

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2013

Е. В. Иванникова, С. С. Бойко, Д. В. Бастрыгин, В. П. Жердев,
Т. А. Гудашева

МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГБ-115 В БИОМАТЕРИАЛЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЭЖХ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТОРОМ

Федеральное государственное бюджетное учреждение “Научно-исследовательский институт фармакологии имени В. В. Закусова” Российской академии медицинских наук”, Москва, Россия, e-mail: cathyin@mail.ru

Разработана методика количественного определения фармакологически активного соединения, обладающего анксиолитическим действием — ГБ-115. Определены условия оптимальной экстракции ГБ-115 из биологического материала, количественное определение проводилось с использованием метода ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором. Предел обнаружения ГБ-115 составил 1 нг/мл.

Ключевые слова: ГБ-115, ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором, фармакокинетика.

В ФГБУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” РАМН создан оригинальный дипептидный аналог холецистокенина-4 анксиолитик ГБ-115 (амид N-6-фенилгексаноил-глицил-L-триптофана), фармакологически изученный в работах [1 – 5]. Продвижение этого соединения требует экспериментального изучения его фармакокинетики, которое должно дать информацию о всасывании, распределении, метаболизме и выделении соединения.

В связи с этим целью настоящей работы явилась разработка высокочувствительного метода количественного определения ГБ-115 в плазме крови животных и человека на основе ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором.

Экспериментальная часть

В работе использовали следующие соединения: дипептид ГБ-115 синтезирован в отделе химии ФГБУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” РАМН; ацетат аммония (Реахим, Россия); ацетонитрил для хроматографирования, муравьиная кислота, вода дистиллированная (Merck, Германия).

Анализ проб стандартных растворов ГБ-115 проводили с использованием метода ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором. Разделение проводили с помощью хроматографа “Agilent Technologies”, серии 1200 (США), детектора “Agilent 6300 series ion-trap” (США) и компьютера с соответствующим пакетом для обчёта хроматограмм. Разработка методики экстракции ГБ-115 с последующим его количественным определением проводилась с использованием различных экстрагентов.

Хроматографирование проводили с помощью аналитической колонки: Sorbax C18, 150 × 2,1 мм; элюент — 1 л водного раствора с добавлением 50 мл 0,1 М раствора ацетата аммония и 5 мл муравьиной кислоты: 100 % ацетонитрила (А: В); детектор: масс-спектрометрия электрораспылением с анализатором — ионная ловушка; температура колонки 30 °С, объём вкола: 1 µL; скорость потока элюента 0,25 мл/мин.

Приготовление подвижной фазы (раствор А).

Приготовление 0,1 М раствора ацетата аммония: 1,54 г порошка растворяют в 200 мл деионизированной воды.

1. Раствор А: к 50 мл 0,1 М раствора ацетата аммония добавляли 5 мл муравьиной кислоты и доводили объём раствора водой до 1 л. Полученный раствор фильтровали через фильтр Millipore (0,45 мкм) и дегазировали под вакуумом, что позволило избежать дополнительных пиков во время анализа.

2. Раствор В: 100 % ацетонитрил.

Результаты и их обсуждение

Для разработки метода количественного определения необходимо было учесть ряд параметров данной системы детектирования определяемого соединения ГБ-115:

Тип ионизации соединения (положительная/отрицательная);

Значение рН подвижной фазы (кислая/нейтральная);

Режим элюирования (изократический/градиентный);

