



Определение перхлозона в плазме крови с использованием ВЭЖХ масс-спектрометрическим детектированием

А.М. Власов^{1,2}, Ю.Н. Башкатова², А.Ю. Савченко³, М.Р. Хаитов², Г.В. Раменская¹

¹ — Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова, Москва

² — Институт иммунологии ФМБА России, Москва

³ — Научный центр экспертизы средств медицинского применения, Москва

Контактная информация: Галина Владиславовна Раменская ramenskaia@mail.ru

Разработан новый противотуберкулезный препарат — перхлозон. Хроматографирование осуществляли с использованием предколонки ZORBAX SB C18, 5 мкм, 35 мм × 2,1 мм и аналитической колонки ZORBAX SB C18, 5 мкм, 150 мм × 2,1 мм. Степень извлечения перхлозона из плазмы крови 88%. Относительное стандартное отклонение при оценке внутри- и междневной воспроизводимости менее чем 9,5% и 14,2% соответственно. Диапазон аналитических концентраций составлял 10-10000 нг/мл для масс-спектрометрического детектирования и 250-10000 нг/мл для спектрофотометрического детектирования. Предел количественного определения — 10 нг/мл для масс-спектрометрического детектирования и 250 нг/мл для спектрофотометрического детектирования.

Ключевые слова: перхлозон, ВЭЖХ, масс-спектрометрия, фармакокинетика.

В настоящее время во всем мире и в России сохраняется напряженная эпидемическая обстановка по туберкулезу [1, 3].

Распространение в 1980 — 1990 гг. штаммов микобактерий туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (которые теперь определяют как устойчивые - по крайней мере, к H и R) поставило под угрозу успех мероприятий по борьбе с туберкулезом [4], привело к снижению эффективности химиотерапии [5, 6]. По данным специальных контролируемых исследований в ряде областей РФ частота выделения лекарственно-устойчивых МБТ среди впервые заболевших достигает 19-26%, при обследовании клиниче-

ских контингентов — до 38%, среди контингентов хронических больных ситуация еще серьезней — частота выделения лекарственно-устойчивых штаммов достигает 80-90% и при остро прогрессирующих формах — до 100% [7]. На фоне вынужденной полихимиотерапии с привлечением противотуберкулезных препаратов резервного ряда снижается функциональная активность систем защиты макроорганизма, регистрируются побочные реакции со стороны различных органов и систем, что обуславливает затяжное течение и хронизацию воспалительных процессов [8]. Все это определяет необходимость создания новых противотуберкулезных средств.

Перхлзон (перхлорат-4-тиоуреидо-иминометилпиридиния) рис. 1, противотуберкулезное средство, обладающий выраженным, строго избирательным ингибирующим действием на жизнеспособность микобактерий туберкулеза, чувствительных и устойчивых к существующим противотуберкулезным препаратам. Механизм его действия в настоящее время не известен. Перхлзон находится на стадии клинических испытаний и поэтому еще не имеет широкого клинического применения, что объясняет отсутствие в литературе методов его определения в биожидкостях и данных по его фармакокинетике.



Рис. 1. Химическая структура перхлзона (перхлорат 4-тиоуреидо-иминометилпиридиния).

В представленном исследовании нами была разработана простая и быстрая методика определения перхлзона в плазме крови с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с масс-спектрометрическим и спектрофотометрическим детектированием.

Материалы и методы

1. Реактивы

Перхлзон (перхлора-4-тиоуреидо-иминометилпиридиния, чистота 99,7%) был предоставлен разработчиком ОАО «Фармасинтез» (Россия), трифторуксусная кислота и ацетонитрил (MERK KGaA Darmstadt, Германия), вода деионизированная и очищенная с использованием Milli-Q system MP-650, IWAKI Millipore, (Япония).

2. Приготовление стандартного и рабочих стандартных растворов перхлзона

Стандартный раствор 10 мг/мл готовили путем растворения точной навески перхлорат 4-тиоуреидоиминометилпиридиния в метаноле. Стандартный раствор хранили при температуре -40°C . Срок годности стандартного раствора — 3 месяца. Рабочие стандартные растворы перхлзона (500 мкг/мл, 100 мкг/мл, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл) готовили из стандартного раствора разведением водой. Использовали свежеприготовленные рабочие стандартные растворы.

