

Разработка и валидация методики количественного определения соединения ГИЖ-298 в плазме крови крыс с использованием ВЭЖХ-УФ

Грибакина О.Г., Шевченко Р.В., Колыванов Г.Б., Литвин А.А.,
Бочков П.О., Бойко С.С., Жердев В.П.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Резюме. Разработана методика количественного определения соединения ГИЖ-298 в плазме крови крыс. Анализ проводили с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием. Методика линейна в диапазоне 100–5000 нг/мл. Процент извлечения ГИЖ-298 из плазмы крови составил 86,88 %. Нижний предел обнаружения составил 100 нг/мл.

Ключевые слова: ГИЖ-298; количественное определение; высокоэффективная жидкостная хроматография; плазма крови

Для цитирования:

Грибакина О.Г., Шевченко Р.В., Колыванов Г.Б., Литвин А.А., Бочков П.О., Бойко С.С., Жердев В.П. Разработка и валидация методики количественного определения соединения ГИЖ-298 в плазме крови крыс с использованием ВЭЖХ-УФ // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 2. – С.41–45. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10046.

Development and validation of the quantification of GIZH-298, possessing in the rat blood plasma by HPLC-UF

Gribakina OG, Shevchenko RV, Kolyvanov GB, Litvin AA, Bochkov PO, Boyko SS, Zherdev VP
FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. The technique of quantitative determination of a new compound GIZH-298 in the rat blood plasma was developed and validated. Analysis was performed by HPLC-UV. The method was linear in the range of 100-5000 ng/ml. Recovery of GIZH-298 was 86,88 %. Limit of detection was 100 ng/ml.

Keywords: GIZH-298; rat blood plasma; HPLC-UV; quantification

For citations:

Gribakina OG, Shevchenko RV, Kolyvanov GB, Litvin AA, Bochkov PO, Boyko SS, Zherdev VP. Development and validation of the quantification of GIZH-298, possessing in the rat blood plasma by HPLC-UF. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;2:41–45. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10046.

Введение

Эпилепсия является одним из самых распространённых неврологических заболеваний, по данным ВОЗ, заболеваемость которой в разных странах варьирует от 4 до 10 случаев на 1 000 человек [1]. До настоящего времени в России нет отечественных эффективных противоэпилептических препаратов (ПЭП), почти все препараты этой группы производятся за рубежом и имеют высокую стоимость. В связи с этим поиск новых высокоэффективных и малотоксичных отечественных ПЭП является актуальной задачей [2].

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» синтезировано новое производное оксима 4-бензоилпиридина – ГИЖ-298 (оксалат O-(2-морфолиноэтил)оксим 4-бензоилпиридина). Это соединение обладает противосудорожной активностью, устраняя первично-генерализованные судороги в тестах антагонизма с максимальным электрошоком и коразолом у грызунов в дозах 0,5–100 мг/кг внутривенно. ЛД₅₀ после внутривенного введения для соединения ГИЖ-298 составляет 316 мг/кг (мыши). Таким образом, ГИЖ-298 имеет большую терапевтическую широту [3].

Целью настоящего исследования является разработка и валидация методики количественного опреде-

ления ГИЖ-298 в плазме крови крыс для последующего изучения его экспериментальной фармакокинетики.

Материалы и методы

Структурная формула фармацевтической субстанции ГИЖ-298 (оксалат O-(2-морфолиноэтил)оксима 4-бензоилпиридина) представлена на рис. 1.

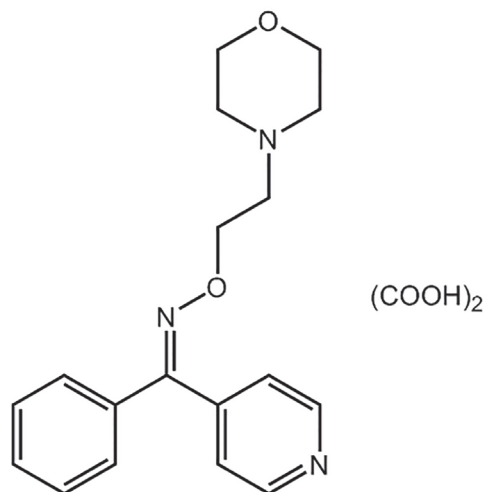


Рис. 1. Структурная формула ГИЖ-298

Производитель: ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва. Серия – 10.10.18. Используются следующие растворители и реактивы: вода ультрачистая «LiChrosolv», «Merck», ФРГ; аммония ацетат «Merck», ФРГ; кислота муравьиная 85 % «Acros Organics», РФ; метанол «LiChrosolv», «Merck», ФРГ; эфир диэтиловый ОАО «МедХимпром», РФ.

