

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2015

Н. А. Пятаев¹, П. С. Петров¹, А. А. Буртасов¹, О. В. Минаева¹,
О. А. Куликов¹, К. Г. Гуревич², А. В. Заборовский², В. П. Краснов³,
А. В. Кокорев¹, Г. С. Столяров¹, Н. Н. Зырняева¹

РАЗРАБОТКА МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОРМУСТИНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ С ПОМОЩЬЮ ВЭЖХ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

¹ ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н. П. Огарева», Россия, 430005, Саранск, ул. Большевикская, 68; e-mail: dep-general@adm.mrsu.ru

² ГБОУ ВПО МГМСУ им. А. И. Евдокимова Минздрава России, Россия, Москва; e-mail: msmsu@msmsu.ru

³ ФГБУН ИОС им. И. Я. Постовского УрО РАН, Россия, 620990, Екатеринбург, ул. С. Ковалевской, 22; e-mail: admin@ios.uran.ru

Разработан метод количественного определения противоопухолевого препарата ормустин в биологических средах с помощью ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием на обращенно-фазной колонке KromasylC18. В качестве подвижной фазы использована смесь этанол — ацетат аммония (10:90). Метод позволяет одновременно детектировать оба изомера препарата, обладает достаточной чувствительностью и специфичностью, имеет широкий диапазон линейности. Разработанный метод использован для исследования фармакокинетики ормустина у кроликов. Установлено, что при внутривенном введении системная кинетика обоих изомеров препарата описывается двухфазной моделью. У ормустина-I период полувыведения альфа-фазы составил $(3,5 \pm 0,2)$ мин, β -фазы — $(109,4 \pm 22,2)$ мин, у ормустина-II — $(3,6 \pm 0,2)$ и $(79,5 \pm 21,7)$ мин соответственно.

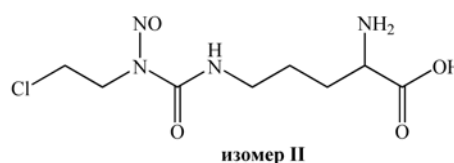
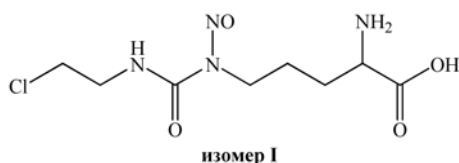
Ключевые слова: ормустин; масс-спектрометрия; фармакокинетика.

Препараты группы нитрозомочевины (НМ) занимают важное место среди противоопухолевых химиотерапевтических средств (ХТС). Особенностью производных НМ является отсутствие перекрестной резистентности с другими алкилирующими средствами, а также достаточно высокая противоопухолевая активность [1]. Как и большинство противоопухолевых средств ХТС, производные НМ обладают выраженной системной токсичностью. С целью повышения избирательности действия применяется конъюгирование цитотоксической части молекулы соединения с различными функциональными группами, повышающими проникновение молекулы цитостатика в опухолевую клетку [2, 3]. В качестве таких групп перспективными представляются аминокислоты, которые интенсивнее поглощаются опухолевыми клетками, чем нормальными [4, 5]. Кроме того, конъюгация с аминокислотными остатками обеспечивает более эффективный транспорт молекулы через гематоэнцефа-

лический барьер (ГЭБ), что позволяет использовать данные препараты при первичных и метастатических опухолях головного мозга [6, 7].

В Институте органического синтеза УРО РАН разработан препарат ормустин (Орм), представляющий собой производное орнитина и хлорэтилнитрозомочевины. При этом цитотоксическая хлорэтильная группировка присоединена к боковой цепи аминокислоты, а аминокислотная часть, обеспечивающая транспорт через мембрану, сохранена [8]. Орм представляет собой смесь 2 изомеров — N^{ϵ} -нитрозо- N^{ϵ} -[N' -(2-хлорэтил)карбомил]- L -орнитин (изомер I) и N^{ϵ} -[N' -(2-хлорэтил)- N' -нитрозокарбомил]- L -орнитин (изомер II).