3. Приготовление образцов плазмы крови для калибровки

Для калибровки прибора и валидации методики использовали «чистую» плазму. Образцы для калибровки готовили добавлением к 1 мл плазмы 10-50 мкл рабо-

чих стандартных растворов до получения финальных концентраций 10, 50, 100, 1000, 10000 нг/мл плазмы. Калибровочные кривые получали ежедневно.

4. Пробоподготовка

К 0,5 мл плазмы крови в пробирке типа «эппендорф» добавляли 1,5 мл ацетонитрила, смешивали на шейкере в течение 5 минут со скоростью 2500 об./мин., и центрифугировали при 13200 об./мин 10 минут. Надосадочную жидкость перемещали в вialу и упаривали в токе азота при нагревании до 40°C , к остатку после упаривания добавляли 200 мкл подвижной фазы и перешивали 15 сек. на вортексе, затем центрифугировали при 13200 об./мин. 5 минут и переносили 100 мкл супернатанта в микровialу.

5. Оборудование

Хроматографическая система Agilent 1200, состоящая из дегазатора, бинар-

ного насоса, автосамплера, колоночного термостата, мультиволнового спектрофотометрического детектора и масс-спектрометрического квадрупольного детектора Agilent 6120. В качестве неподвижной фазы использовалась хроматографическая колонка Agilent «ZORBAX SB C18 5мкм, 150*2,1мм» с предколонкой «ZORBAX SB C18 5мкм, 35*2,1мм».

6. Хроматографические условия

Разделение проводили на колонке Agilent «ZORBAX SB C18 5мкм, 150*2,1мм» при температуре колонки 400°C. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила и 0,1% раствора трифторуксусной кислоты (рН=2,6) в соотношении 85:15. Скорость потока составляла 1 мл/мин. Объем образца вводимый в систему составлял 20 мкл. Для детектирования использовали спектрофотометрический (длина волны — 317 нм) и масс-спектрометрический детекторы. Ионизацию проводили с помощью электроспрея при атмосферном давлении (API-ES), напряжение на капилляре 4000V, скорость азота 12 мл/мин, температура осушающего газа — 300°C. Детектирование проводили в режиме индивидуальных масс (SIM) по молекулярному иону 183,4 m/z. Время анализа составляло 5 минут. Время удерживания перхлорона в указанных условиях — 3,05 мин.

7. Дизайн фармакокинетического исследования

Фармакокинетическое изучение проводилось в рамках исследования переносимости, безопасности и фармакокинетики препарата на здоровых добровольцах, с целью выработки рекомендаций по режиму дозирования для последующих фаз клинических исследований. В исследование было включено 36 здоровых добровольцев (мужчин) от 19 до 38 лет, вес от — 58 до 92 кг, рост — от 170 до 190 см. Доброволь-

цы были сгруппированы на 4 группы по 9 человек. Каждая группа получала перхлорон однократно, в виде таблеток по 400 мг — так, чтобы разовая доза составляла 400 мг (1 группа), 800 мг (2 группа), 1200 мг (3 группа), 1600 мг (4 группа), то есть соответственно 1, 2, 3 и 4 таблетки. Прием следующей дозы осуществлялся после оценки переносимости и безопасности предыдущей дозы. Образцы крови отбирались по 5 мл из локтевой вены до получения препарата и через 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 10; 12; 24 часа после его приема. Образцы центрифугировались, плазма отбиралась в отдельные пробирки и хранилась до проведения анализа при температуре 200°C не более одного месяца.

Результаты и их обсуждение

1. Оптимизация условий анализа

В данном исследовании нами разработана методика быстрого и простого определения перхлорона в плазме крови с помощью ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Кроме того, нами показана возможность применения спектрофотометрического детектирования, в виду высоких концентраций препарата в крови. Применение спектрофотометрических детекторов значительно упрощает анализ и позволяет определять содержание перхлорона до 250 нг/мл.

2. Линейность

Калибровочные кривые носили линейный характер во всем в диапазоне определяемых концентраций 10 нг/мл — 10000 нг/мл (для масс-спектрометрического детектирования) ($r = 0,9986$) и 500 нг/мл — 10000 нг/мл (для спектрофотометрического детектирования) ($r = 0,9992$).

3. Специфичность и чувствительность

Хроматограмма образца плазмы крови обладает хорошей селективностью,

что подтверждается отсутствием пиков интерферирующих эндогенных соединений в месте элюирования перхлозона.