Исследование выполнено на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы «Beckman Coulter» (США). Помпа – «Beckman System Gold 127 Solvent Module» и ультрафиолетового детектора – «Beckman Gold 166». Детектирование соединения проводили при длине волны 258 нм.

Условия хроматографического анализа ГИЖ-298 представлены в табл. 1.

Таблица 1

Условия хроматографического анализа ГИЖ-298 в плазме крови

Параметр	Значение
Колонка	Phenomenex Luna 5U C8, 250 4,6мм, 5мкм
Температура	25 °С
Режим элюирования	Изократический
Состав подвижной фазы	Ацетатный буфер (рН 3,0):метанол (2:1)
Скорость потока	1,0 мл/мин
Длина волны	258 нм
Тип детектирования	Ультрафиолетовый детектор
Объём, вводимой пробы	200 мкл
Время удерживания ГИЖ-298	7,8–8,3 мин
Время анализа	10 мин

В настоящей методике матрицей для приготовления калибровочных стандартов служила плазма крови крыс с массой тела 180-220 г, полученных из питомника Филиал «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», Московская обл. Образцы крови получали методом декапитации интактных животных. Плазму крови получали центрифугированием образцов цельной крови при 3 500 об/мин в течение 10 мин. Образцы плазмы крови крыс хранили при температуре –50 °С.

Пробоподготовка. Для пробоподготовки образцов для анализа использовали метод жидкость-жидкостной экстракции. Образцы плазмы крови, хранящиеся в морозильной камере, размораживали при комнатной температуре. К образцам плазмы крови объёмом 0,5 мл с целевыми концентрациями добавляли 0,1 мл 2 М раствора КОН и перемешивали на механическом вихревом встряхивателе «Vortex». К полученному раствору добавляли 10 мл эфира диэтилового и помещали на

горизонтальный встряхиватель на 20 мин. После чего смесь замораживали при –50 °С в течение 15 мин, отделяли органический слой и упаривали в токе азота при 40 °С на водяной бане. Перед началом анализа сухой остаток растворяли в 0,5 мл подвижной фазы.

Приготовление сток-раствора (матричного раствора). Матричный раствор ГИЖ-298 (100 мкг/мл) готовили растворением в метаноле точной навески (0,0100 г) ГИЖ-298 в мерной колбе вместимостью 100 мл.

Приготовление калибровочных стандартов. Использовали калибровочные стандарты ГИЖ-298 с концентрациями 100, 250, 500, 750, 1 000, 2 500 и 5 000 нг/мл.

Калибровочные стандарты для валидации были приготовлены путём последовательного разбавления матричного раствора водой дистиллированной. Диапазон концентраций ГИЖ-298 выбирался исходя из концентраций, ожидаемых в исследовании экспериментальной фармакокинетики.

Концентрации ГИЖ-298 в анализируемых пробах определяли методом абсолютной калибровки.

Результаты и обсуждения

Валидацию методики проводили в соответствии с «Руководством по валидации аналитических методик для производителей лекарств» [4]. В приведённых выше условиях время удерживания ГИЖ-298 в среднем составило около 8,0 мин (рис. 2б).

Селективность. Для определения селективности были протестированы 6 образцов биологической матрицы (плазма крови) на возможность создания помех потенциально мешающими веществами (эндогенные компоненты плазмы крови, метаболиты, продукты деструкции и др.).

На рис. 2 представлены типичные хроматограммы интактной плазмы крови крыс (а) и экстракта плазмы крови, содержащего 100 нг/мл ГИЖ-298 (б). Из рис. 2 видно, что потенциально мешающие вещества не оказывают влияния на анализ ГИЖ-298.