Исследование фармакокинетики является неотъемлемой частью процесса разработки химиопрепарата (ХП), что продиктовало необходимость поиска метода детектирования Орм в биологических средах. Орм умеренно растворим в воде, мало растворим в 95 %



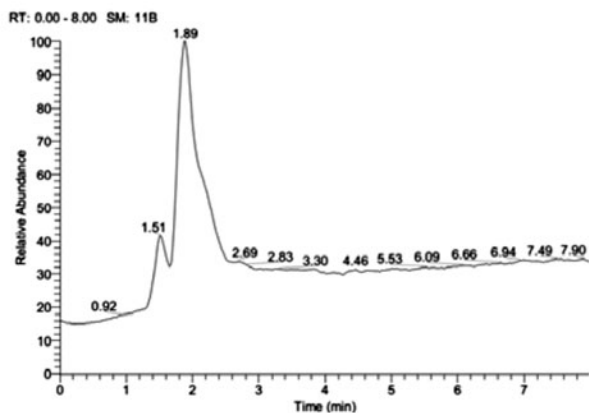


Рис. 1. Хроматограмма чистой плазмы (в областях ~4,6 и ~6,6 мин сигнала, характерного для изомеров ормустина, нет).

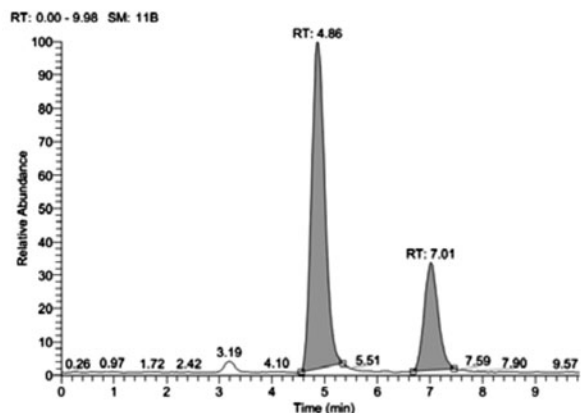


Рис. 2. Хроматограмма водного раствора Орм.

спирте, практически не растворим в органических растворителях. Кроме того, молекула Орм имеет низкую стабильность при комнатной температуре. Эти особенности определили невозможность жидкостной экстракции для пробоподготовки и использования УФ-детектирования для определения препарата в биологических жидкостях. Нами был разработан метод количественного определения Орм в биосредах с использованием масс-спектрометрического детектирования, обеспечивающий возможность одновременного определения обоих изомеров и имеющий достаточный предел количественного определения вещества и широкий диапазон линейности.

Экспериментальная часть

В работе использован опытный образец ормустина (Орм) (Институт органического синтеза УРО РАН, серия 070114, серия субстанции MTV-746. Массовое соотношение Орм-I и Орм-II в препарате составляло 76,7:23,3.

Образцы плазмы объемом 0,5 мл подвергали ультрафильтрации с помощью центрифугирования в ультрафильтрационных пробирках “Amicon” (3 – 6 кД)

при 5000 г в течение 30 мин. Ультрафильтрат вводили в инжектор хроматографа. Анализ осуществляли непосредственно после получения ультрафильтрата. Степень извлечения Орм составила 70 %.

Количественное определение изомеров Орм проводили на жидкостном хроматографе ThermoScientific с масс-селективным детектором MSQPlusThermoScientific. Обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Xcalibur (v. 2.1), США.

Подвижная фаза: этанол (96 %) — 10 мМ аммонийноацетатный буферный раствор (pH 6,2) (10:90). Скорость потока подвижной фазы — 0,2 мл/мин. Неподвижная фаза: хроматографическая колонка Kromasil 100 C18, 150 × 2 мм, 5 мкм, при температуре 25 °С. Объем вводимой пробы 5 мкл. Время хроматографирования 10 мин. Ионизация ESI. Газ-небулайзер — азот. Температура газа-небулайзера 350 °С. Напряжение на капилляре 3 кВ. Напряжение на конусе 40 В. Детектирование по положительному иону $m/z = 267$ (SIM). Время удерживания Орм ~4,6 мин (Орм-I) и ~6,6 мин (Орм-II).

