

И. И. Мирошниченко, Н. И. Юрченко

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОМЕПРАЗОЛА И ЛАНСОПРАЗОЛА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ

НЦПЗ РАМН, ОАО Химико-Фармацевтический комбинат "Акрихин", п. Старая Купавна, Московская обл.

Противоязвенные препараты нового поколения омепразол и лансопразол являются ингибиторами "протонового насоса" [1]. Производное бензимидазола омепразол имеет следующую структуру: 5-метокси-2-[[4-(метокси-3,5-диметил-2-пиридинил)метил]сульфинил]-1Н-бензимидазол. Лансопразол является структурно родственным омепразолу соединением, отличаясь от последнего лишь наличием трифторэтоксигруппы в пиридиновом кольце и отсутствии метил- и метокси-групп в пиридиновом и бензимидазольном кольце, соответственно. Оба препарата являются слабыми основаниями и подвергаются быстрой деградации в кислой среде. Благодаря тому, что омепразол и лансопразол применяются в виде гранул, имеющих кислотоустойчивое покрытие, они не разрушаются в желудке и всасываются в тонком кишечнике [2].

В настоящее время разработан ряд методических подходов для количественного определения вышеуказанных препаратов в биологических субстратах, включающих спектрофотометрию [3] и высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) [4–7]. Следует отметить, что предложенные подходы требуют дериватизацию образцов [3], сложные методы твердофазной [4] и on-line экстракции [5, 6] наряду с масс-спектрографической детекцией [4]. В представленной работе излагается метод количественного определения омепразола и лансопразола, основанный на ВЭЖХ с жидкостной экстракцией.

Экспериментальная часть

Для экстракции препаратов из проб и проведения хроматографического анализа экстрактов использовали следующие реактивы и органические растворители: Na_2CO_3 , (ч.д.а.), NaOH (х.ч.), KH_2PO_4 (WAKO, Япония), K_2HPO_4 (WAKO, Япония), H_3PO_4 (WAKO, Япония), диэтиловый эфир (ч.д.а.), метанол (х.ч.), ацетонитрил (Merck, Германия). Маточные растворы лансопразола и омепразола (1 мг/мл) готовили в метаноле. Сразу после растворения к маточным растворам добавляли 1 М Na_2CO_3 из расчета 50 мкл на 1 мл раствора. В таких условиях маточный раствор стабилен при температуре 4°C в течение месяца. Рабочие растворы для построения калибровочных графиков готовили в день эксперимента путем соответствующего разбавления маточного раствора 0,1 н. NaOH .

Отбор крови у экспериментальных животных для фармакокинетических исследований производился в пробирки с разделяющим гелем Vacuette, содержащие в качестве антикоагулянта литиевую соль гепарина.

Пробы крови центрифугировали в течение 15 мин при $n = 4000$ об/мин и отбирали по 0,5 мл плазмы. Поскольку исследуемые препараты разлагаются при малых значениях pH, к плазме добавляли 25 мкл 1 М

Na_2CO_3 . До анализа пробы плазмы хранили при температуре – 18°C.

Во все образцы плазмы крови (объем 0,5 мл), включая нулевую и стандартную (2,5 мкг/мл), добавляли в качестве внутреннего стандарта 25 мкл раствора лансопразола (при анализе омепразола 50 мкг/мл) или 25 мкл раствора омепразола в той же концентрации (при анализе лансопразола). Затем образцы энергично встряхивали на вибромиксере "Vortex" фирмы Labomed (Германия) и экстрагировали 2 мл смеси диэтилового эфира и дихлорметана (9:1 по объему). Пробы помещали на горизонтальный встряхиватель в течение 10 мин и затем центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин. Органический слой отбирали в пробирки и проводили реэкстракцию 500 мкл 0,1 н. NaOH : пробы помещали на горизонтальный встряхиватель в течение 10 мин и затем центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин. Остатки эфира в водной фазе удаляли путем продувания проб азотом. Аликвоту водной фазы объемом 100 мкл инжестировали в хроматограф.

