с помощью различных денатурирующих агентов. Однако данный вариант не всегда дает положительный результат, поскольку недостаточная очистка извлечения от эндогенных веществ может осложнить масс-спектрометрическое определение [5]. Так, при разработке методики ВЭЖХ-МС/МС определения КОН-1 в плазме было установлено, что эндогенные вещества, присутствующие в извлечении после преципитации белков, сильно влияют на ионизацию вещества, что сказывается снижением отклика масс-селективного детектора. Поэтому в качестве способа изолирования КОН-1 из плазмы была предложена достаточно длительная и трудоемкая процедура жидкость-жидкостной экстракции, предполагающая более тщательную очистку экстракта по сравнению с простым осаждением [6].

Однако изучение фармакокинетики вещества требует анализа большого количества биологических проб, поэтому вопрос экспрессности применяемых методик остается актуальным. УФ-детектирование в жидкостной хроматографии, в отличие от масс-спектрометрического, менее чувствительно к влиянию эндогенных соединений плазмы при условии их хорошего хроматографического разделения с аналитом. Поэтому в данном случае пробоподготовка плазмы к хроматографическому исследованию с использованием простой преципитации белков вполне уместна. Ранее проведенные исследования показали эффективность использования метанола в качестве осаждающего агента при извлечении КОН-1 из модельных образцов плазмы. Степень экстракции КОН-1 составила более 90 % [7].

Цель настоящего исследования — разработка и валидация методики определения биологически активного соединения КОН-1 в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) с минимальной пробоподготовкой путем простого осаждения белков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовали субстанцию КОН-1, синтезированную в ПГФА и соответствующую требованиям проекта ФСП [8], субстанцию фенотропила (ФСП 42-0348-4414-03), а также следующие реагенты: ацетонитрил (HPLC grade, Merck), метанол (Fischer Chemical); фосфатный буферный

раствор pH 7 (ГФ XIII). Вода для приготовления элюентов была получена с помощью системы очистки воды Simplicity UV (Millipore, Merck).

Методика пробоподготовки плазмы крови. 250 мкл модельной смеси помещали в пробирку типа Эппендорф, добавляли 100 мкл внутреннего стандарта (раствор фенотропила, 20 мкг/мл) и 500 мкл метанола. Пробирки встряхивали на лабораторном шейкере при 1500 об./мин в течение 5 мин и центрифугировали 5 мин при 10 000 об./мин. Надосадочную жидкость фильтровали через мембранный шприцевой нейлоновый фильтр фирмы Agilent Technologies (США) с размером пор 0,45 мкм и исследовали методом ВЭЖХ [7].

Анализ проводили на жидкостном хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором. Разделение анализируемых компонентов осуществляли на хроматографической колонке Luna 5u C18(2) 100A (250 × 4,6 мм, Phenomenex) при 40 °С. Подвижная фаза представляла собой смесь ацетонитрила и фосфатного буфера (pH 7) в соотношении 25 : 75. Скорость потока элюента — 1 мл/мин. Длина волны детектирования — 324 нм. Объем вводимой пробы — 10 мкл.

Разработку и валидацию биоаналитической методики проводили с использованием модельных смесей плазмы. При определении селективности методики использовали плазму крови человека, а также образцы плазмы, полученные от белых нелинейных крыс и кроликов породы шиншилла.

Калибровочные стандарты для исследования линейности готовили путем добавления соответствующих стандартных растворов КОН-1 к плазме человеческой крови до получения концентраций от 36 до 9400 нг/мл. При оценке таких валидационных параметров, как правильность, прецизионность и степень извлечения, были приготовлены образцы контро-

ля качества с содержанием аналита на уровне НПКО (нижний предел количественного определения), тройного НПКО, уровне средних (около 50 % диапазона калибровочной кривой) и высоких (более 75 % диапазона калибровочной кривой) концентраций.

Валидация биоаналитической методики осуществлялась согласно действующим руководствам МЗ РФ, Европейского медицинского агентства (ЕМА) и управления по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов (FDA) [9, 10].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Хроматографическое разделение. Необходимость извлечения аналита из сложной биологической матрицы при фармакокинетических исследованиях влечет за собой неизбежные потери вещества, что в итоге сказывается на результатах количественного определения. Для повышения точности результатов в аналитической практике при работе со сложными образцами используют вещество — внутренний стандарт, который добавляется во все контрольные и анализируемые пробы в одинаковом количестве.