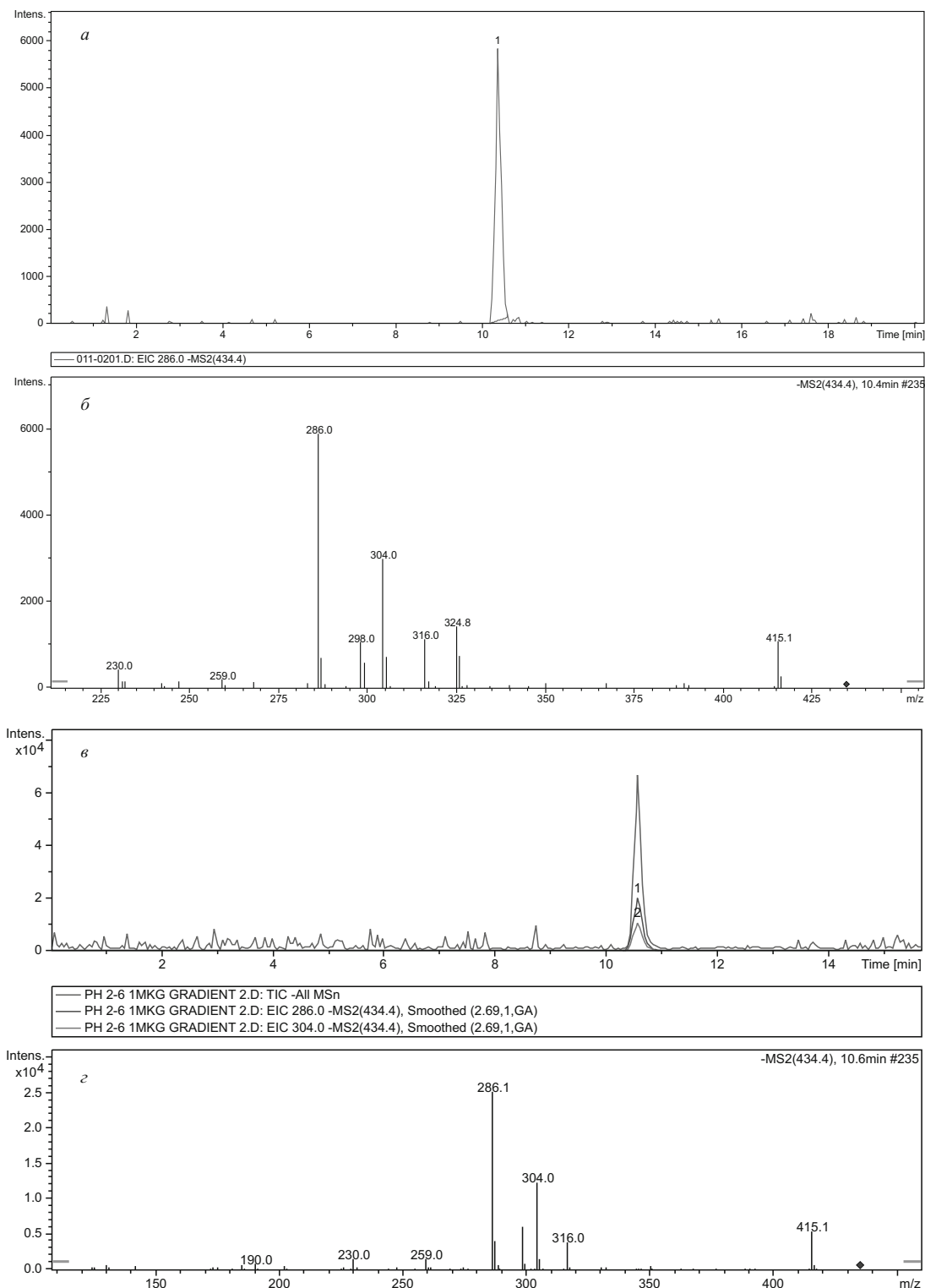


Рис. 1. Анализ стандартного раствора ГБ-115 методом ВЭЖХ-МС в режиме градиентного элюирования: *а*) хроматограмма по иону m/z 286 (пик 1). По оси ординат — интенсивность сигнала, мА; по оси абсцисс — время, мин; *б*) масс-спектр. По оси ординат — интенсивность сигнала, мА; по оси абсцисс — соотношение массы иона к заряду, m/z . Основные фрагменты исследуемого соединения ГБ-115 с наибольшей интенсивностью: 286, 304; *в*) хроматограмма по полному ионному току (ТIC). По оси ординат — интенсивность сигнала, мА; по оси абсцисс — время, мин. *г*) масс-спектр. По оси ординат — интенсивность сигнала, мА; по оси абсцисс — соотношение массы иона к заряду, m/z . Основные фрагменты исследуемого соединения ГБ-115 с наибольшей интенсивностью: 286, 304.