Предел количественного определения рассчитывался как наименьшая концентрация анализируемого вещества, при которой отношение «сигнал:шум» составляло 10:1. Чувствительность методики для масс-спектрометрического детектирования составила 10 нг/мл, для спектрофотометрического 250 нг/мл, что являлось достаточным для определения содержания перхлозона в плазме крови добровольцев в течение 24 часов после однократного применения.

4. Степень извлечения из плазмы крови

Степень извлечения перхлозона из плазмы крови определяли сравнением площадей пиков чистого стандарта, приготовленного из рабочего раствора и введенного в хроматографическую колонку, и площади пика экстракта, полученного из плазмы крови с добавлением аналогичного количества перхлозона (n=5 для каждой концентрации). Степень извлечения составила 88,4%, 88,6%, 87% для концентраций перхлозона 100 нг/мл, 500 нг/мл и 1 мкг/мл соответственно.

5. Воспроизводимость

Для оценки воспроизводимости проводили количественное определение с применением масс-спектрометрического детектора модельных смесей перхлозона и плазмы крови при различных концентрациях перхлозона. Для образцов, измеренных в течение дня, относительное стандартное отклонение составило 10,4%, 9,2%,

9,5% для модельных смесей, содержащих 100 нг/мл, 500 нг/мл и 1000 нг/мл перхлозона соответственно. Для измерений в течение недели относительное стандартное отклонение составило 13,5%, 11,4% и 14,2% для модельных смесей, содержащих 100 нг/мл, 500 нг/мл и 1000 нг/мл перхлозона соответственно.

6. Изучение фармакокинетики

Фармакокинетические параметры перхлозона рассчитывали модельно-независимым методом. Максимальная концентрация в плазме крови (C_{max}) и время её достижения (T_{max}) были получены непосредственно из результатов измерений. Значение площади под фармакокинетической кривой рассчитывали методом трапеций (AUC₀₋₂₄). На рис. 2 представлены усредненные фармакокинетические кривые перхлозона в плазме крови после однократного перорального приема в дозе 400 мг, 800 мг, 1200 мг и 1600 мг. Рассчитанные фармакокинетические параметры представлены в таблице 1.

Как видно из представленных данных перхлозон быстро всасывается в системный кровоток (T_{max} — в среднем — до 3 часов) и постепенно выводится из организма (T_{1/2} — в среднем — до 20 часов).

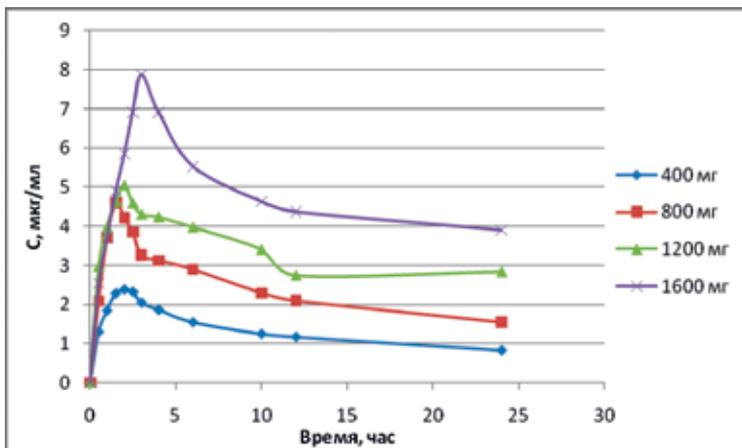


Рис. 2. Усредненные фармакокинетические профили перхлозона после однократного перорального приема в различных дозах, мкг/мл

Средние значения фармакокинетических параметров перхлозона
у здоровых добровольцев после однократного перорального
приема в различных дозах

Параметр	Однократная доза, мг			
	400	800	1200	1600
С _{max} , мкг/мл	2,61±0,34	5,07±0,69	5,42±0,65	8,17±1,91
T _{max} , час	2,2±0,8	1,6±0,4	1,8±0,4	3,1±0,7
AUC 0-24, мкг·час/мл	31,01±5,27	55,96±7,81	78,70±14,53	112,67±24,26
T ¹ / ₂ , час	17,3±3,9	19,7±4,6	*	*

* Период полувыведения рассчитан для доз 400 и 800 мг, так как при введении в дозах 1200 и 1600 мг концентрации в конечной точке достаточно велики, а $AUC_{0-t} < 80\% AUC_{0-\infty}$.

Максимальная концентрация перхлозона составляет 2,61±0,34 мкг/мл, 5,07±0,69 мкг/мл, 5,42±0,65 мкг/мл и 8,17±1,91 мкг/мл для доз 400, 800, 1200 и 1600 мг соответственно. Кинетика перхлозона в диапазоне изучаемых доз является линейной.

