

УДК 615.1

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИМАНТАНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС

Е.А. Литвин, Д.В. Бастрыгин, Г.Б. Колыванов, Е.В. Блынская, К.В. Алексеев

(Учреждение Российской академии медицинских наук НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН; e-mail: zlanomar@gmail.com)

Разработана методика количественного определения гимантана в биожидкостях (плазма крови крыс). При помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором проведен анализ с применением внутреннего стандарта. Метод валидирован по показателям линейности, точности и правильности. Предел обнаружения метода составляет 2,5 нг/мл.

Ключевые слова: гимантан, высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектором, количественное определение.

Группа производных адамантана, являющихся действующими веществами лекарственных препаратов, достаточно хорошо изучена и включает в себя таких представителей, как мемантин, римантадин, допамантин, тромантадин, вилдагриптин и кармантадин.

Одним из производных адамантана, которое нашло применение в качестве лекарственного вещества, стал амантадин. Первоначально он использовался как противовирусный препарат, эффективный в борьбе с вирусом гриппа А₂. Позже был обнаружен его антипаркинсонический эффект. В отличие от L-допы – классического антипаркинсоника – амантадин действует быстрее, а его побочное действие сведено к минимуму.

В Учреждении Российской академии медицинских наук НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН разработано новое производное адамантана – гимантан (рис. 1) – потенциальное противопаркинсоническое средство (N-(2-адамантил) гексаметиленимино гидрохлорид), обладающее высокой активностью и широким спектром антипаркинсонических эффектов [1, 2]. Вещество не поглощает в УФ-свете, не обла-

дает летучими свойствами, устойчиво к дериватизации.

Цель настоящей работы – разработка методики количественного определения гимантана в биопробах для последующего изучения его фармакокинетики и оценки биодоступности.

Материалы и методы

Материалы

Гимантана гидрохлорид (опытная партия 597), синтезированный в ОТО ГУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова. Трамадола гидрохлорид, “Словакофарма” (SN 3360404). Вода для ВЭЖХ (“Merck”, Германия), ацетонитрил сверхчистый для масс-спектрометрии (“Merck”, Германия). Все остальные реагенты были аналитической степени чистоты.

Использовали последовательные разведения рабочих стандартных образцов гимантана гидрохлорид от 50 нг/мл до 10 мкг/мл, растворенных в воде. В качестве внутреннего стандарта использовали трамадола гидрохлорид. Его рабочий раствор (IS) был приготовлен разведением 0,1 г субстанции в воде до получения концентрации 2 мкг/мл.

Модельные образцы были приготовлены в интактной плазме крыс. К 0,9 мл плазмы прибавляли 0,1 мл каждого из разведений гимантана и смешивали. Извлечение гимантана из плазмы крови проводили путем осаждения белков плазмы ацетонитрилом. В экстракционную пробирку вносили 0,45 мл полученной плазмы крови, прибавляли 1,5 мл ацетонитрила и 0,05 мл IS, а затем центрифугировали в течение 15 мин при 8000 об/мин. Супернатант отделяли, и аликвоту (15 мкл) вводили в петлю хроматографа.

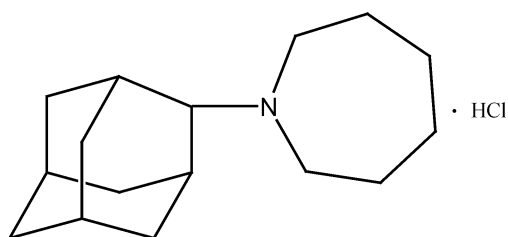


Рис. 1. Структурная формула гимантана гидрохлорида

Прецизионность и правильность разработанной методики

Взято (нг/мл)	Найдено (нг/мл) (среднее±SD)	Прецизионность (%)	Правильность (%)
2,5	2,3±0,03	14,2	92
5	5,4±0,05	12,8	107
25	24,9±0,07	5,6	99,6
50	49,6±0,1	4,7	99,2
100	102,1±0,21	4,3	101,9
250	247,3±0,65	3,6	98,7
500	498,4±0,9	2,7	99,5