В качестве внутреннего стандарта нами был апробирован фенотропил (N-карбамоилметил-4-фенил-2-пирролидон), который по химической структуре сходен с КОН-1. Установлено, что элюирование в изократическом режиме с использованием подвижной фазы ацетонитрил — фосфатный буфер с pH 7 (25 : 75) позволяет четко разделить хроматографические пики КОН-1 и внутреннего стандарта фенотропила от эндогенных веществ плазмы (рис. 2). Двухволновое детектирование при 210 нм и 324 нм, соответствующее максимумам поглощения КОН-1 и фенотропила в подвижной фазе, обеспечивает

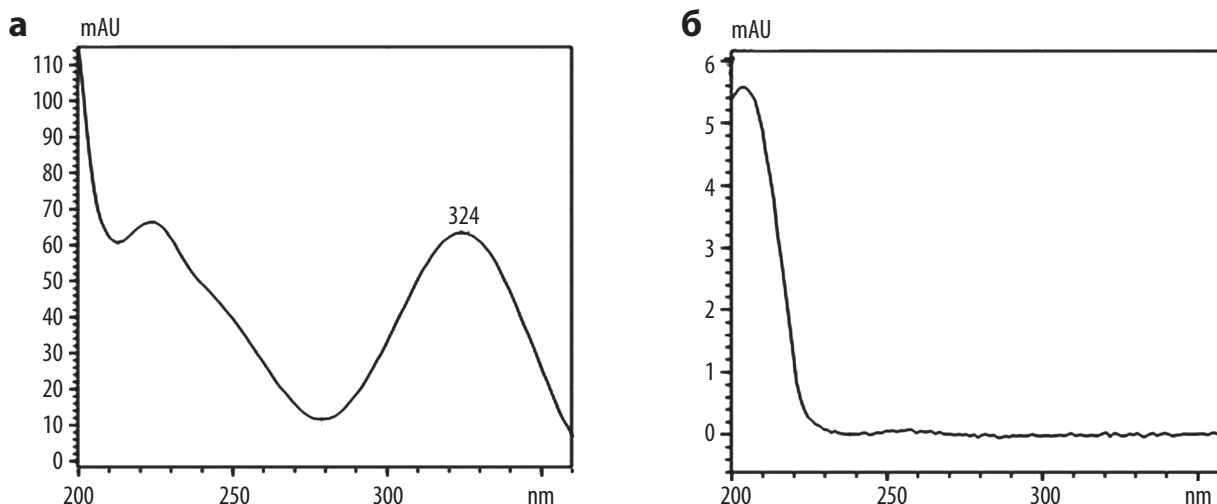


РИС. 2. УФ-спектры КОН-1 (а) и фенотропила (б) в подвижной фазе

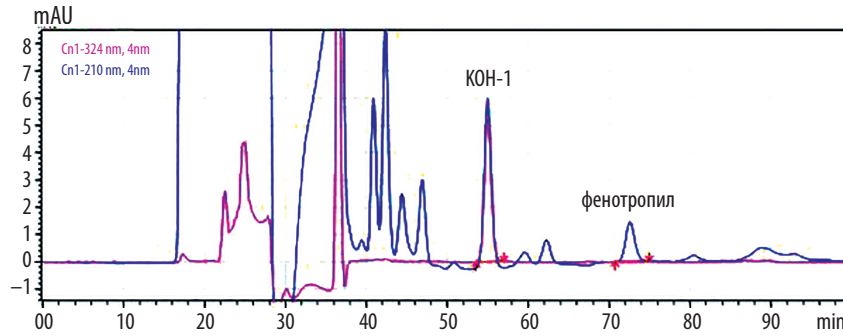


РИС. 3. Хроматограмма извлечения из модельной смеси плазмы крови (концентрация КОН-1 — 5 мкг/мл, фенотропила — 8 мкг/мл)

Таблица 1

Степень извлечения КОН-1 и фенотропила из модельных смесей

Концентрация КОН-1 в модельной смеси, нг/мл	Степень извлечения, % (X ± SD при n = 6)
120	92,10 ± 1,81
4706	96,07 ± 1,28
7530	96,87 ± 0,89
Концентрация фенотропила в модельной смеси, нг/мл	Степень извлечения, % (X ± SD при n = 6)
8000	79,27 ± 1,62

максимальную чувствительность методики (рис. 3). В предложенных условиях время удерживания КОН-1 составило 5,5 мин, фенотропила — 7,2 мин.

Степень извлечения КОН-1 и внутреннего стандарта фенотропила из плазмы крови с помощью предложенной методики пробоподготовки оценивали путем соотнесения площадей хроматографических пиков веществ, экстрагированных из биологических образцов, с площадями пиков, не экстрагированных стандартов, приготовленных в подвижной фазе. Изучение степени извлечения КОН-1 проводили на модельных смесях плазмы с содержанием вещества на 3 уровнях концентраций: 120, 4706, 7530 нг/мл. Извлечение фенотропила исследовали на модельной смеси плазмы с концентрацией анализа 8 мкг/мл. Результаты представлены в табл. 1.