Выводы

Описана ВЭЖХ методика для определения нового противотуберкулезного препарата перхлозон в плазме крови. Методика пригодна для фармакокинетических исследований, поскольку обладает необходимой линейностью, точностью и воспроизводимостью. Предел количественного определения при масс-спектрометрическом и спектрофотометрическом детектировании позволяет определять терапевтические уровни концентрации перхлозона в плазме крови.

Список литературы

1. **Мишин В. Ю.** Современная стратегия лечения лекарственно-устойчивого туберкулеза легких // Лечащий врач. — 2000. — № 3. — с. 4-10.

2. **Перельман М. И.** Фтизиатрия. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа. — 2007.

3. **Репин Ю. М.** Лекарственно-устойчивый туберкулёз лёгких // Хирургическое лечение. — СПб., «Гиппократ». — 2007. — с.168.

4. **Попович В.К.** Медико-экономический анализ и прогноз проблем туберкулеза в России // В.К. Попович. Автореферат дис. док-ра мед.наук. — М. — 2005. — с. 53.

5. **Шилова М. В.** Туберкулёз в России в 2007 году // Монография. — М. — 2008.

6. **Burwen DR, Bloch AB, Griffin LD, et al.** National trends in the concurrence of tuberculosis and acquired immunodeficiency syndrome. // Arch Intern Med. — 1995. — 155:1281-6.

7. Multidrug-resistant tuberculosis // Edited by Ivan Bastian and Françoise Portaels. Kluwer Academic Publishers. — 2000.

8. **Harkin T., Harris H.** Treatment of multidrug resistant tuberculosis. // In Rom W., Stuart G. Tuberculosis, Little Brown and Co., New York. — 1996. — p. 843-850.

High performance liquid chromatographic determination of perchlozone in serum using mass spectrometric detection and its application in human pharmacokinetic studies

A.M. Vlasov, Y.N. Bashkatova, A.Y. Savchenko, M.R. Khaitov,
G.V. Ramenskaya

A new sensitive high-performance liquid chromatographic (HPLC) method with ultraviolet and mass spectrometry detection was developed for determination of perchlozone, a new Russians antitubercular medicine, in human plasma. Perchlozone were extracted from plasma using acetonitrile and the extract was injected into a column (ZORBAX SB C18 precolumn, 5 μm , 35 mm \times 2,1 mm I.D.) for clean-up and column (ZORBAX SB C18 analytical column, 5 μm , 150 mm \times 2,1 mm I.D.) for separation. Mean absolute recoveries were 88.0 for perchlozone. Intra- and inter-day relative standard deviations were less than 9,5 and 14,2% for perchlozone, at the different concentration ranges. The validated concentration ranges of this method were 10–10000 ng/ml for mass spectrometry determination and 250–10000 ng/ml for ultraviolet detector determination. The limits of quantification were 10 ng/ml for mass spectrometry determination and 250ng/ml for ultraviolet detector determination.

Key words: perchlozone; HPLC; pharmacokinetic, mass spectrometry.

Способ моделирования синдрома хронической усталости в эксперименте

М.А. Самотруева¹, Д.Л. Теплый², Т.К. Серезникова¹, Н.Р. Кулешевская¹

¹ — Астраханская государственная медицинская академия, Астрахань

² — Астраханский государственный университет, Астрахань

Контактная информация: Серезникова Татьяна Константиновна 414057 г.Астрахань, ул.Звездная, д.9, кор.1, к.28.

Предложен способ моделирования «синдрома хронической усталости» в эксперименте, включающий сочетание информационного (формирование пищедобывательного поведения в многоальтернативном лабиринте), физического (плавание с грузом 10 % от массы тела) и социального (агонистические конфронтации между особями) воздействий. Доказано, что комплекс хронических истощающих воздействий сопровождается дисбалансом нейроиммунорегуляторных механизмов, лежащих в основе формирования данного патологического состояния.

Ключевые слова: «синдром хронической усталости», информационно-физический стресс, агонистические конфронтации, нейроиммунный дисбаланс.

«Синдром хронической усталости» (СХУ) — одно из достаточно распространенных патологических состояний настоящего времени, развитие которого связано, прежде всего, с особенностями современной жизни населения крупных городов, типом жизни в развитых странах, а также чрезмерной эмоционально-