Параметры системной кинетики Орм определены у 6 интактных кроликов породы шиншилла (питомник “Столбовая”) обоого пола (3 самца и 3 самки) массой

Таблица 1

Валидационные характеристики метода количественного определения ормустина (мкг/мл)

Номинальная концентрация	Найденная концентрация (утро первого дня)				Вечер первого дня				Утро второго дня			
	Mean	SD	RSD, %	ΔX , %	Mean	SD	RSD, %	ΔX_1 , %	Mean	SD	RSD, %	ΔX_2 , %
	Орм-I											
0,080	0,085	0,008	8,9	6,3	0,078	0,006	7,4	8,2	0,081	0,009	11,1	4,7
0,24	0,244	0,018	7,4	1,7	0,235	0,014	5,8	3,7	0,233	0,012	5,1	4,5
50	50,6	2,1	4,2	1,2	48,9	1,8	3,6	3,4	52,3	1,5	2,8	3,4
75	75,5	2,9	3,8	0,67	73,7	2,4	3,3	2,4	77,1	2,6	3,4	2,1
	Орм-II											
0,0243	0,024	0,003	12,5	1,2	0,022	0,002	9,1	8,3	0,021	0,003	14,3	12,5
0,0729	0,075	0,005	6,7	2,9	0,074	0,005	6,8	1,3	0,075	0,004	5,3	1,3
15,2	14,9	0,87	5,8	2,0	14,3	0,73	5,1	4,0	15,5	0,82	5,3	4,0
22,8	23,3	1,0	4,3	2,2	22,6	1,1	4,9	3,0	22,4	1,0	4,5	3,9

Примечание: Mean — среднее, SD — стандартное отклонение, RSD — относительное стандартное отклонение, ΔX — отличие от номинальной концентрации, ΔX_1 — различия между сериями определений утром и вечером одного дня, ΔX_2 — междневные различия показателей.

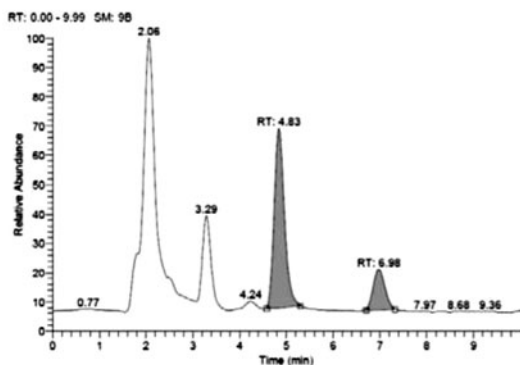


Рис. 3. Хроматограмма плазмы, содержащей Орм в концентрации 10 мкг/мл.

2,8 – 3,2 кг. Препарат вводили внутривенно в дозе 15 мг/кг в краевую вену уха. Концентрацию препарата в плазме крови исследовали до введения препарата и через 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120 и 180 мин после инъекции.

Результаты и их обсуждение

Специфичность. Проводили анализ водного раствора Орм, фильтрата чистой плазмы и фильтрата плазмы с прибавлением стандартного раствора Орм. Типичные хроматограммы названных образцов приведены на рис. 1 – 3.

На хроматограммах образцов фильтрата чистой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания Орм. На хроматограммах фильтрата плазмы с добавлением стандартных растворов Орм имелись пики, совпадающие по времени удерживания с пиками стандартных водных растворов Орм, что позволяет идентифицировать добавленное вещество как ормустин. За нижний предел количественного определения принимали концентрацию, для которой отношение сигнал/шум было более 3,0 [9]. Для данной методики нижний предел количественного определения составил 0,040 мкг/мл для Орм-I и 0,024 мкг/мл Орм-II.

