

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 615.074

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛОЗАРТАНА И ЕГО МЕТАБОЛИТА В МОЧЕ КРЫС

О.Г. Пронина, Г.Б. Колыванов, А.О. Виглинская, В.П. Жердев, Е.В. Блынская

(Учреждение Российской академии медицинских наук НИИ фармакологии им. В.В. Закусова; e-mail: pron-ox@yandex.ru)

Разработана методика количественного определения лозартана и его метаболита (Е-3174) в биологических пробах (моче крыс). Проведен анализ с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофлуориметрическим детектором. Предел обнаружения лозартана и его метаболита составил 2,5 и 5,0 нг/мл соответственно.

Ключевые слова: лозартан, Е-3174, высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектором, количественное определение.

В Учреждении Российской академии медицинских наук НИИ фармакологии им. В.В. Закусова создан оригинальный селективный анксиолитик афобазол, и крайне актуальной задачей является исследование его взаимодействия с другими лекарственными средствами [1]. Представляет интерес изучение влияния афобазола на изофермент СYP2C9 с помощью маркера – лозартана.

Лозартан-(2-Бутил-4-хлор-1-[[2'-(1Н-тетразол-5-ил)[1,1'-бифенил]-4-ил]-метил]-1Н-имидазол-5-метанол (в виде калиевой соли), внутренний активный специфический антагонист рецепторов ангиотензина II типа, применяемый для лечения первичной артериальной гипертензии. Фармакологически активный метаболит лозартана – Е-3174 (2-Бутил-4-хлор-1-[[2'-(1Н-тетразол-5-ил)[1,1'-бифенил]-4-ил]-метилимидазол-5-карбоновая кислота) [2].

Цель настоящей работы – разработка методики количественного определения лозартана и его метаболита в моче крыс на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) со спектрофлуориметрическим детектором для последующего изучения активности СYP2C9 при сочетанном применении лозартана с афобазолом.

Материалы и методы**Материалы**

Лозартан калия № 1370462 USP ROCKVILLE (США), лозартанкарбоновая кислота (Е-3174) производства «Toronto Research Chemical Inc» (США),

ацетонитрил для хроматографии марки УФ («Merck», Германия), эфир диэтиловый («х.ч.», «МедХимПром», Россия), метанол («Merck», Германия).

Методы

Для анализа проб мочи крыс использовали метод ВЭЖХ. Разделение проводили на жидкостном хроматографе, состоящем из изократической помпы «SYSTEM COLD 127» (США), спектро-флуориметрического детектора «RF-10AXL» («Shimadzu», Япония) и компьютера с пакетом программ для обсчета хроматограмм («Амперсенд», Россия).

Условия хроматографирования

В работе использовали аналитическую колонку «Luna CN» (5 мкм, 250×4,6 мм); детектирование проводили при значениях эмиссии и экстинкции 250 и 375 нм соответственно. В качестве подвижной фазы применяли смесь фосфатного буфера (рН 1,9) и ацетонитрила (315:195). Скорость потока подвижной фазы 1,0 мл/мин.

Приготовление фосфатного буфера

Однозамещенный фосфат калия (навеска 6,8 г) переносили в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводили объем до метки дистиллированной водой. В колбу (500 мл) добавляли 25 мл раствора однозамещенного фосфата калия и 0,5 мл 85%-й фосфорной кислоты. Объем полученной смеси доводили дистиллированной водой до метки. Затем с помощью

pH-метра и 85%-й фосфорной кислоты устанавливали pH 1,9.

Хроматографический анализ проводили при комнатной температуре (22–24°C). Перед хроматографированием подвижную фазу дегазировали на ультразвуковой бане, что позволило избежать появления дополнительных пиков во время анализа. Подвергавшуюся анализу пробу вводили при помощи микрошприца через инжектор в петлю хроматографа объемом 100 мкл.