Изменение процентного соотношения подвижных фаз во времени (для градиентного элюирования).

В результате позитивной ионизации образуется ряд положительных ионов с m/z 473, 457, 435, 418, которые предположительно соответствуют катионирован-

ным молекулярным ионам $[M + K]^+$, $[M + Na]^+$, $[MH]^+$ и $[MH - NH_3]^+$ соответственно. Наличие большого количества пиков затрудняет количественное определение анализируемого вещества. Поэтому была выбрана негативная ионизация, посредством которой образует-

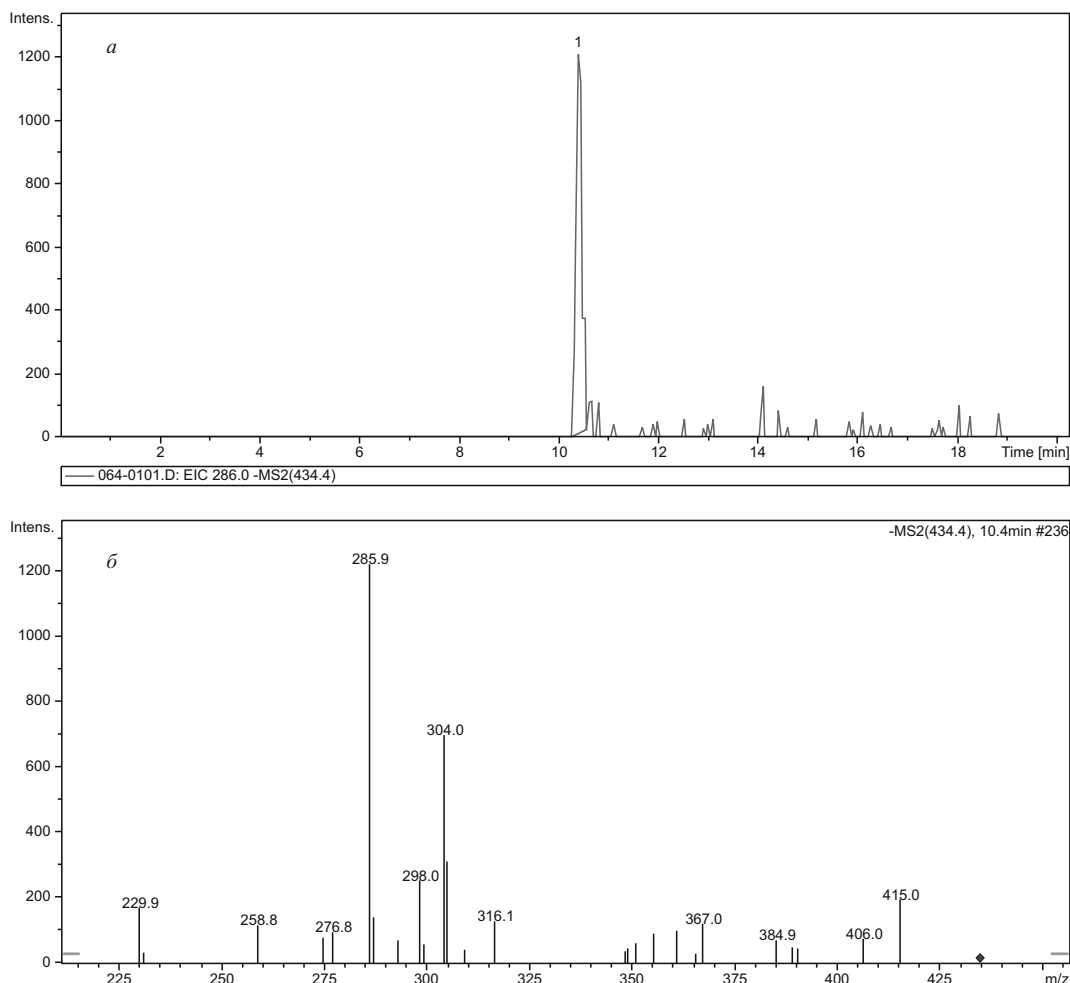


Рис. 2. Анализ соединения ГБ-115, выделенного из плазмы крови животных, методом ВЭЖХ-МС в режиме градиентного элюирования: *a*) хроматограмма по иону m/z 286 (пик 1). По оси ординат — интенсивность сигнала, мА; по оси абсцисс — время, мин. *б*) масс-спектр. По оси ординат — интенсивность сигнала, мА; по оси абсцисс — соотношение массы иона к заряду, m/z . Основные фрагменты исследуемого соединения ГБ-115 с наибольшей интенсивностью: 286, 304.

ся один отрицательный ион с m/z 434, который в дальнейшем подвергается фрагментации с образованием ионов с массовыми числами 286 и 304, что предположительно соответствует следующим фрагментам: ацетат глицил-L-триптофана и гидроксильированный ацетат глицил-L-триптофана соответственно.

После экспериментального подбора рН элюента наилучшие показатели чувствительности детектирования наблюдались при рН 2,6.

Известно, что при определении коротких пептидов оптимальной методикой является анализ соединений с помощью градиентного элюирования. Градиент был подобран экспериментальным путём:

Время, мин	Процент фазы А
0	10 %
5	60 %
7	80 %
12	80 %
15	10 %

В этих условиях на хроматограмме (рис. 1) чётко виден пик ГБ-115, площадь которого соответствует концентрации 100 нг/мл соединения ГБ-115: время выхода соединения — 10,8 мин, что является опти-

