

УДК 615.074

МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕКСАМЕТИЛЕНДИАМИД БИС-(*N*-МОНОСУКЦИНИЛ-*L*-СЕРИЛ-*L*-ЛИЗИНА) В ПЛАЗМЕ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЭЖХ/МС

О.Г. Грибакина^{1*}, Лопатина Н.Б.², Е.В. Блынская¹, П.О. Бочков¹, Р.В. Шевченко¹, А.А. Литвин¹, Г.Б. Колыванов¹, В.П. Жердев¹, С.Э. Кондаков³

(¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова»; ² ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); ³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет; *e-mail: pron-ox@yandex.ru).

Разработана методика количественного определения гексаметилендиамида бис-(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина) (ГСБ-106) в плазме крови крыс методом ВЭЖХ/МС. Методика линейна в диапазоне 50-1000 нг/мл. Установлено, что степень извлечения ГСБ-106 из плазмы крови 82,15%, нижний предел количественного определения составляла 50 нг/мл.

Ключевые слова: гексаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизин), плазма крови, высокоэффективная жидкостная хроматография/масс-спектрометрия, количественное определение.

В последнее десятилетие накопилось много данных, свидетельствующих о важной роли изменения уровня нейротрофинов, особенно нейротрофического фактора мозга (brain-derived neurotrophic factor; BDNF), в патогенезе депрессий [1, 2]. В связи с этим представляется перспективной стратегия создания на основе низкомолекулярных миметиков BDNF новых веществ, обладающих антидепрессивной активностью при системном введении, и не имеющих побочных эффектов полноразмерного нейротрофина. Ранее в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» на основе структуры четвертой петли BDNF сконструирован и синтезирован низкомолекулярный миметик гексаметилендиамида бис-(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина) (далее ГСБ-106), антидепрессивная активность которого изучена на белых беспородных мышках и крысах [3].

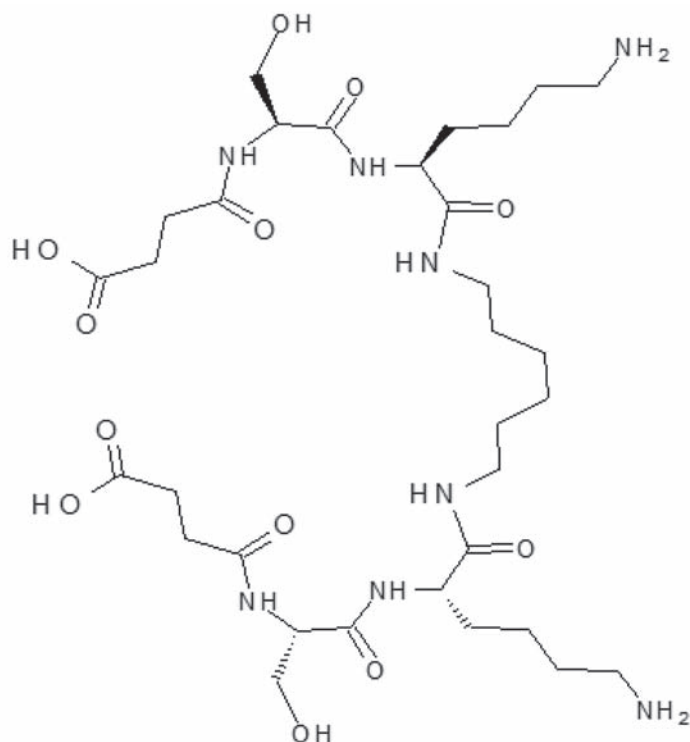
Один из основных этапов разработки нового лекарственного средства заключается в изучении его экспериментальной и клинической фармакокинетики. На этом этапе следует установить, какая часть дозы исследуемого вещества всасывается из места введения и подвергается биотрансформации, а какая попадает в системный кровоток в неизменном виде. Для количественного определения целевых соединений и продуктов их биотрансформации в биоматрице (плазма, сыворотка крови, гомогенаты тканей, моча и др.) широко используется высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрическим детектиро-

ванием (ВЭЖХ/МС). Метод ВЭЖХ/МС использован в нашем исследовании, цель которого состояла в разработке и валидации методики количественного определения ГСБ-106 в плазме крови крыс для последующего изучения его экспериментальной фармакокинетики.

Материалы и методы

Структурная формула исследуемого вещества ГСБ-106 приведена на рисунке. В работе использовали фармацевтическую субстанцию ГСБ-106, синтезированную в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (серия 130516); ацетонитрил («LiChrosolv», «Merck», ФРГ); воду деионизованную («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); дихлорметан («ч.д.а.», «Рехим», РФ).