Результаты и их обсуждение

Количественное определение препарата проводили методом абсолютной калибровки. Утверждение метода проводили в согласии с руководством по валидации аналитических методик для производителей лекарств [3]. Линейность методик оценивалась по семи калибровочным стандартам (2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 200 нг/мл). Стандарты готовили последовательным разбавлением смесью метанол–вода (1:1) матричного раствора лозартана (100 мкг/мл в смеси метанол–вода (1:1)) и E-3174 (100 мкг/мл в чистом метаноле). Количество лозартана и его метаболита в хроматографических фракциях определяли методом нормализации по данным калибровки с внеш-

ним стандартом. В изучаемом диапазоне (2,5–200,0 нг/мл) концентраций (C) отмечена линейная зависимость между концентрацией анализируемого соединения и соответствующей площадью пика, усредненное значение которой описывается следующим уравнением (n = 7):

$$\text{для лозартана } S = -65,53 + 89,14 \cdot C \quad (r = 0,9999),$$

$$\text{для E-3174 } S = -405,29 + 53,0 \cdot C \quad (r = 0,9998),$$

где S – площадь хроматографического пика вещества (в единицах интегрирования хроматографа), C – концентрация в нг/мл, r – коэффициент корреляции.

Разработанная методика была метрологически оценена на растворах стандартного образца лозартана и E-3174. Полученные результаты представлены в табл. 1, 2. Относительная ошибка определения лозартана для концентрации 2,5 нг/мл составила 9,1%. Относительная ошибка определения E-3174 для концентрации 5 нг/мл составила 6,1%.

Предел обнаружения лозартана и E-3174 для разработанного метода составил 2,5 и 5 нг/мл соответственно. В этих условиях время удерживания лозартана в среднем составило 9 мин, а его метаболита – 6 мин. Коконстрактивные вещества не мешали определению (рисунок).

Т а б л и ц а 1

Метрологические характеристики методики определения лозартана

Взято (нг/мл)	Найдено нг/мл						\bar{x}	SD	$S_{\bar{x}}$	$\Delta \bar{x}$	ε%
	2,4	2,5	2,3	2,2	2,6	2,8					
2,5	2,4	2,5	2,3	2,2	2,6	2,8	2,47	0,216	0,088	0,226	9,1
5,0	6,0	5,7	5,9	6,2	6,5	6,2	6,08	0,279	0,114	0,293	4,8
10,0	9,8	10,3	10,5	10,1	9,5	10,4	10,10	0,385	0,157	0,403	4,0

Примечание. \bar{x} – среднее арифметическое результатов измерений; SD – стандартное отклонение; $S_{\bar{x}}$ – стандартное отклонение от среднего арифметического; $\Delta \bar{x}$ – абсолютная погрешность измерений; ε% – относительная погрешность измерений.

Т а б л и ц а 2

Метрологические характеристики методики определения E-3174

Взято (нг/мл)	Найдено нг/мл						\bar{x}	SD	$S_{\bar{x}}$	$\Delta \bar{x}$	ε%
	7,5	7,9	8,3	7,1	8,0	8,2					
5	7,5	7,9	8,3	7,1	8,0	8,2	7,83	0,455	0,186	0,478	6,1
10	12,0	12,7	13,3	13,5	13,4	13,0	12,98	0,564	0,230	0,591	4,5
25	24,9	26,5	25,3	24,8	25,1	26,0	25,43	0,674	0,275	0,707	2,8

Примечание. \bar{x} – среднее арифметическое результатов измерений; SD – стандартное отклонение; $S_{\bar{x}}$ – стандартное отклонение от среднего арифметического; $\Delta \bar{x}$ – абсолютная погрешность измерений; ε% – относительная погрешность измерений.

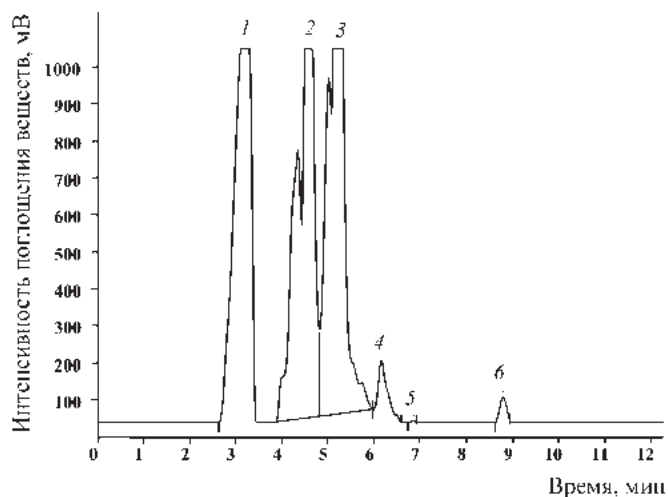


Рис 1. Хроматограмма суточной мочи крысы после перорального введения лозартана в дозе 30 мг/кг (1, 2, 3, 5 – пики коэкстрактивных веществ, 4 – метаболит, 6 – лозартан)