Анализ проб с целью определения концентрации омепразола в образцах осуществляли методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе в следующей комплектации:

1. насос высокого давления Pump 64 Knauer (Германия);
2. спектрометрический детектор АО293 Knauer (Германия);
3. компьютерный интегратор Chromalopac C-R6A (Shimadzu — Europe GmbH, Германия);
4. инжектор модели 7125 (Rheodyne, США) с объемом петли 100 мкл.

Для количественного определения омепразола и лансопразола в плазме крови применяли спектрофотометрический детектор при длине волны поглощения $\lambda = 302$ нм (для омепразола) или $\lambda = 285$ нм (в случае лансопразола).

Колонка — Spherisorb C_8 , 5 мкм, 250 · 4,6 мм (Bischoff, Германия). Преколонка — 10 · 4 мм, 10 мкм. Элюент состоял из смеси 0,2 М KH_2PO_4 (pH 7,1) и ацетонитрила 66 % и 34 % по объему. Скорость элюирования равнялась 1,5 мл/мин. Объем вводимой в хроматограф пробы — 100 мкл. Время удерживания омепразола $7,8 \pm 0,2$ мин, внутреннего стандарта (лансопразола) $12,0 \pm 0,2$ мин. Типичные хроматограммы приведены на рис. 1.

Хроматограммы обрабатывали с использованием компьютерного интегратора "Chromatopac C-R6A" ("Shimadzu-Europa GmbH", Германия). Концентрацию изучаемых веществ в образцах вычисляли по методу внутреннего стандарта. Предел обнаружения препарата при этих условиях 20 нг/мл.

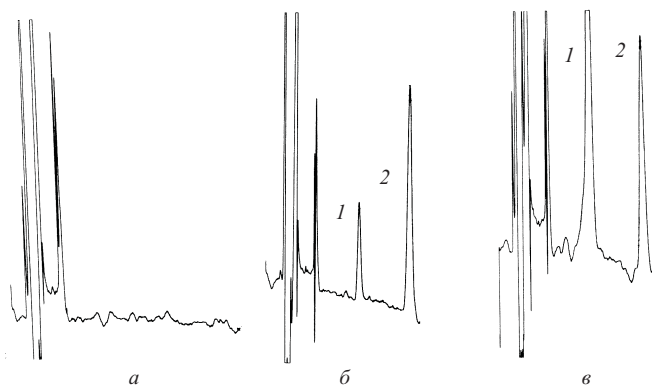


Рис. 1. Типичные ВЭЖХ-хроматограммы проб плазмы крови, содержащих омепразол (1) и лансопразол (2). Времена удерживания омепразола $7,8 \pm 0,2$ мин, лансопразола — $12,0 \pm 0,2$ мин. *a* — холодная проба, *б* — стандартный образец с концентрацией омепразола 0,5 мкг/мл и лансопразола 2,5 мкг/мл, *в* — проба плазмы крови спустя 2 ч после введения крысе лосека в дозе 50 мг/кг.

Результаты и их обсуждение

При обработке плазмы, не содержащей изучаемых веществ, показано отсутствие интерферирующих пиков в местах хроматографического выхода омепразола или лансопразола (рис. 1, *a*). В то же время достигнуто хорошее разделение компонентов в стандартной плазменной смеси, с коэффициентами удерживания 5,6 для омепразола и 8 для лансопразола (рис. 1, *б*).

Проведенные исследования показали, что при проведении экстракции наиболее эффективна смесь диэтилового эфира и дихлорметана (9:1 по объему). Степень экстракции достигала 80 % и превосходила таковую при применении эфира, гексана и смеси эфир – дихлорметан (7:3), использованной в работе [7].

При регрессионном анализе выявлена линейная зависимость между концентрацией омепразола в интервале 50 – 10000 нг/мл и отношением высот хроматографических пиков определяемого вещества и внутреннего стандарта. Вследствие этого концентрацию омепразола в пробах определяли методом внутреннего стандарта по калибровочной кривой: $C = 1,25 \cdot H_1/H_2$, где C — концентрация омепразола мкг/мл, H_1 — высота пика омепразола, H_2 — высота пика внутреннего стандарта (лансопразола). При количественном опре-

Значения фармакокинетических параметров омепразола после однократного приема крысами содержимого капсул омепразола-акри (А) и лосека (Б) в дозе 50 мг/кг

