

УДК 615.074

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕКСАМЕТИЛЕН- ДИАМИД *БИС*-(*N*-МОНОСУКЦИНИЛ-*L*-ГЛУТАМИЛ-*L*- ЛИЗИНА) В ПЛАЗМЕ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЭЖХ/МС

А.А. Литвин, Г.Б. Колыванов, Е.В. Блынская*, О.Г. Грибакина, П.О. Бочков,
Р.В. Шевченко, В.П. Жердев

(ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»;
*e-mail: litbiopharm@yandex.ru)

Разработана методика количественного определения гексаметилендиамид *бис*-(*N*-моносукцинил-*L*-глутамил-*L*-лизина) (ГК-2) в плазме крови крыс методом ВЭЖХ/МС. Методика линейна в диапазоне 10–1000 нг/мл. Установлено, что степень извлечения ГК-2 из плазмы крови 81,62%, нижний предел количественного определения составил 10 нг/мл.

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

В настоящее время отмечается рост больных с патологиями, сопровождающимися нейродегенеративными процессами, такими как болезнь Альцгеймера. Вовлеченность фактора роста нервов (NGF) в патогенез болезни Альцгеймера хорошо известна. Однако использование самого фактора роста нервов ограничивается его нестабильностью в биологических жидкостях, плохой способностью проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), возможностью иммунной реакции, наличием побочных эффектов за счет его плейотропности. Перспективный подход к регуляции системы фактора роста нервной ткани в центральной нервной системе – создание (конструирование и синтез) низкомолекулярных миметиков факторов роста, взаимодействующих с соответствующими рецепторами [1].

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» на основе структуры β -изгиба четвертой петли NGF создан димерный дипептидный миметик гексаметилендиамид *бис*-(*N*-моносукцинил-*L*-глутамил-*L*-лизин) (далее ГК-2) [2]. ГК-2, как и NGF, вызывает фосфорилирование специфических рецепторов TrkA и Akt-киназ, вовлеченных в реализацию нейропротективных эффектов, опосредуемых данными рецепторами [3]. Один из основных этапов разработки нового лекарственного средства – изучение его экспериментальной и клинической фармакокинетики.

Цель настоящего исследования – разработка и валидация методики количественного опреде-

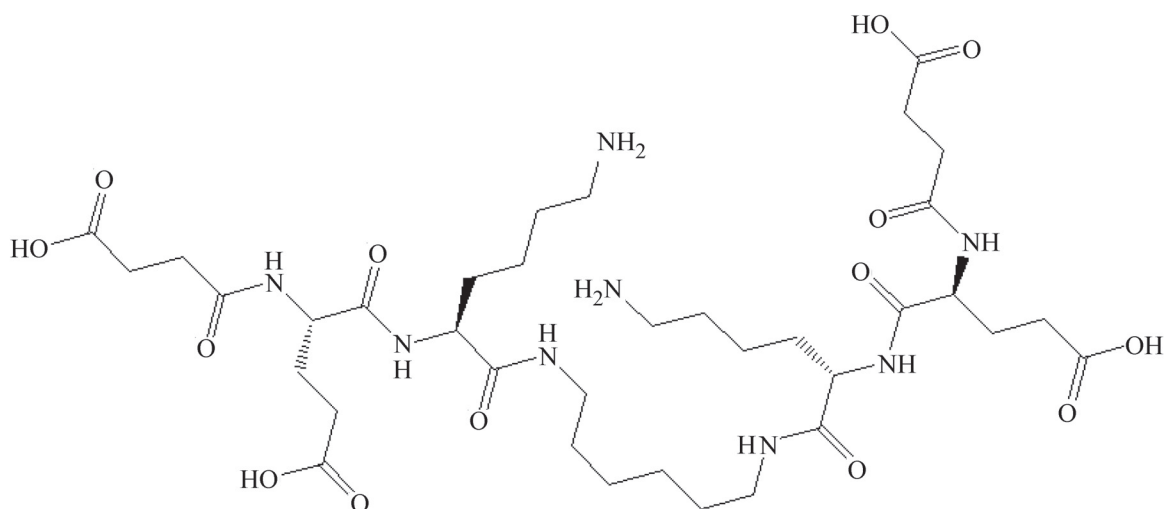
ления ГК-2 в плазме крови крыс с использованием ВЭЖХ/МС.