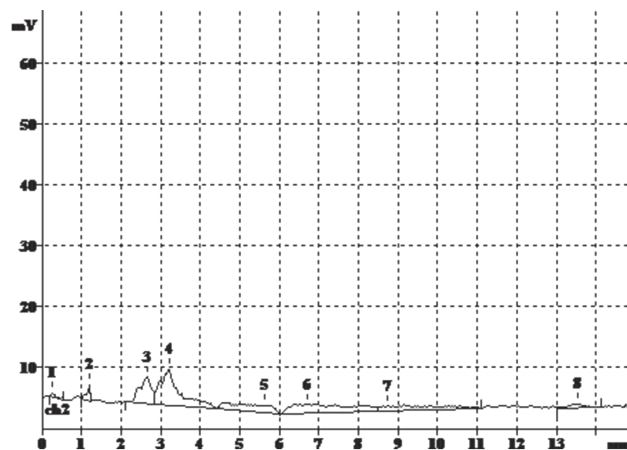


Рис. 2а. Хроматограмма интактной плазмы крови

Таблица 2

Параметры калибровочных кривых ГИЖ-298 в плазме крови крыс

Калибровочная кривая	Участок, отсекаемый от оси абсцисс (a)	Наклон кривой (b)	Коэффициент корреляции (r)
1	-1,240312	0,12401	0,9975
2	-1,64862	0,12066	0,9999
3	-3,32199	0,11881	0,9931

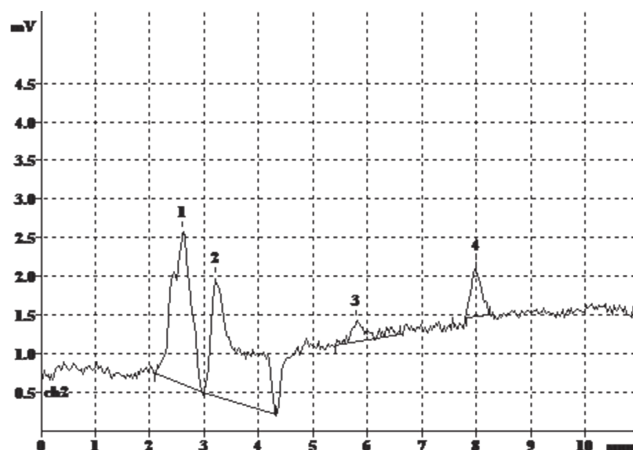


Рис. 26. Хроматограмма плазмы крови, содержащей 100 нг/мл ГИЖ-298

Линейность и чувствительность. Калибровочная кривая построена с использованием 7 калибровочных стандартов, охватывающих ожидаемый диапазон концентраций ГИЖ-298 в плазме крови крыс (100–5 000 нг/мл).

Самый низкий стандарт на калибровочной кривой соединения ГИЖ-298, равный 100 нг/мл, был принят в качестве предела количественного определения, т. к. были выполнены следующие условия:

- Показания стандарта на нижнем пределе количественного определения (НПКО) были не менее чем в 5 раз выше показаний пробы интактной плазмы крови. Значение стандарта на уровне НПКО поддавались определению и были дискретными и воспроизводимыми с точностью 14,76 % (не превышающей 20 %), и воспроизводимостью 99,16 % (входящей в диапазон 80–120 %).

- Предел обнаружения ГИЖ-298 был равен 100 нг/мл.

- Зависимость величины хроматографического пика от концентрации ГИЖ-298 калибровочных стандартов в области измерения методики была линейной в рассматриваемом диапазоне концентраций.

Для описания изучаемой зависимости использовалась линейная аппроксимация типа $y = a + b \times x$. Данная зависимость признана приемлемой, поскольку коэффициент корреляции для всех 3 калибровок был выше 0,99.

Параметры калибровочных кривых (коэффициенты уравнения и коэффициенты корреляции) представлены в табл. 2.

Для оценки прецизионности результатов построены 3 калибровочные кривые и проведён обратный расчёт концентраций используемых стандартов по всем кривым и определены статистические характеристики.

Прецизионность результатов с учётом критериев приемлемости достигается во всем используемом интервале концентраций (табл. 3).

Критерии приемлемости по калибровочным стандартам:

1. Отклонения нижнего стандарта кривой от теоретической концентрации не более 20 %;

2. Отклонения всех остальных стандартов не более 15 %;

3. Не менее 75 % ненулевых стандартов, включая нижний и верхний калибровочный стандарт должны удовлетворять вышеуказанным требованиям; все значения, которые не попадают в эти пределы, можно не учитывать, при условии, что они не изменяют установленную линейную модель.

Как видно из данных табл. 3 отклонения нижнего стандарта кривой от теоретической концентрации составило 0,84 %, т. е. менее 20 %. Отклонения всех остальных стандартов были менее 15 %, что также удовлетворяет критериям приемлемости.