Определение процента экстракции Лозартана и его метаболита из биоматериала

Установлено, что диэтиловый эфир является лучшим экстрагентом лозартана из биоматериала (мочи крыс). В целях определения полноты экстракции лозартана и его метаболита готовили стандартные растворы в смеси метилового спирта и воды (1:1) (растворы лозартана с концентрацией 50, 100 и 200 нг/мл и E-3174 с концентрацией 100, 200 и 500 нг/мл). В экстракционную пробирку к 0,90 мл биоматериала (мочи крыс) прибавляли 0,05 мл стандартного раствора лозартана и 0,05 мл стандартного раствора E-3174, тщательно перемешивали и инкубировали на водяной термостатической бане при 37°C в течение 1 ч. Затем в экстракционную пробирку добавляли 20 мл диэтилового эфира и встряхивали на механическом горизонтальном шейкере в течение 15 мин. Пробирку с эфирным слоем переносили в мо-

розильник с температурой –18°C до замораживания водной фазы (20–30 мин). Далее органический слой переносили в выпарительную колбу. Процедуру экстракции повторяли дважды. Объединенный эфирный экстракт выпаривали досуха на роторном испарителе. Сухой остаток растворяли в смеси метилового спирта и воды (1:1), а затем аликвоту (100 мкл) вводили в петлю инжектора.

Результаты исследования показали, что экстракция лозартана и метаболита составила 83,4±4,64 и 86,4±5,10% соответственно (среднее из 3 определений). Полученные результаты представлены в табл. 3, 4. Установлено, что метод ВЭЖХ со спектрофлуорометрическим детектором может применяться для количественного определения лозартана и его метаболита в биопробах. Метод обладает рядом достоинств: время определения каждой пробы составляет около 10 мин, подготовка проб проста в исполнении.

Т а б л и ц а 3

Процент извлечения лозартана из мочи крыс

Взято (нг/мл)	Найдено (%)			\bar{x}	SD
2,5	77,5	91,4	85,2	84,7	6,96
5,0	87,3	83,6	79,2	83,4	4,06
10,0	83,1	84,3	78,8	82,1	2,89
Среднее значение				83,4	4,64

Т а б л и ц а 4

Процент извлечение E-3174 из мочи крыс

Взято (нг/мл)	Найдено (%)			\bar{x}	SD
5,0	78,3	90,1	92,5	87,0	7,60
10,0	89,5	91,4	82,1	87,7	4,91
25,0	86,4	81,2	85,6	84,4	2,80
Среднее значение				86,4	5,10

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жердев В.П., Виглинская А.О., Колыванов Г.Б., Литвин А.А. Взаимодействие лекарственных средств в зависимости от направления и интенсивности их биотрансформации. // Тез. 5-й Межд. конф. «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам». М., 2010. С. 15.
2. Christine I., Furtek I., Man-Wai Lo // J. Chromatog. В.573. 1991. Р. 295.
3. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / Под ред. В.В. Береговых. М., 2008.

Поступила в редакцию 20.10.11

QUANTITATIVE DETERMINATION OF LOSARTANA AND E-3174 METABOLITE IN RAT URINE

O.G. Pronina, G.B. Kolyvanov, A.O. Viglinskaya, V.P. Zherdev, E.V. Blynskaya

(State Zakusov Research Institute of pharmacology under the Russian Academy of Medical Sciences)

A technique for quantitative determination of losartana and metabolite in biological liquids (the urine of rats) was developed. An analysis was carried out with the employment of high-performance liquid chromatography coupled with a fluorescence detector. The techniques determination limit of losartana and E-3174 was calculated as 2,5 ng/ml and 5 ng/ml, respectively.

Key words: *Losartan. E-3174, high-performance liquid chromatography coupled with a fluorescence detector; quantitative determination.*

Сведения об авторах: *Пронина Оксана Геннадьевна – аспирант лаборатории фармакокинетики НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН (pron-ox@yandex.ru); Колыванов Геннадий Борисович – вед. науч. сотр. лаборатории фармакокинетики НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, докт. биол. наук; Виглинская Анастасия Олеговна – ст. науч. сотр. лаборатории фармакокинетики НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, канд. мед. наук; Жердев Владимир Павлович – профессор, руководитель лаборатории фармакокинетики НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, докт. мед. наук; Блынская Евгения Викторовна – ст. науч. сотр. лаборатории готовых лекарственных форм НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, канд. фарм. наук.*