Параметры	Тест-препарат (А)	Препарат сравнения (Б)
	$M \pm m$	$M \pm m$
Константа скорости, K_a (1/ч)	$0,87 \pm 0,40$	$0,48 \pm 0,29$
Время полувыведения $T_{1/2\beta}$ (ч)	$2,18 \pm 1,11$	$1,45 \pm 0,63$
Среднее время удерживания, MRT (ч)	$4,30 \pm 1,30$	$4,17 \pm 1,23$
Максимальная концентрация C_{max} (мкг/мл)	$2,58 \pm 0,21$	$2,42 \pm 0,83$
Время достижения C_{max} , T_{max} (ч)	$1,82 \pm 0,36$	$2,08 \pm 0,50$
Площадь под кривой $AUC(0-8)$ (мкг · ч/мл · л)	$16,26 \pm 1,72$	$15,80 \pm 1,60$

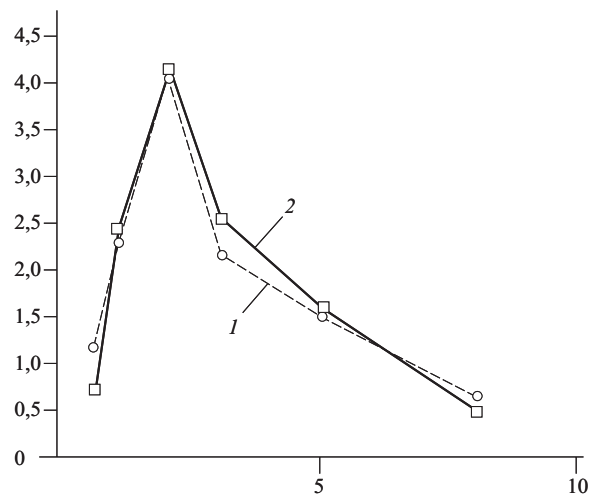


Рис. 2. Динамика изменения содержания омепразола (мкг/мл) в сыворотке крови крыс, 1 — омепразол, 2 — лансопразол.

делении лансопразола соответствующее уравнение для калибровки имело следующий вид: $C = 0,01 + 2,16 \cdot H_2/H_1$.

Данная методика была успешно апробирована в исследованиях фармакокинетики омепразола у крыс. Хроматограмма реального образца плазмы крови крыс после перорального введения омепразола в дозе 50 мг/кг приведена на рис. 1, *в*.

В то же время в крови кроликов препарат обнаружен не был. Данное обстоятельство, по-видимому, обусловлено низкими значениями рН содержимого кишечника кроликов.

На крысах линии Wistar с массой тела 200 ± 10 г проведено изучение фармакокинетики и относительной биодоступности капсул омепразола-Акри ОАО Химико-Фармацевтический комбинат “Акрихин” (Россия) и капсул лосека фирмы “Астра” (Швеция).

Профили фармакокинетических кривых усредненных концентраций в крови после введения капсул омепразола и лосека изображены на рис. 2.

Установлено, что значения AUC , MRT , C_{max} , T_{max} и $T_{1/2\beta}$ у исследованных лекарственных форм омепразола статистически значимо не различались между собой (таблица). Биодоступность капсул омепразола по сравнению с лосеком составляла 102,9%, и статистически достоверно не отличалась от препарата сравнения.

ЛИТЕРАТУРА

1. K. G. Tolman, J. Chandramouli, and J. C. Fang, *Expert Opin. Pharmacother.*, **1**, 1171 – 1194(2000).
2. G. D. Newton, W. S. Pray, and N. G. Popovich, *J. Am. Pharm. Assoc.*, **41**, 273 – 282 (2001).
3. D. Castro, M. A. Moreno, S. Torrado, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **21**, 291 – 298 (1999).
4. E. J. Woolf and B. K. Matuszewski, *J. Chromatogr. A*, **828**, 229 – 238 (1998).
5. P. K. Yeung, R. Little, Y. Jiang, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **17**, 1393 – 1398 (1998).
6. B. D. Landes, G. Miscoria, B. J. Flouvat, *J. Chromatogr.*, **577**, 117 – 122 (1992).
7. I. Aoki, M. Okumura, T. J. Yashiki, *J. Chromatogr.*, **571**, 283 – 290 (1991).

Поступила 25.12.01