Таблица 3

Концентрации стандартов ГИЖ-298, рассчитанные по уравнениям калибровочных кривых (нг/мл)

№/№ калибровочной кривой	Стд. А 100	Стд. В 250	Стд. С 500	Стд. D 750	Стд. Е 1000	Стд. F 2500	Стд. H 5000
1	85,57	225,83	488,67	747,00	854,90	2488,91	5111,16
2	97,25	226,50	528,75	778,16	995,91	2486,08	5032,08
3	114,66	284,16	589,08	813,33	932,33	2044,50	5151,58
\bar{x}	99,16	245,50	535,5	779,50	927,71	2339,83	5098,27
SD	14,64	33,49	50,54	33,19	70,62	255,77	60,78
CV %	14,76	13,64	9,41	4,26	7,61	10,93	1,19
% от теоретического	0,84	1,8	7,1	3,93	7,23	6,40	1,96

Правильность и воспроизводимость внутри одной аналитической серии

Правильность и воспроизводимость внутри одной аналитической серии оценивались по результатам параллельных анализов образцов контроля качества (КК) с концентрациями ГИЖ-298: 100, 250, 1 000 и 2 500 нг/мл. Каждый образец КК определялся в 6 повторностях. Расчёт концентраций образцов КК проводился по калибровочной кривой, полученной в составе той же аналитической серии. Данные по правильности и достоверности определения соединения ГИЖ-298 в плазме крови крыс внутри одной серии представлены в табл. 4 и удовлетворяли следующим критериям

Таблица 4

Правильность и воспроизводимость определения соединения ГИЖ-298 в плазме крови крыс внутри одного аналитического цикла

№/№ калибровочной кривой	КК А (100 нг/мл)	КК В (250 нг/мл)	КК С (1000 нг/мл)	КК D (2500 нг/мл)
2	102,00	244,58	956,50	2215,42
	112,50	253,25	938,58	2148,75
	59,50	278,33	891,57	2531,50
	105,83	249,66	799,50	2513,75
	104,5	176,91	842,25	2246,42
	103,75	198,33	803,00	2372,83
\bar{x}	98,01	233,51	871,90	2338,11
SD	19,21	38,01	67,61	160,48
CV%	19,60	14,93	7,75	6,86
% от теоретического	1,99	6,59	12,81	6,47

приемлемости: воспроизводимость – среднее значение концентрации образца КК не должно превышать 15 % от теоретической величины, за исключением значения на уровне нижнего количественного предела, где допускается отклонение не выше 20 %; правильность – С. V. % значений концентраций каждого образца КК не должен превышать 15 %, за исключением значений НПКО, где этот параметр не должен быть выше 20 % [4].

Степень извлечения

Степень извлечения ГИЖ-298 из плазмы крови определялась путём сравнения площадей хроматографических пиков образцов КК (принимались за 100 %) с площадями пиков тех же проб, которые подвергались процедуре пробоподготовки. Измерения каждого уровня концентрации стандартов (низкий – 100, средний – 1 000 и высокий – 5 000 нг/мл) проводили в трёх повторениях. Установлено, что процент извлечения ГИЖ-298 из плазмы крови составил 86,88 %.

Стабильность препарата после пробоподготовки

Для оценки стабильности ГИЖ-298 в плазме крови использовались образцы ГИЖ-298 250 и 1 000 нг/мл, которые хранились при комнатной температуре и дневном свете после пробоподготовки в течение 8 ч. Далее проводили анализ образцов вместе со свежеприготов-

Таблица 5

Краткосрочная стабильность ГИЖ-298 после пробоподготовки и хранения при комнатной температуре в течение 8 ч

Калибровочная кривая	Образцы после пробоподготовки		Свежеприготовленные образцы	
	250 нг/мл	1000 нг/мл	250 нг/мл	1000 нг/мл
2	259,25	942,42	228,33	986,58
	226,33	1068,83	242,25	951,91
	244,08	956,66	272,83	965,83
	255,25	964,83	235,83	976,42
	260,58	967,58	254,00	969,17
	243,83	929,83	241,83	952,33
	\bar{x}	248,22	971,69	245,85
SD	12,96	49,67	15,69	13,57
CV%	5,22	5,11	6,38	1,40
Разница, %	0,95	0,47		

ленными образцами в составе одной аналитической серии. Рассчитанные концентрации ГИЖ-298 после хранения при комнатной температуре сравнивали со средними значениями концентраций препарата в свежеприготовленных образцах КК. Полученные значения должны были удовлетворять критерию приемлемости, т. е. разница между результатами анализа до и после хранения не должна превышать 15 %.

Из данных табл. 5 следует, что концентрации ГИЖ-298 после хранения при комнатной температуре в течение 8 ч удовлетворяют критерию приемлемости.