Линейность. Для построения калибровочной прямой использовали метод абсолютной калибровки. Калибровочную прямую строили для каждого из изо-

мов Орм в отдельности, определяя их на одной хроматограмме. Для построения калибровочной прямой Орм проводили анализ образца фильтрата плазмы с добавлением свежеприготовленного стандартного раствора Орм до получения концентраций 0,04, 0,08, 0,2, 2, 20, 40, 100 мкг/мл по Орм-I. Концентрации Орм-II в данных пробах были рассчитаны, исходя из соотношения изомеров и составили 0,024, 0,061, 0,61, 6,1, 12,2, 30,4 мкг/мл. На рис. 4 приведена зависимость площади пиков хроматограммы от концентрации вещества.

Было установлено, что зависимость площади пика хроматограммы от концентрации в исследованном диапазоне линейна. Уравнения линейной регрессии имели вид:

$$C = 0,0414 \cdot 10^{-3} S \text{ для Орм-I,}$$

$$C = 0,0173 \cdot 10^{-3} S \text{ для Орм-II,}$$

где C — концентрация, S — площадь пика хроматограммы. Значения коэффициента корреляции составили соответственно 0,9987 и 0,9970.

В табл. 1 представлены валидационные характеристики разработанной методики.

Правильность методики определяли как выраженную в процентах разницу между номинальной и найденной в пробе концентрациями препарата (относительную погрешность измерения). Для Орм-I значение данного параметра колебалось в зависимости от взятой концентрации от 0,67 до 6,3 %, для Орм-II — от 1,2 до 2,9 %. Прецизионность метода, равная относительному стандартному отклонению (RSD) значений найденных концентраций в одной серии экспериментов, составляла 3,8 – 8,9 % для Орм-I и 4,3 – 12,5 % для Орм-II. Внутриведенные и междневные отклонения найденных концентраций препарата не превышали 12,5 %, что свидетельствует о достаточной повторяемости и воспроизводимости метода. Согласно принятым нормам [9 – 11], допустимые значения относительной средней погрешности, относительного стандартного отклонения, а также внутри- и междневные отклонения концентраций вещества для биоаналитических методик не должны превышать 20 % для нижнего предела количественного определения и 15 % для остальных точек. Полученные значения валидацион-

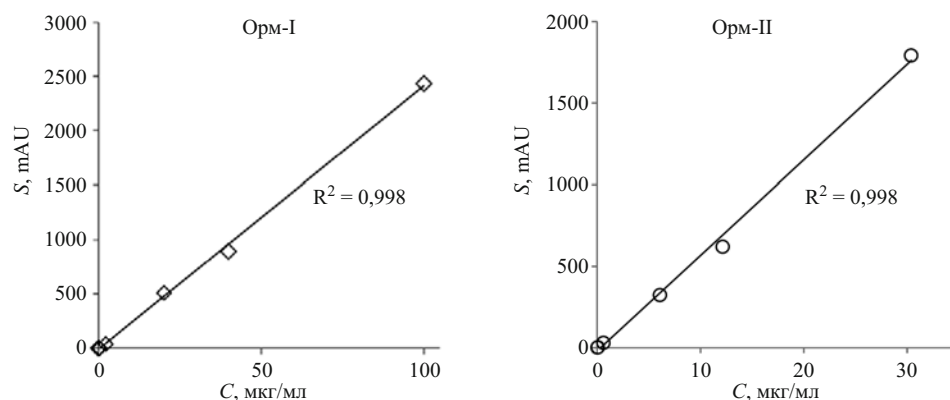


Рис. 4. Зависимость площади пика хроматограммы (S) от концентрации Орм в растворе (C)

Фармакокинетические константы ормустина при внутривенном введении интактным кроликам в дозе 15 мг/кг*

Показатель	Единица измерения	Ормустин-I			Ормустин-II		
		Mean	SD	CV, %	Mean	SD	CV, %
C_0	мкг/мл	16,0	8,6	53,7	13,4	7,2	53,7
AUC	мкг · ч/мл	329	154	46,9	258	114	44,2
$AUMC$	мкг · мин ² /мл	16923	7953	47,0	11580	4594	39,7
MRT	мин	51,5	34,2	66,4	44,9	26,7	59,4
Clearance	мл/мин	1,79	0,84	46,9	2,29	1,01	44,2
V_{ss}	л/кг	4,620	3,757	81,3	5,134	3,802	74,1
$T_{1/2}(\alpha)$	мин	3,5	0,2	6,3	3,6	0,2	6,8
$T_{1/2}(\beta)$	мин	109,4	22,2	20,3	79,5	21,7	27,3

* При имеющемся в препарате массовом соотношении изомеров Орм-I и II их доза составила соответственно 11,0 и 4,0 мг/кг.