Селективность. Анализ «холостых» образцов плазмы, полученных от человека и лабораторных животных, показал отсутствие интерферирующих пиков на временах удерживания КОН-1 и внутреннего стандарта фенотропила.

Линейность. Для установления линейности методики были проанализированы 10 образцов модельных смесей плазмы (калибровочных стандартов) с содержанием КОН-1 в диапазоне от 36 до 9400 нг/мл. Гра-

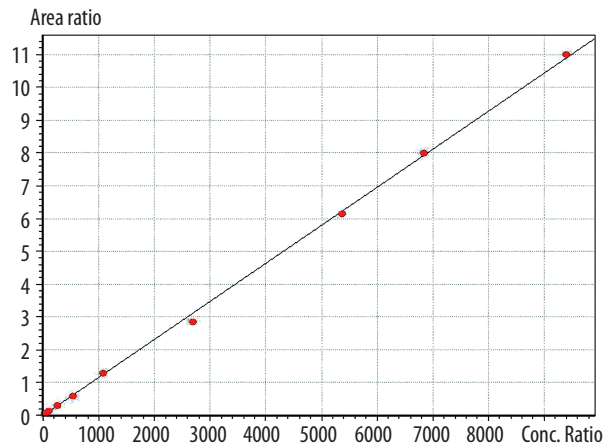


РИС. 4. Калибровочный график количественного определения КОН-1 в плазме крови методом ВЭЖХ

дуировочная зависимость описывалась уравнением: $Y = 0,00115952 \times C$ (где Y — соотношение пиков КОН-1 и фенотропила, C — концентрация КОН-1 в плазме). Коэффициент корреляции составил 0,9993658, что свидетельствует о линейности методики в указанном диапазоне концентраций. Калибровочный график представлен на рис. 4.

В ходе исследования линейности был осуществлен обратный перерасчет концентраций калибровочных стандартов с помощью полученного калибровочного графика. Полученные значения концентраций лежат в пределах ±15 % от номинальных, что соответствует предъявляемым требованиям (табл. 2).

Правильность и прецизионность методики количественного определения КОН-1 в плазме крови оценивались путем анализа образцов контроля качества (модельных смесей) с концентрацией КОН-1: 39, 120, 4706 и 7530 нг/мл. Каждый образец анализировался в 6 повторностях. Приведенные в табл. 3 значения коэффициента вариации (CV, %) и относительной величины систематической ошибки погрешности (δ, %) не превышают 15 %, рекомендуемых для биоаналитических методик.

Таблица 2

Отклонения концентраций калибровочных стандартов от фактических значений

C _{факт.}	36	54	108	270	540	1080	2690	5380	6840	9400
C _{рассчит.}	32,9	48,8	99,2	238	472	1070	2375	5125	6658	9163
ε, %	-8,6	-9,6	-8,1	-11,9	-12,6	-0,9	-11,7	-4,7	-2,7	-2,5

Таблица 3

Правильность и прецизионность методики количественного определения КОН-1 в плазме крови

Концентрация КОН-1 в модельной смеси, нг/мл	Рассчитанная концентрация, нг/мл \bar{x}	SD	CV, % (прецизионность)	δ, % (правильность)
39	39,61	2,60	6,57	1,6
120	135,36	6,47	4,78	12,8
4706	4399,71	151,59	3,45	-6,5
7530	7786,57	103,55	1,33	3,41

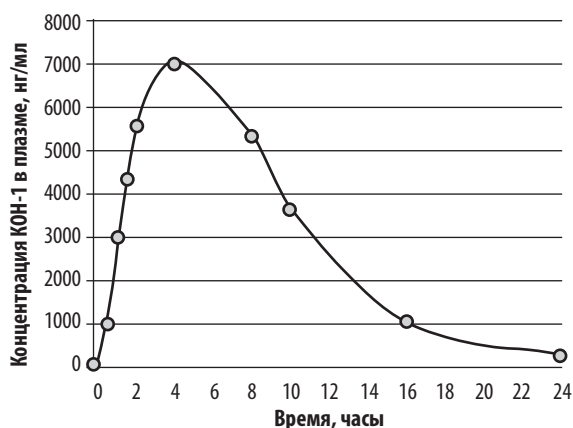


РИС. 5. Динамика изменения концентрации КОН-1 в плазме крови кроликов после однократного перорального введения

Использование в доклинических исследованиях. Разработанная методика была использована при изучении фармакокинетики КОН-1 у лабораторных животных (кроликов) после перорального введения субстанции в дозе 100 мг/кг. Кровь отбирали через дискретные интервалы времени (0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0; 8,0; 10,0; 16,0; 24,0 ч) из ушной вены. Динамика изменения концентрации КОН-1 в плазме крови кроликов представлена на рис. 5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная методика определения биологически активного соединения КОН-1 в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной

хроматографии с УФ-детектированием, включающая осаждение белка в качестве пробоподготовки биообразца, проста и эффективна. Результаты валидационной оценки демонстрируют удовлетворительные для биоаналитических методик показатели селективности, линейности, правильности, прецизионности и эффективности извлечения аналита. Данная методика была успешно использована в доклинических фармакокинетических исследованиях КОН-1 на лабораторных животных.