мальным для анализа биопроб, кроме того удалось добиться симметричного пика.

Выбор оптимального экстрагента

Следующим этапом в разработке методики количественного определения ГБ-115 является выбор оптимальной экстракции неизменного соединения и возможных его продуктов биотрансформации. Экспериментальным путём установлено, что лучшими экстрагентами для соединения ГБ-115 являются диэтиловый эфир и хлороформ. Гексан может применяться лишь для очистки, так как ГБ-115 не растворяется в нём. Этилацетат также показал низкие результаты экстракции в ходе экспериментов. На основе проведённых исследований предложен следующий метод пробоподготовки: к 1 мл плазмы крови крыс, содержащей ГБ-115, добавляют двукратный объём ацетонитрила (2 мл) для осаждения белков. Водно-ацетонитрильный раствор центрифугируют при $T = 2^\circ\text{C}$ со скоростью 8000 об/мин в течение 10 мин. Далее отбирают очищенную от белков плазму, добавляют 6 мл хлороформа, встряхивают в течение 15 мин, отделяют хлороформный слой и высушивают в токе азота, остаток растворяют в элюенте и вводят в систему

ВЭЖХ-МС. Процент экстракции эфиром составляет $15 \pm 7\%$, хлороформом — $57 \pm 8\%$. После проведения двойной экстракции удалось повысить эти показатели до $20 \pm 7\%$ и $65 \pm 8\%$ соответственно.

На основе разработанной методики удалось выделить исследуемое соединение из плазмы крови животных и проанализировать полученные образцы с помощью ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором. На спектрограмме показан пик основного иона ГБ-115 с m/z 286, площадь которого соответствует концентрации 20 нг/мл соединения ГБ-115 (рис. 2).

Таким образом, разработанный метод является точным, селективным и пригодным для изучения низких концентраций соединения ГБ-115, полученных из плазмы крови животных с помощью экстракции указанным способом.