Материалы и методы

Структурная формула исследуемого вещества ГК-2 приведена на рисунке. В работе использовали фармацевтическую субстанцию ГК-2, синтезированную в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (серия 13-88); 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); хлористый метилен («ч.д.а.», «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 при атмосферном давлении и управляемым компьютером с системой обработки данных «ChemStation» (v.1.0).

Условия проведения хромато-масс-спектрометрического анализа. 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



Структурная формула гексаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-глутамил-*L*-лизина)

колонки 30 °С, режим элюирования изократический.

Состав подвижной фазы. Раствор А (50 мл 0,1 М раствора аммония ацетата и 5 мл муравьиной кислоты доводили деионизованной водой до 1,0 л) и раствор Б (50 мл 0,1 М раствора аммония ацетата и 5 мл муравьиной кислоты доводили ацетонитрилом до 1,0 л) фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм «Sartorius» (ФРГ) и смешивали растворы А и Б в объемном соотношении 88:12. Скорость потока подвижной фазы 0,35 мл/мин, тип ионизации – электроспрей (ESI) в режиме положительной ионизации, детектирование по молекулярному иону с массовым числом $m/z = 416$ (что соответствует дважды протонированному молекулярному иону ГК-2), объем вводимой пробы 25 мкл. Время удерживания ГК-2 составило 1,3 мин, время анализа – 3 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 готовили 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 про-

бирку, добавляли 100 мкл водно-метанольного раствора (объемное соотношение компонентов 50:50) и 50 мкл 2%-го водного раствора аммиака, встряхивали на вортексе 30 с. К полученному раствору добавляли 300 мкл ацетонитрила для преципитации белков плазмы крови, встряхивали на вортексе 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, встряхивали на вортексе и центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 5 мин. Для анализа отбирали около 50 мкл верхнего водного слоя. Матричный раствор ГК-2 (100 мкг/мл) готовили растворением точной навески (0,0100 г) ГК-2 в деионизованной воде, используя мерную колбу вместимостью 100 мл.

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

Результаты и обсуждения

Калибровочную кривую строили с помощью семи калибровочных стандартов, охватывающих ожидаемый диапазон концентраций ГК-2 в плазме крови крыс (10–1000 нг/мл). Самый низкий стандарт на калибровочной кривой соединения ГК-2, равный 10 нг/мл, принят в качестве нижнего предела количественного определения. Зависимость площади хроматографического пика от концентрации калибровочных стандартов ГК-2 в области измерения методики линейна

Стабильность ГК-2 после пробоподготовки и хранения при комнатной температуре в течение 8 ч

Показатель	Образцы после пробоподготовки			Свежеприготовленные образцы		
	КК А 50 нг/мл	КК Б 250 нг/мл	КК В 1000 нг/мл	КК А 50 нг/мл	КК Б 250 нг/мл	КК В 1000 нг/мл
Калибровочная кривая 2	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	–	–	–

в рассматриваемом диапазоне концентраций и описывается уравнением

$$S = -416439,67 + 22846,66 \times C \quad (r = 0,9899),$$

где S – площадь хроматографического пика (единицы интегрирования), C – концентрация в плазме крови (нг/мл), r – коэффициент корреляции.

Правильность и воспроизводимость внутри одного аналитического цикла оценивали по результатам параллельных анализов образцов контроля качества с концентрацией ГК-2, равной 50, 250 и 1000 нг/мл. Каждый образец контроля качества определяли в шести повторностях. Расчет концентраций образцов контроля качества проводили по калибровочной кривой, полученной в составе того же аналитического цикла.

