

УДК 615.074

МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ *N*-БЕНЗИЛ-*N*-МЕТИЛ-1-ФЕНИЛПИРРОЛО [1,2-*A*] ПИРАЗИН-3-КАРБОКСАМИДА В ПЛАЗМЕ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЭЖХ/МС

А.А. Новицкий*, П.О. Бочков, А.А. Литвин, В.П. Жердев, Е.В. Блынская

(ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова; *e-mail: litbiopharm@yandex.ru)

На основе ВЭЖХ/МС разработана методика количественного определения *N*-бензил-*N*-метил-1-фенилпирроло[1,2-*a*]пирозин-3-карбоксамида (ГМЛ-1) в плазме крови крыс. Методика линейна в диапазоне 50–1000 нг/мл. Степень извлечения ГМЛ-1 из плазмы крови 83,63%, предел обнаружения 25 нг/мл.

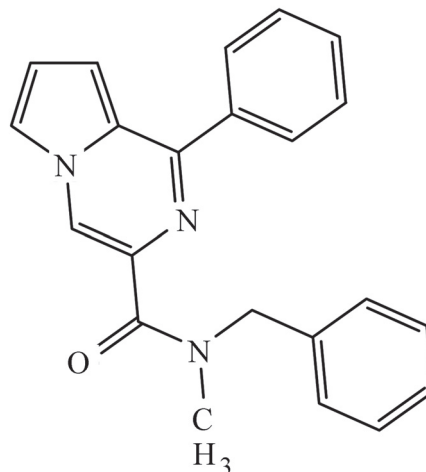
Ключевые слова: ГМЛ-1, плазма крови, высокоэффективная жидкостная хроматография/масс-спектрометрия, количественное определение.

Важнейший этап разработки любого лекарственного средства (ЛС) – изучение его экспериментальной фармакокинетики и метаболизма. В современной психофармакологии важное место занимает проблема создания нетоксичных и не имеющих побочных эффектов ЛС, относящихся к лигандам транслокаторного белка (TSPO) и обладающих анксиолитической активностью [1]. Исследователи пытаются выяснить, какая часть введенной дозы всасывается из места введения и подвергается биотрансформации, а какая попадает в системный кровоток в неизменном виде [2]. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) – один из наиболее удобных инструментальных методов для определения метаболических отношений [3]. Цель настоящего исследования – разработка и валидация методики количественного определения ГМЛ-1 в плазме крови крыс для последующего изучения его экспериментальной фармакокинетики с использованием ВЭЖХ/МС.

Структурная формула соединения *N*-бензил-*N*-метил-1-фенилпирроло[1,2-*a*]пирозин-3-карбоксамида (далее ГМЛ-1) приведена на рисунке. В работе использовали фармацевтическую субстанцию ГМЛ-1 (ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, РФ. Серия 170616), ацетонитрил («LiChrosolv», «Merck», ФРГ); воду ультрачистую («LiChrosolv», «Merck», ФРГ); аммония ацетат («Merck», ФРГ); 85%-ю муравьиную кислоту («Acros Organics», РФ); метанол («LiChrosolv», «Merck», ФРГ); аммиак «ч.д.а.» («Сигма Тек», РФ); хлористый метилен «х.ч.» («Реахим», РФ).

Исследование выполнено на высокоэффективном жидкостном хроматографе с масс-

селективным детектором типа ионная ловушка модели «Agilent 1200 Series LC/MSD Ion Trap» («Agilent», США), оборудованном системой автоматического ввода пробы, внешним источником ионов с ионизацией электроспреем и управляемым компьютером с системой обработки данных «ChemStation» (v.1.0). Условия проведения хромато-масс-спектрометрического анализа в опытах следующие: предколонка «Zorbax Eclipse XDB-C8» (2,1×12,5 мм, 5 мкм); («Agilent» США), колонка «Zorbax Eclipse XDB-C18» (2,1×150 мм; 5 мкм) («Agilent», США), температура колонки 30 °С, режим элюирования изократический, подвижная фаза – раствор «А» (50 мл 0,1 М раствора аммония ацетата и 5 мл муравьиной кислоты доводили водой ультрачистой до общего объема 1,0 л) и раствор «Б» (50 мл 0,1 М раствора аммония ацетата и 5 мл муравьиной кислоты доводили метанолом до общего объема 1,0 л) филь-