Финансирование. Работа не имеет финансовой поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Шуклина Н.С., Колла В.Э. Антиамнестическое действие производных ряда 3-гидрокси-3-пирролин-2-она. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2003; 66(6): 12–15.
[Shuklina N.S., Kolla V.E. Antiamnestic effect of the derivatives of 3-hydroxy-3-pyrrolin-2-one series. Experimental and clinical pharmacology. 2003; 66(6): 12–15. (In Russian)]
2. Борисова Е.О. Основы фармакокинетики лекарственных средств: справочник поликлинического врача. 2014; 6: 44–51.
[Borisova E.O. Fundamentals of pharmacokinetics of medicines: spravochnik poliklinicheskogo vracha (A polyclinic doctor's guide). 2014; 6: 44–51. (In Russian)]
3. Медведев Ю.В., Раменская Г.В., Шохин И.Е. и др. Разработка и валидация методики определения тенофовира в плазме крови кроликов. Сеченовский вестник. 2011; 3(5)–4(6): 24–30.
[Medvedev Yu.V., Ramenskaya G.V., Shokhin I.E., et al. Development and validation of the procedure for the determination of tenofovir in the blood plasma of rabbits. Sechenovskiy vestnik. 2011; 3(5)–4(6): 24–30. (In Russian)]
4. Булгакова Е.А., Карпенко Ю.Н., Ярыгина Т.И. Определение производного 3-гидрокси-3-пирролин-2-она в моче и изучение его экскреции из организма лабораторных животных. Фармация и фармакология. 2017; 5(4): 331–343.
[Bulgakova E.A., Karpenko Yu.N., Yarygina T.I. Determination of 3-hydroxy-3-pyrroline-2-one in urine and study of its excretion from the organism of laboratory animals. Pharmacy and Pharmacology. 2017; 5(4): 331–343. (In Russian)]
5. Bakhtiar R., Majumdar T. Tracking problems and possible solutions in the quantitative determination of small molecule drugs and metabolites in biological fluids using liquid chromatography-mass spectrometry. J. Pharmacol. Toxicol. Methods. 2007; 55(3): 262–278.
6. Булгакова Е.А., Карпенко Ю.Н., Ярыгина Т.И. Разработка методики количественного определения биологически

активного соединения, производного 3-гидрокси-3-пирролин-2-она, в плазме крови методом тандемной хроматомасс-спектрометрии. Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2017; 2: 106–111.

[*Bulgakova E.A., Karpenko Yu.N., Yarygina T.I.* Development of the method of quantitative determination of a biologically active compound derivatives of 3-hydroxy-3-pyrrolin-2-one, in blood plasma by method of tandem mass spectrometry. Bulletin of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy. 2017; 2: 106–111. (In Russian)]

7. *Булгакова Е.А., Карпенко Ю.Н., Ярыгина Т.И.* Выбор способа пробоподготовки плазмы крови для хроматографического определения биологически активного соединения КОН-1. Создание конкурентоспособных лекарственных средств — приоритетное направление инновационного развития фармацевтической науки: материалы Всероссийской научно-методической конференции с международным участием, посвященной 80-летию ПГФА. Пермь, 2016; 18: 54–57.

[*Bulgakova E.A., Karpenko Yu.N., Yarygina T.I.* Choice of a method for sample preparation of blood plasma for chromatographic determination of a biologically active compound

KON-1. Creation of competitive medicines is a priority direction of innovative development of pharmaceutical science: Materials of the All-Russian scientific and methodological conference with international participation, dedicated to the 80th anniversary of the PSPA. Perm, 2016; 18: 54–57. (In Russian)]

8. *Кляшева О.Н.* Разработка методик анализа и стандартизация нового биологически активного соединения КОН-1, проявляющего ноотропное действие: автореф. дис. ... канд. фарм. наук. Пермь, 2014; 21 с.
[*Klyasheva O.N.* Development of analysis techniques and standardization of a new biologically active compound KON-1, showing nootropic action: extended abstract of the dissertation of a PhD Candidate. Perm, 2014; 21 pp. (In Russian)]
9. 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 pp.
10. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft). European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use. London, 2009; 23 pp.