Степень извлечения соединения ГК-2 из плазмы крови крыс определяли путем сравнения площади хроматографических пиков образцов контроля качества, которая принималась за 100%, с площадью пиков проб, прошедших процедуру пробоподготовки. Измерения каждого уровня концентрации стандартов (низкий – 50 нг/мл, средний – 250 нг/мл, высокий – 1000 нг/мл) проводили в трех повторностях. Установлено, что степень извлечения соединения ГК-2 из плазмы крови составляет 81,62%.

Для оценки стабильности соединения ГК-2 в плазме крови использовали образцы контроля качества, которые хранились после пробопод-

готовки при комнатной температуре и дневном свете в течение 8 ч. Далее проводили анализ этих образцов вместе со свежеприготовленными образцами в составе одной аналитической серии. Рассчитанные концентрации ГК-2 после хранения при комнатной температуре сравнивали со средними значениями концентраций препарата в свежеприготовленных образцах контроля качества. Полученные значения должны были удовлетворять критерию приемлемости (модуль разницы не должен превышать 15%). Результаты представлены в таблице.

Из данных таблицы следует, что величина концентрации ГК-2 после хранения при комнатной температуре в течение 8 ч удовлетворяет 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 ГК-2 в плазме крови крыс методом ВЭЖХ/МС. Нижний предел количественного определения методики составил 10 нг/мл. Правильность и воспроизводимость результатов анализа с учетом критериев приемлемости соблюдались во всем интервале исследуемых концентраций (10–1000 нг/мл). После проведения пробоподготовки при комнатной температуре пробы оставались стабильными на протяжении 8 ч.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Obianyo O.* // Biochim. Biophys Acta. 2013. Vol. 1834. № 10. P. 2213.
2. *Середенин С.Б., Гудашева Т.А.* // Пат. РФ. 2010. № 2410392.
3. *Gudasheva T.A., Povarnina P.Yu., Antipova T.A., Seredenin S.B.* // Neuroscience & Medicine. 2014. Vol. 5. N 2. P. 101.
- 4 Validierung analytischer Verfahren der fictiven Firma "Muster" für die Arzneimittel-Herstellung (der Bundesverband der Arzneimittel-Hersteller (BAH)), 2004.

Поступила в редакцию 20.12.2018
Получена после доработки 25.12.2018
Принята к публикации 15.01.2019

QUANTIFICATION OF HEXAMETHYLENEDIAMIDE *BIS*-(*N*-MONOCUCCINYL-*L*-GLUTAMYL-*L*-LYSINE) IN THE BLOOD PLASMA BY HPLC-MS

A.A. Litvin, G.K. Kolyvanov, E.V. Blynskaya*, O.G. Grybakina, P.O. Bochkov, R.V. Shevchenko, V.P. Zherdev

*(Federal State Budgetary Institution "Research Zakusov Institute of Pharmacology"; *e-mail: litbiopharm@yandex.ru)*

The technique of quantitative determination of a new compound hexamethylenediamide *bis*-(*N*-monosuccinyl-*L*-glutamyl-*L*-lysine (GK-2) in the rat blood plasma was developed and validated. The method was linear in the range of 10–1000 ng/ml. Recovery of GK-2 was 81.62%. The low limit of quantification was determined as 10 ng/ml.

Key words: hexamethylenediamide *bis*-(*N*-monosuccinyl-*L*-glutamyl-*L*-lysine, blood plasma, HPLC-MS, quantification, Alzheimer's disease.

Сведения об авторах: *Литвин Александр Алексеевич* – вед. науч. сотр. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», докт. биол. наук (litbiopharm@yandex.ru); *Колыванов Геннадий Борисович* – вед. науч. сотр. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», докт. биол. наук (7822535@mail.ru); *Блынская Евгения Викторовна* – зав. лабораторией готовых лекарственных форм ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», докт. фарм. наук (eaugeus@mail.ru); *Грибакина Оксана Геннадьевна* – сотр. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», канд. биол. наук, науч. (rpon-ox@yandex.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 (sauberr@gmail.com); *Жердев Владимир Павлович* – зав. лабораторией фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», докт. мед. наук (zherdevpharm@mail.ru).