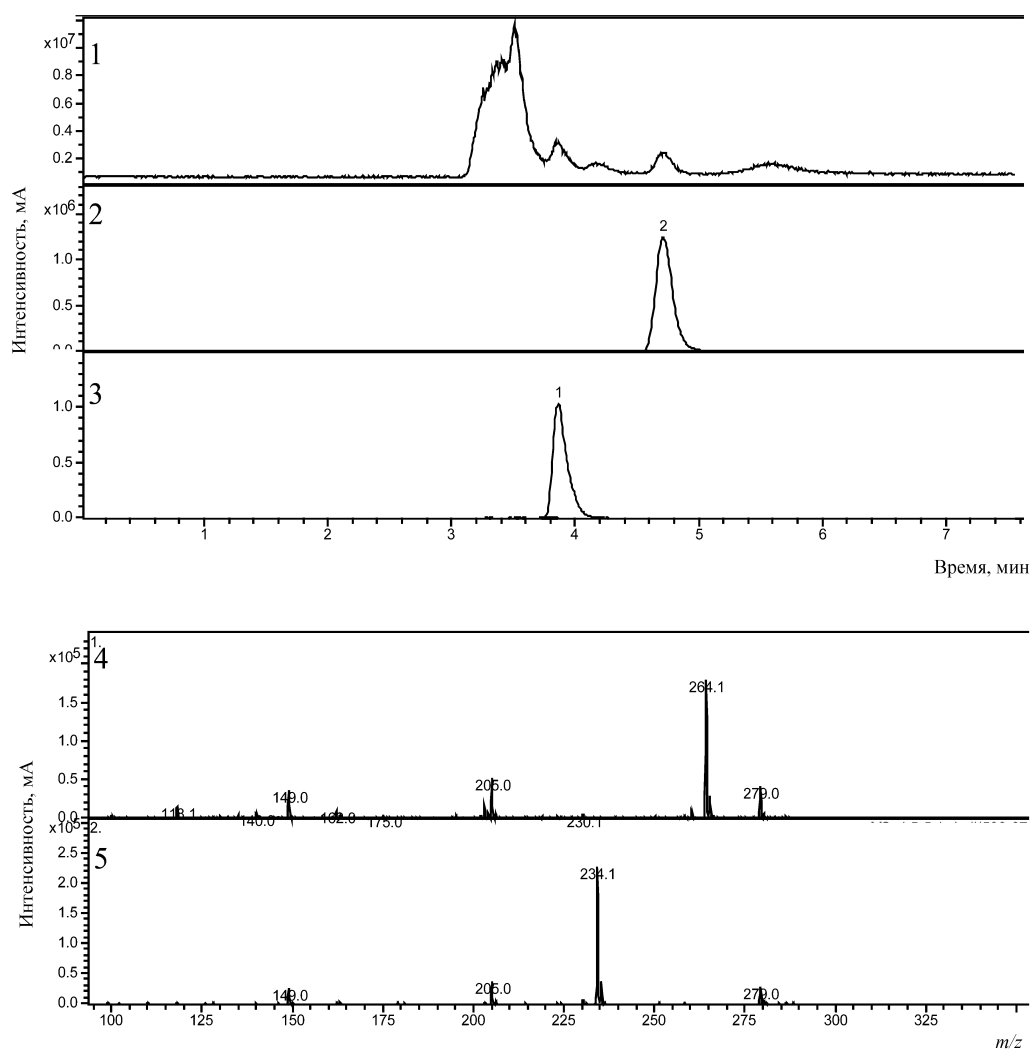


Рис. 2. Масс-хроматограмма образца, содержащего гинсенозид в концентрации 50 нг/мл и ИС в концентрации 50 нг/мл: 1 – общий ионный ток образца; 2 – изолированный ион с $m/z = 234$; 3 – изолированный ион с $m/z = 264$ (ИС); 4 – масс-спектр хроматограммы в точке выхода внутреннего стандарта, 5 – масс-спектр хроматограммы в точке выхода гинсенозида