Исследование выполнено на высокоэффективном жидкостном хроматографе с масс-селективным детектором типа «ионная ловушка», модель «Agilent 1200 Series LC/MSD Ion Trap» («Agilent», США), оборудованном системой автоматического ввода пробы, внешним источником ионов с ионизацией электроспреем при атмосферном давлении и управлением компьютером с системой обработки данных ChemStation (v. 1.0). Условия проведения хромато-масс-спектрометрического анализа были следующие: предколонка «Zorbax Eclipse



Структура ГСБ-106

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 – градиент (0 мин – 95%-й раствор «А», 5%-й раствор «Б»; 4 мин – 40%-й раствор «А», 60%-й раствор «Б»; 6 мин – 95%-й раствор «А», 5%-й раствор «Б»; 10 мин – 95%-й раствор «А», 5%-й раствор «Б»). Состав подвижной фазы: раствор «А» (50 мл 0,1 М раствора аммония ацетата и 5 мл муравьиной кислоты доводили деионизованной водой до общего объема 1,0 л) и раствор «Б» (50 мл 0,1 М раствора аммония ацетата и 5 мл муравьиной кислоты доводили ацетонитрилом до общего объема 1,0 л), фильтровали через мембранные фильтры с размером пор 0,22 мкм («Sartorius», Германия). Скорость потока подвижной фазы 0,35 мл/мин; тип ионизации – электроспрей (ESI) в режиме положительной ионизации; тип детектирования – режим множественных молекулярных реакций по дочерним ионам с отношением массы к заряду $m/z = 432$, $m/z = 324$ и $m/z = 129$, полученных изолированием и фрагментацией нативного молекулярного иона с отношением массы к заряду $m/z = 374$, что соответствует дважды протонированному молекулярному иону ГСБ-106; объем вводимой пробы 10 мкл. Время удерживания ГСБ-106 составляло 4,3 мин, а время анализа – 10 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, полученных из питомника «Манихино» (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 крыс хранили при –50 °С. Для подготовки образцов к анализу использовали метод преципитации белков крови с последующим отделением органической фазы от водной. Плазму крови крыс объемом 100 мкл вносили в пластиковую пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, добавляли 100 мкл водно-метанольного раствора (соотношение компонентов по объему 1:1), встряхивали на вортексе 30 с. К полученному раствору прибавляли 300 мкл ацетонитрила для преципитации белков плазмы крови, встряхивали на вортексе в течение 30 с. Полученные образцы центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 15 мин, надосадочную жидкость отделяли, после чего к ней добавляли 800 мкл дихлорметана для отделения водного слоя, встряхивали на вортексе 30 с и центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 5 мин. Далее для анализа отбирали 50 мкл верхнего водного слоя. Матричный раствор ГСБ-106 (100 мкг/мл) готовили растворением в воде деионизованной точ-

ной навески (0,0100 г) ГСБ-106 в мерной колбе вместимостью 100 мл.

Калибровочные стандарты для валидации приготовлены путем последовательного разбавления исходного/матричного раствора водой деионизованной. Валидацию методики проводили в соответствии с руководством [4].

Результаты и их обсуждение

Калибровочную кривую строили с помощью семи калибровочных стандартов, охватывающих ожидаемый диапазон концентраций ГСБ-106 в плазме крови крыс (50–1000 нг/мл). Самый низкий стандарт на калибровочной кривой соединения ГСБ-106, равный 50 нг/мл, принят в качестве предела количественного определения. Зависимость величины хроматографического пика от концентрации ГСБ-106 калибровочных стандартов в области измерения методики оказалась линейной в рассматриваемом диапазоне концентраций.

Правильность и воспроизводимость внутри одного аналитического цикла оценивали по результатам параллельных анализов образцов контроля качества с концентрацией ГСБ-106, равной 50, 250 и 1000 нг/мл. Каждый образец контроля качества определяли в шести повторностях. Расчет концентрации контрольных образцов проводили по калибровочной кривой, полученной в составе того же аналитического цикла.

Степень извлечения соединения ГСБ-106 из плазмы крови крыс определяли путем сравнения площадей хроматографических пиков образцов контроля, которые принимали за 100%, с площадями пиков тех же проб, прошедших процедуру пробоподготовки. Измерения каждого уровня концентрации стандартов (низкий – 50 нг/мл, средний – 250 нг/мл и высокий – 1000 нг/мл) проводили в трех повторностях. Установлено, что степень извлечения соединения ГСБ-106 из плазмы крови составила 82,15%.