Заключение

Проведена валидация аналитической методики количественного определения ГИЖ-298 в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием. Нижний предел количественного определения ГИЖ-298 составил 100 нг/мл. Точность и прецизионность результатов анализа с учётом критериев приемлемости соблюдались во всем интервале исследуемых концентраций (100–5 000 нг/мл). При комнатной температуре пробы стабильны после пробоподготовки на протяжении 8 ч. Образцы плазмы крови можно разводить в два раза.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Грибакина Оксана Геннадьевна

ORCID ID: 0000-0002-4604-4346

SPIN код: 6266-8161

к. б. н., н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Gribakina OXana

ORCID ID: 0000-0002-4604-4346

SPIN code: 6266-8161

Candidate of Biological Sciences, Research Officer
of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov
institute of Pharmacology», Moscow

Шевченко Роман Владимирович

ORCID ID: 0000-0003-4646-7733

SPIN код: 1844-6202

к. м. н., н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Shevchenko Roman

ORCID ID: 0000-0003-4646-7733

SPIN code: 1844-6202

Candidate of Medical Sciences, Research Officer
of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov
institute of Pharmacology», Moscow

Кольванов Геннадий Борисович

ORCID ID: 0000-0002-2571-0047

SPIN код: 2538-8639

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kolyvanov Gennadiy

ORCID ID: 0000-0002-2571-0047

SPIN code: 2538-8639

Doctor of Biological sciences, Leading researcher
of the laboratory of pharmacokinetics FSBI
«Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литвин Александр Алексеевич

ORCID ID: 0000-0002-2818-3457

SPIN код: 6193-5770

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Litvin Alexander

ORCID ID: 0000-0002-2818-3457

SPIN code: 6193-5770

Doctor of Biological sciences, leading researcher
of the laboratory of pharmacokinetics FSBI
«Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Бочков Павел Олегович

ORCID ID: 0000-0001-8555-5969

SPIN код: 5576-8174

к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Bochkov Pavel

ORCID ID: 0000-0001-8555-5969

SPIN code: 5576-8174

Candidate of Biological Sciences, Senior Research
Officer of laboratory pharmacokinetics FSBI
«Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Бойко Светлана Семёновна

ORCID ID: 0000-0003-2177-2010

SPIN код: 4176-8921

к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Boyko Svetlana

ORCID ID: 0000-0003-2177-2010

SPIN code: 4176-8921

Candidate of Biological Sciences, Senior Research
Officer of laboratory pharmacokinetics FSBI
«Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Жердев Владимир Павлович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: zherdevpharm@mail.ru

ORCID ID: 0000-0003-2710-7134

SPIN код: 2213-9592

д. м. н., профессор, заведующий лабораторией
фармакокинетики ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт фармакологии
имени В.В. Закусова», Москва

Zherdev Vladimir

Corresponding author

e-mail: zherdevpharm@mail.ru

ORCID ID: 0000-0003-2710-7134

SPIN code: 2213-9592

MD, professor, Head of laboratory pharmacokinetics
FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Who.int [internet]. World Health Organization. Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>.

2. Гайдуков Игорь Олегович. Поиск веществ с противосудорожной активностью среди производных оксимов 3- и 4-бензоилпиридина: автореферат дисс. канд. биол. наук: 14.03.06/ Гайдуков Игорь Олегович. — М.: 2018. — 23 с. [Gajdukov IO. The search for compounds with the anticonvulsant activity of derivatives of oximes 3- and 4-benzoylpyridine. Autoabstract diss. candidate of biological sciences: 14.03.06/ Gajdukov Igor Olegovich. Moscow: 2018. (In Russ).].

3. Жмуренко Л.А., Мокров Г.В., Неробкова Н.Л., и др. Новое производное оксимов 4-бензоилпиридинов ГИЖ-298, обладающее противосудорожной активностью // Фармакокинетика и фармакодинамика. — 2017. — № 1. — С. 22–26. [Zhurenko LA, Mokrov GV, Nerobkova NL, et al. Novel 4- benzoylpyridine oxime derivative GIZH-298 with anticonvulsant activity. *Farmakokinetika i Farmakodinamika*. 2017;1:22–26. (In Russ).].

4. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / под ред. В.В. Береговых — М.: Литтерра, 2008. — 132 с. [Validaciya analiticheskikh metodik dlya proizvoditelej lekarstv. Ed. By VV Beregovyh. Moscow: Litterra. 2008. (In Russ).].