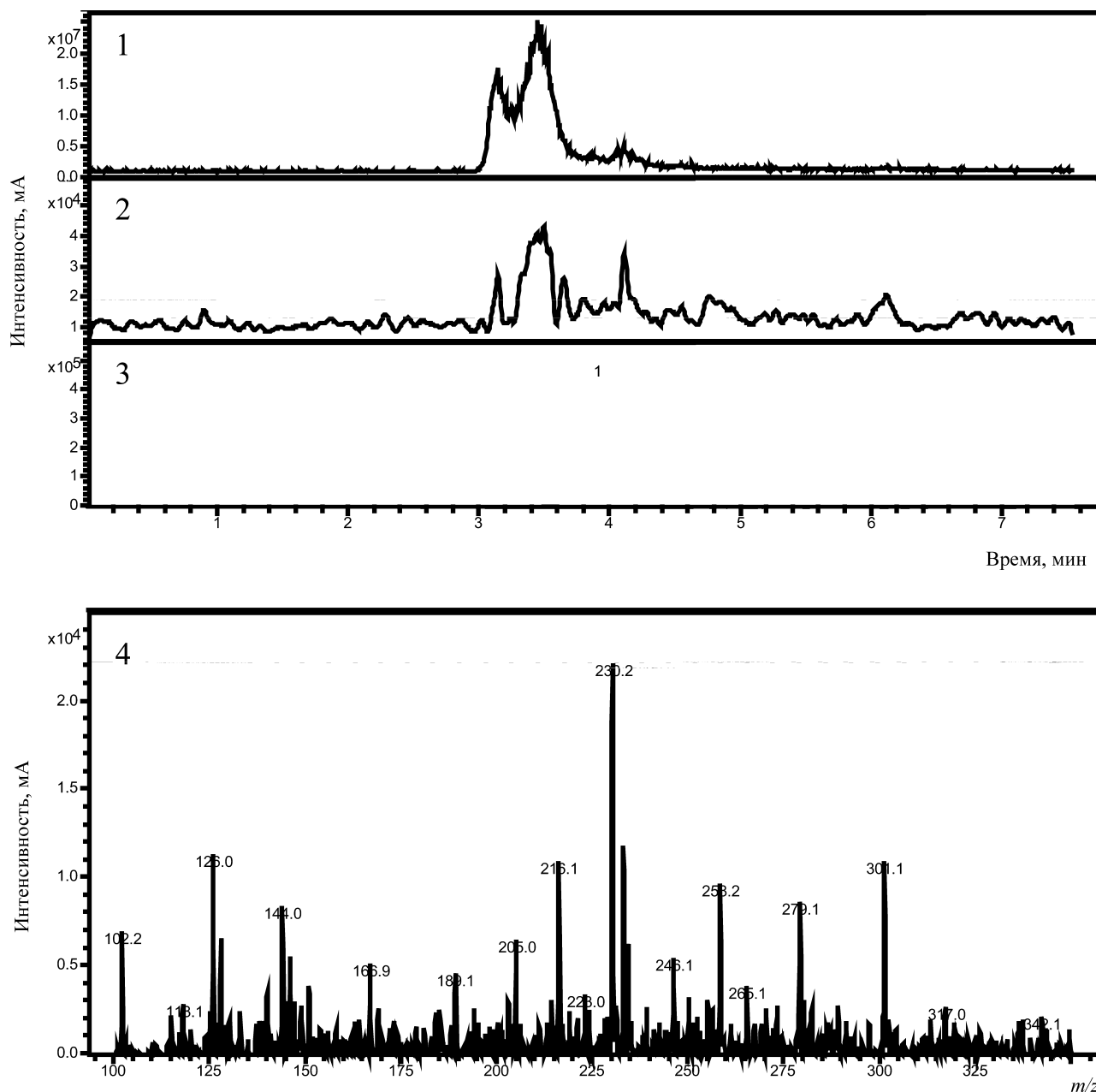


Рис. 3. Масс-хроматограмма образца контрольной плазмы: 1 – общий ионный ток образца; 2 – изолированный ион с $m/z = 234$; 3 – изолированный ион с $m/z = 264$ (IS); 4 – масс-спектр хроматограммы в точке выхода гимантана

Идентификация проведена на основании данных масс-спектрометрического анализа.