Структурная формула соединения ГМЛ-1

тровали через мембранные фильтры с размером пор 0,22 мкм («Sartorius», ФРГ), скорость потока 0,5 мл/мин, тип ионизации – электроспрей (ESI) в режиме положительной ионизации, тип детектирования – режим множественных молекулярных реакций по дочерним ионам с отношением массы к заряду $m/z = 285$ и $m/z = 311$, полученных изолированием и фрагментацией нативного молекулярного иона с отношением массы к заряду $m/z = 342$, что соответствует протонированному молекулярному иону ГМЛ-1, объем вводимой пробы 5 мкл, время удерживания ~2,0 мин, время анализа 4 мин, давление газа-распылителя (азот) 55 psi, скорость осушающего газа (азот) 10 л/мин, температура осушающего газа 350 °С.

В настоящей методике матрицей для приготовления калибровочных стандартов служила плазма крови крыс (масса тела 180–220 г), полученных из питомника «Столбовая» (Московская обл.). Образцы крови получали методом декапитации интактных животных. Плазму крови получали центрифугированием образцов цельной крови при 3500 об/мин в течение 10 мин. Образцы плазмы крови хранили при –50 °С. Для пробоподготовки образцов к анализу использовали метод жидкость-жидкостной экстракции. В экстракционную пробирку вместимостью 20 мл переносили образцы плазмы крови объемом 0,5 мл, добавляли 15 мл хлористого метилена и помещали на встряхиватель на 10 мин. Полученные образцы помещали в морозильную камеру и выдерживали при –50 °С в течение 5 мин для замораживания водной фазы. Затем органический слой сливали и упаривали на водяной бане при 40 °С в токе азота. Сухой оста-

ток растворяли в 0,5 мл метанола. Матричный раствор ГМЛ-1 (100 мкг/мл) готовили растворением в метаноле точной навески (0,0100 г) фармацевтической субстанции ГМЛ-1 в мерной колбе вместимостью 100 мл.

Калибровочные стандарты для валидации были приготовлены путем последовательного разбавления матричного раствора метанолом. Использовали калибровочные стандарты ГМЛ-1 с концентрациями 50, 75, 100, 250, 500, 750 и 1000 нг/мл.

Валидацию методики проводили в соответствии с «Руководством по валидации аналитических методик для производителей лекарств» [4].

Калибровочная кривая построена с использованием семи калибровочных стандартов, охватывающих ожидаемый диапазон концентраций ГМЛ-1 в плазме крови крыс (50–1000 нг/мл). Самый низкий стандарт на калибровочной кривой соединения ГМЛ-1, равный 50 нг/мл, был принят в качестве предела количественного определения.

Зависимость величины хроматографического пика от концентрации ГМЛ-1 калибровочных стандартов в области измерения методики носила линейный характер в рассматриваемом диапазоне концентраций.

Правильность и воспроизводимость внутри одной аналитической серии оценивали по результатам параллельных анализов образцов контроля качества с концентрацией ГМЛ-1, равной 50, 250 и 1000 нг/мл. Каждый образец контроля качества определялся в шести повторностях. Расчет концентраций образцов контроля качества проводили по калибровочной кривой, полученной в составе той же аналитической серии. Степень извлечения

Стабильность ГМЛ-1 после пробоподготовки и хранения при комнатной температуре в течение 8 ч

Показатель	Концентрация ГМЛ-1, нг/мл					
	образцы после пробоподготовки			свежеприготовленные образцы		
	50	250	1000	50	250	1000
	43,12	238,98	947,84	46,22	260,52	1044,20
	37,22	236,18	968,87	47,1	242,81	978,02
	42,35	221,39	977,28	49,23	238,36	974,11
	41,24	234,93	886,16	51,06	254,33	966,92
	43,17	218,96	978,93	44,35	242,61	1031,20
	37,54	228,97	867,26	44,22	258,54	978,13
\bar{x}	40,77	229,90	937,72	47,03	249,53	995,43
SD	2,72	8,25	48,91	2,71	9,41	33,26
CV%	6,67	3,59	5,22	5,77	3,77	3,34
Разница, %	12,51	7,85	5,77	–	–	–