Установлено, что представленный метод ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором может приме-

няться для количественного определения соединения ГБ-115. Метод является точным, воспроизводимым, селективным и, таким образом, пригодным для изучения фармакокинетики ГБ-115 в экспериментах на животных и у людей в случае его внедрения в клиническую практику.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Гудашева, Е. П. Кирьянова, Л. Г. Колик и др., *Биоорганическая химия*, **33**(4), 413 – 420 (2007).
2. С. С. Бойко, Г. Б. Кольванов, В. П. Жердев и др., *Бюл. экпер. биол. мед.*, **144**(9), 285 – 287 (2007).
3. С. Б. Середенин, Н. М. Смольникова, Е. П. Немова и др., *Эксперим. клин. фармакол.*, № 6, 29 – 32 (2010).
4. Л. Г. Колик, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин и др., *Эксперим. клин. фармакол.*, **135**(5), 519 – 523 (2003).
5. Л. Г. Колик, Т. Л. Гарибова, С. А. Литвинова и др., *Вестн. Рос. АМН*, № 7, 37 – 41 (2011).

Поступила 03.04.12

QUANTITATIVE DETERMINATION OF DIPEPTIDE GB-115 IN BIOLOGICAL MEDIA BY HPLC/MS

E. V. Ivannikova*, S. S. Boiko, D. V. Basrtrygin, V. P. Zherdev, and T. A. Gudasheva

Zakusov State Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125315 Russia;

* e-mail: cathyin@mail.ru

A new chromatographic method for the quantitative determination of an active peptide substance GB-115 has been developed. The conditions of peptide extraction from biological materials are found and quantitative determination has been carried out with the use of high-performance liquid chromatography (HPLC) with mass-spectrometric detection. The detection limit of GB-115 by HPLC/MS is 1 ng/ml.

Keywords: GB-115, HPLC/MS, pharmacokinetics

КАРЬЕРА В ОБЛАСТИ ФАРМПРОИЗВОДСТВА

Вакансии фармацевтических компаний

Руководитель участка производства Обнинск, АстраЗенека +7 (495) 7995699 job.production@astrazeneca.com	Руководитель группы выпуска серии (отдел обеспечения качества) Калуга, Ново Нордиск +7 (910) 9100098 nale@novonordisk.com	Начальник отдела контроля качества Москва, Apriori-Talentor +7 (495) 2878984 pharma@apriori-talentor.ru
Специалист по обеспечению качества Обнинск, АстраЗенека +7 (495) 7995699 job.production@astrazeneca.com	Химик-аналитик 2 категории Санкт-Петербург, БИОКАД +7 (911) 8169558 kuzmenko@biocad.ru	Инженер-технолог по новым препаратам Егорьевск, ГЕДЕОН РИХТЕР-РУС +7 (495) 7888630 FilyaevaES@rg-rus.ru
Химик по валидации Москва, Валента +7 (495) 9336080 cv@valentapharm.com	Химик-аналитик 3 категории Москва, БИОКАД +7 (911) 8169558 kuzmenko@biocad.ru	Биохимик Санкт-Петербург, БИОКАД +7 (911) 8169558 kuzmenko@biocad.ru
Химик Москва, Валента +7 (495) 9336080 cv@valentapharm.com	Научный сотрудник (биохимик) Чехов, БИОКАД +7 (911) 8169974 nikitinaya@biocad.ru	Заведующий микробиологической лабораторией Егорьевск, ГЕДЕОН РИХТЕР-РУС +7 (495) 7888630 FilyaevaES@rg-rus.ru
Химик Истра, КРКА ФАРМА +7 (495) 9811095 HR.RU@krka.biz	Биотехнолог Москва, БИОКАД +7 (911) 8169974 nikitinaya@biocad.ru	Техник-лаборант Егорьевск, ГЕДЕОН РИХТЕР-РУС +7 (495) 7888630 FilyaevaES@rg-rus.ru

Подробнее об этих и других вакансиях на www.pharmpersonal.ru

Размещение вакансий: +7 (926) 530 66 79