ных характеристик удовлетворяют этим требованиям, что подтверждает пригодность метода для проведения фармакокинетических исследований ормустина.

Метод использован для исследования системной кинетики Орм у кроликов породы шиншилла при внутривенном введении в дозе 15 мг/кг. Фармакокинетические константы Орм при его внутривенном введении представлены в табл. 2, а его фармакокинетические кривые — на рис. 5.

Для обоих изомеров Орм фармакокинетическая кривая хорошо аппроксимировалась двухэкспоненциальной моделью. Уравнения зависимости концентрации от времени имели вид:

$$C = 39,1e^{-0,2t} \pm 2,1e^{-0,006t},$$

$$C = 31,2e^{-0,194t} \pm 1,7e^{-0,009t}$$

соответственно для первого и второго изомеров препарата (где C — концентрация, t — время). Значение коэффициента корреляции расчетных и экспериментальных данных для обоих изомеров составляло 0,998.

Максимальная плазменная концентрация Орм-I была равна ($16,0 \pm 8,6$) мкг/мл, AUC — (329 ± 154) мкг · мин/мл. Для второго изомера препарата значения этих показателей были равны соответственно ($13,4 \pm 7,2$) и (258 ± 114) мкг · мин/мл. Оба изомера достаточно быстро выводились из плазмы крови. У Орм-I период полувыведения α -фазы составлял ($3,5 \pm 0,2$) мин, β -фазы — ($109,4 \pm 22,2$) мин, у Орм II — ($3,6 \pm 0,2$) и ($79,5 \pm 21,7$) мин соответственно. Значение кажущегося объема распределения (V_{ss}) достигало 4,62 л/кг (Орм-I) и 5,13 л/кг (Орм-II).

Бизэкспоненциальный характер изменения концентрации Орм в плазме крови кроликов свидетельствует о наличии, как минимум, 2 механизмов элиминации Орм из кровотока. Альфа-фаза элиминации, характеризующаяся весьма коротким периодом полувыведения, может быть связана с быстрым поступлением препарата в ткани и выведением его почками, а также спонтанным разрушением и связыванием с различными органическими соединениями. В β -фазу снижение концентрации Орм, вероятно, обусловлено более медленными метаболическими превращениями и почеч-

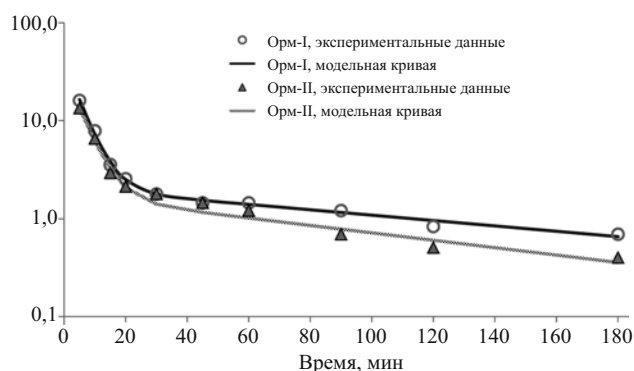


Рис. 5. Фармакокинетические кривые Орм при внутривенном введении интактным кроликам в дозе 15 мг/кг.

ной экскрецией не связанного с белками препарата. Высокие значения кажущегося объема распределения ($4,62 - 5,13$ л/кг) подтверждают, что Орм распределяется в тканях и, вероятно, проникает внутрь клеток.