соединения ГМЛ-1 из плазмы крови крыс определяли путем сравнения площадей хроматографических пиков растворов контроля качества, которые принимались за 100%, с площадями пиков тех же проб, которые подвергались процедуре пробоподготовки. Измерения каждого уровня концентрации стандартов (низкий – 100 нг/мл, средний – 500 нг/мл и высокий – 1000 нг/мл) проводили в трех повторностях. Установлено, что процент извлечения соединения ГМЛ-1 из плазмы крови в среднем составляет 83,63%.

Для оценки стабильности соединения ГМЛ-1 в плазме крови использовали образцы контроля качества, содержащие 50, 250 и 1000 нг/мл, которые хранились при комнатной температуре и дневном свете после пробоподготовки в течение 8 ч. Далее проводили анализ образцов вместе со свежеприготовленными образцами в составе одной аналитической серии. Значения рассчитанной концентрации ГМЛ-1 после хранения при комнатной температуре сравнивали со средними значениями концентрации препарата в свежеприготовленных

образцах контроля качества. Полученные значения должны удовлетворять критерию приемлемости: модуль разницы не должен превышать 15% [4]. Результаты представлены в таблице.

Из приведенных данных следует, что концентрации ГМЛ-1 после хранения при комнатной температуре в течение 8 ч удовлетворяют критерию приемлемости, т.е. разница между результатами анализа до и после хранения не превышает 15%.

На основании совокупности полученных данных можно констатировать, что проведена валидация аналитической методики количественного определения соединения ГМЛ-1 в плазме крови крыс методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Нижний предел количественного определения методики составил 50 нг/мл. Правильность и воспроизводимость результатов анализа с учетом критериев приемлемости соблюдались во всем интервале исследуемых концентраций (50–1000 нг/мл). При комнатной температуре пробы сохраняют стабильность после пробоподготовки на протяжении 8 ч.

Работа была поддержана Министерством образования и науки (Госконтракт №14.08.12.0087).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Яркова М.А., Мокров Г.В., Гудашева Т.А. и др. // Хим.-фарм. журн. 2016. Т. 50. № 8. С. 3.
2. Жердев В.П., Литвин А.А. // Клин. фармакокинетика. 2005. № 2. С. 1.
3. Новицкая Я.Г., Литвин А.А., Жердев В.П. и др. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2013. Т. 54. № 1. С. 56.
4. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств. Под ред. В.В. Береговых. М., 2008.

Поступила в редакцию 10.06.17

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE QUANTIFICATION OF GML-1 COMPAUND (*N*-BENZYL-*N*-METHYL-1-PHENYLPYRROLO[1,2-*A*]PYRAZINE-3-CARBAMIDE) IN THE RAT BLOOD PLASMA BY HPLC-MS

A.A. Novitsky*, P.O. Bochkov, A.A. Litvin, V.P. Zherdev, E.V. Blynskaya

(FSBSI «Zakusov Institute of Pharmacology», *e-mail: litbiopharm@yandex.ru)

The technique of quantitative determination of a new compound, possessing anxiolytic activity, GML-1 in the rat blood plasma was developed and validated. Analysis was performed by HPLC-MS. The method was linear in the range of 50–1000 ng/ml. Recovery of GML-1 was 83.63%. Limit of detection was 25 ng/ml.

Key words: GML-1, blood plasma, HPLC-MS, quantification.

Сведения об авторах: Новицкий Александр Александрович – науч. сотр. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (135alex1988@rambler.ru); Бочков Павел Олегович – науч. сотр. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», канд. биол. наук (bok-of@yandex.ru); Литвин Александр Алексеевич – вед. науч. сотр. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», докт. биол. наук (litbiopharm@yandex.ru); Жердев Владимир Павлович – зав. лабораторией фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова», докт. мед. наук (zherdevrpharm@mail.ru); Блынская Евгения Викторовна – зав. лабораторией готовых лекарственных форм ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», канд. фарм. наук (eareus@mail.ru).