Для оценки стабильности соединения ГСБ-106 в плазме крови использовали те же контрольные образцы, которые хранили при комнатной температуре и дневном свете после пробоподготовки в течение 8 ч. Далее проводили анализ образцов вместе со свежеприготовленными образцами в составе одного аналитического цикла. Рассчитанные значения концентрации ГСБ-106 после хранения при комнатной температуре сравнивали со средними значениями концентрации препарата в свежеприготовленных контрольных образцах. Полученные значения должны удовлетворять критерию приемлемости – модуль разницы не должен превышать 15% (таблица). Из данных, приведенных в таблице, следует, что концентрация ГСБ-106 после хранения при комнатной температуре в течение 8 ч удовлетворяет критерию приемле-

Стабильность ГСБ-106 после пробоподготовки и хранения при комнатной температуре в течение 8 ч

Показатель	Концентрация стандарта, нг/мл					
	50	250	1000	50	250	1000
	образцы после пробоподготовки			свежеприготовленные образцы		
Концентрация ГСБ-106, нг/мл	43,33	247,32	981,12	44,34	271,71	978,8
	47,82	235,67	1022,47	56,76	276,36	990,4
	48,19	239,64	983,42	52,08	261,28	1022,1
	42,07	224,00	964,37	48,64	263,32	963,2
	49,76	278,92	1014,66	43,09	270,96	1011,7
	44,36	233,67	972,34	42,96	257,91	978,6
\bar{x}	45,92	243,20	989,73	47,98	266,93	990,80
SD	3,08	19,09	23,46	5,60	7,13	22,23
CV%	6,71	7,85	2,37	11,67	2,67	2,24
Разница, %	4,12	9,49	0,11	–	–	–

мости, т.е. разница между результатами анализа до и после хранения не превышает 15%.

На основании совокупности полученных результатов можно констатировать, что проведена валидация аналитической методики количественного определения соединения ГСБ-106 в плазме крови крыс методом ВЭЖХ/МС. 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). После пробоподготовки при комнатной температуре пробы проявили стабильность на протяжении 8 ч.

Работа была поддержана Министерством образования и науки (Госконтракт №14.N08.12.0086).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yu H., Chen Z.Y. // *Acta Pharmacol. Sinica*. 2011. Vol. 32. P 3–11.
2. Середенин С.Б., Воронина Т.А., Гудашева Т.А., и т.д. // *Acta Naturae*, 2013. Т. 5 № 3 (18). С. 40–44.
3. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. Дипептидные миметики нейротрофинов NGF и BDNF: Пат. РФ № 2410392, 16.02.2009.
4. Validierung analytischer Verfahren der fictiven Firma "Muster" für die Arzneimittel-Herstellung (der Bundesverband der Arzneimittel-Hersteller (BAH)). 2004. 132 s.

Поступила в редакцию 10.10.2018

Получена после доработки 12.11.2018

Принята к публикации 15.01.2019

QUANTIFICATION OF HEXAMETHYLENEDIAMIDE BIS-(N-MONOSUCCINYL-L-SERYL-L-LYSINE (GSB-106) IN THE BLOOD PLASMA BY HPLC-MS

O.G. Grybakina^{1*}, N.B. Lopatina², E.V. Blynskaya¹, P.O. Bochkov¹,
R. V. Shevchenko¹, A.A. Litvin¹, G.B. Kolyvanov¹, V.P. Zherdev¹, S.E. Kondakov³

(¹ *Zakusov Institute of Pharmacology*; ² *First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University)*; ³ *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry*; *e-mail: pron-ox@yandex.ru)

The technique of quantitative determination of a new compound, possessing antidepressive activity, GSB-106 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 82,15%. The low limit of quantification was determined as 50 ng/ml.

Key words: GSB-106, blood plasma, HPLC-MS, quantification.

Сведения об авторах: Грибакина Оксана Геннадьевна – науч. сотр. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», канд. биол. наук (pron-ox@yandex.ru); Лопатина Наталья Борисовна – доцент кафедры организации и экономики фармации ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), канд. фарм. наук; Блынская Евгения Викторовна – зав. лабораторией готовых лекарственных форм ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», канд. фарм. наук (eaugeus@mail.ru); Бочков Павел Олегович – ст. науч. сотр. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», канд. биол. наук (bok-ov@yandex.ru); Шевченко Роман Владимирович – науч. сотр. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», канд. мед. наук (sauberg@gmail.com); Литвин Александр Алексеевич – вед. науч. сотр. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», докт. биол. наук (litbio-pharm@yandex.ru); Кольванов Геннадий Борисович – вед. науч. сотр. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», докт. биол. наук (7822535@mail.ru); Жердев Владимир Павлович – заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», докт. мед. наук (zherdevpharm@mail.ru); Кондаков Сергей Эмильевич – вед. науч. сотр. кафедры химической кинетики химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. фарм. наук (kse@excite.chem.msu.ru).