Таким образом, разработан метод количественного определения Орм, позволяющий детектировать оба изомера препарата в биологических средах. Метод является специфичным, имеет достаточную точность и воспроизводимость. Для расчета фармакокинетических параметров подобраны соответствующие математические модели и вычислены фармакокинетические константы при внутривенном введении Орм кроликам, которые могут быть подвергнуты межвидовому переносу [12]. Показано, что изменения концентрации препарата в крови после его внутривенного введения кроликам наиболее оптимально описываются уравнениями двухчастевой фармакокинетической модели.

Работа выполнена при частичной поддержке Минобрнауки РФ в рамках Госзадания ФГБОУ ВПО “МГУ им. Н. П. Огарева”, проект № 2952.

ЛИТЕРАТУРА

1. Laurent Gate, and Kenneth D. Tew, *Man: Chemotherapy, Biological Therapy, Hyperthermia and Supporting Measures*, 13, 61 – 85 (2011).

2. Archie W. Prestayko, and Laurence H. Baker, and Stanley T. Crooke, *Nitrosoureas: Current Status and New Developments*, Vol. 436, Elsevier (2013).
3. Г. Ю. Харкевич, Г. Н. Егоров, Л. В. Манзюк и др., *Рос. биотер. ж.*, **3**(1), 72 – 76 (2004).
4. В. А. Горбунова, Н. Ф. Орел, О. В. Семина и др., *Вопросы онкологии*, Санкт-Петербург (2001), сс. 680 – 683.
5. В. П. Краснов, Г. Л. Левит, М. А. Барышникова и др., *Рос. биотер. ж.*, **12**(2), 46 (2013).
6. Patrick Beauchesne, *Cancers*, **4**, 77 – 87 (2012).
7. A. Fabi, G. Metro, and A. Vidiri, et al., *J. Neurooncol.*, **100**, 209 – 215 (2010).
8. Л. Л. Николаева, А. В. Ланцова, Е. В. Санарова и др., *Рос. биотер. ж.*, **14**(1), 133 (2015).
9. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft), European Medicines Agency, Committee for medicinal products for human use, London (2009).
10. ГОСТ Р ИСО 5725-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов измерений. 6 частей, Стандарт-информ, Москва (2002).
11. А. Н. Миронов (ред.), *Руководство по экспертизе лекарственных средств*, Т. 1, Гриф и К, Москва (2013).
12. О. В. Полехина, Н. В. Образцов, В. А. Петрунин, Т. А. Высоцкая, *Хим.-фарм. журн.*, **48**(7), 7 – 15 (2014); *Pharm. Chem. J.*, **48**(7), 421 – 429 (2014).

Поступила 15.05.15

DEVELOPING A METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF ORMUSTINE IN BIOLOGICAL FLUIDS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH MASS-SPECTROMETRIC DETECTION

N. A. Pyataev¹, P. S. Petrov¹, A. A. Burtasov¹, O. V. Minaeva¹, O. A. Kulikov¹, K. G. Gurevich², A. V. Zaborowski², V. P. Krasnov³, A. V. Kokorev¹, N. N. Stolyarov¹, and G. S. Zyrnyaeva¹

¹ Ogarev Mordovia State University, Saransk, Mordovia, 430005 Russia

² A. I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, 127473 Russia

³ I. Ya. Postovskii Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, 620990 Russia

* e-mail: dep-general@adm.mrsu.ru

We have developed a method for the quantitative determination of antitumor drug ormustine in biological fluids by high-performance liquid chromatography with mass-spectrometric detection (HPLC/MS) on reverse-phase column Kromasil C 18. The mobile phase is ethanol – ammonium acetate (10 : 90, v/v) mixture. The proposed method ensures simultaneous detection of both isomers of the drug, possesses sufficiently high sensitivity and specificity, and has a wide range of linearity. The method has been used to study the pharmacokinetics of ormustine in rabbits. It is established that systemic kinetics of both isomers of the drug upon intravenous administration is well described by a two-compartment model. The half-life of ormustine-I is 3.5 ± 0.2 min for alpha-phase and 109.4 ± 22.2 min for beta-phase. The half-life of ormustine-II is 3.6 ± 0.2 min and 79.5 ± 21.7 min for alpha- and beta-phase, respectively.

Keywords: Ormustine; mass spectrometry; pharmacokinetics.