Методы

Анализ проводили с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе “Agilent Technologies”, серии 1200 (США), с масс-спектрометрическим детектором (колонка “Phenomenex” (США) C18 (150×2,1), диаметр частиц 5 мкн). Подвижная фаза: раствор А и раствор В в

соотношении 1:1. Раствор А – 25 мл 0,1 М раствора ацетата аммония и 2,5 мл концентрированной муравьиной кислоты, разведенные в 0,5 л воды. Раствор В – 25 мл 0,1 М раствора ацетата аммония и 2,5 мл концентрированной муравьиной кислоты, разведенные в 0,5 л ацетонитрила. Скорость потока 0,4 мл/мин. Скорость подачи азота 12 л/мин, температура испарителя 350°С, напряжение на капилляре 3500 В. Детектирование проводили в режиме позитивной ионизации по полному ионному току. Определяли молекулярные

ионы в соответствии с молекулярной массой искомого вещества, для гимантана целевое отношение массы к заряду составляло 234 m/z , для IS – 264 m/z .

Результаты и обсуждения

Количественное определение препарата проводили методом внутреннего стандарта. Валидацию метода проводили в согласии с руководством по валидации аналитических методик для производителей лекарств [3]. Линейность методик оценивалась по 7 калибровочным стандартам (2,5; 5; 25; 50; 100; 250; 500 нг/мл). Получены калибровочные кривые при использовании алгоритма линейной регрессии наименьших квадратов в системе координат “соотношение площади хроматографического пика гимантана к площади хроматографического пика внутреннего стандарта – концен-

трация гимантана”. В изучаемом диапазоне концентраций (C) отмечена линейная зависимость между концентрацией анализируемых соединений и соответствующей площадью пиков, усредненное значение которых описывается следующим уравнением:

$$R = -0,214 \cdot 10^6 + 0,027 \cdot 10^6 \cdot C_x \quad (r = 0,9993),$$

где R – соотношение площади хроматографического пика гимантана и площади хроматографического пика трамадола. Валидация методики оценивалась по параметрам прецизионности и правильности (таблица). Предел обнаружения гимантана для разработанного метода составляет 2,5 нг/мл. Время удерживания гимантана в среднем составило 4,7 мин, а внутреннего стандарта – 3,9 мин. Определено, что коэкстрактивные вещества не мешают определению (рис. 2, 3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вальдман Е.А., Воронина Т.А., Неробкова Л.Н. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 1999. **62**. № 4. С. 3.
2. Вальдман Е.А. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2000. **63**. № 5. С. 3.
3. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / Под ред. В.В. Береговых. М., 2008.

Поступила в редакцию 20.02.11

QUANTITATIVE DEFINITION OF HIMANTANE IN PLASMA OF BLOOD OF RATS

E.A. Litvin, D.V. Bastrygin, G.B. Kolyvanov, E.V. Blynskaya, K.V. Alekseev

The technique of quantitative definition of himantane in bioliquids (plasma of blood of rats) is developed. By means of a highly effective liquid chromatography with the mass spectrometer detector the analysis is carried out with application of the internal standard. A method validation on indicators of linearity, accuracy and correctness. The limit of detection of a method makes 2,5 ng/ml.

Key words: *himantane, liquid chromatography with the mass spectrometer detector, quantitative definition.*

Сведения об авторах: Литвин Евгений Александрович – мл. науч. сотр. лаборатории фармакокинетики, Учреждение Российской академии медицинских наук НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, аспирант (zlanomar@gmail.com); Бастрьгин Дмитрий Владимирович – мл. науч. сотр. лаборатории фармакокинетики Учреждение Российской академии медицинских наук НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, аспирант (basdim21@gmail.com); Колыванов Геннадий Борисович – вед. науч. сотр. лаборатории фармакокинетики Учреждение Российской академии медицинских наук НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, докт. биол. наук; Блынская Евгения Викторовна – ст. науч. сотр. лаборатории готовых лекарственных форм Учреждение Российской академии медицинских наук НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, канд. фарм. наук (eaugeus@mail.ru); Алексеев Константин Викторович – профессор, руководитель лаборатории готовых лекарственных форм НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, докт. фарм. наук.