



DOI: 10.22363/2313-0245-2017-21-4-432-439

РАЗРАБОТКА ВЭЖХ-МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ФАБОМОТИЗОЛА (АФОБАЗОЛА) В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРОЛИКОВ

Е.Н. Якушева, И.В. Черных,
А.В. Щулькин, М.В. Гацанова

ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет
Минздрава России, Рязань, Россия

В статье описана ВЭЖХ-методика количественного анализа отечественного анксиолитика с нейропротекторной активностью — фабомотизола (афобазола) в плазме крови кроликов породы Шиншилла методом ВЭЖХ с УФ-детектированием при длине волны 302 нм. Анализ выполнялся в изократическом режиме на хроматографической системе Stayer с применением обращенно-фазной колонки Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250×4,6) с зернением 4 мкм и подвижной фазы (ацетонитрил—вода—метанол—кислота уксусная ледяная—триэтиламин в соотношении 100 : 240 : 100 : 0,3 : 0,25) с рН 6,10. Время удерживания целевого вещества составило $10,00 \pm 0,11$ мин.

Экстракция фабомотизола из плазмы крови осуществлялась эфиром диэтиловым (1,5 мл плазмы и 6 мл ацетонитрила) путем встряхивания на приборе Shaker при 400 об/мин 15 мин, центрифугирования при 3500 об./мин 15 мин и упаривания супернатанта на роторно-вакуумном испарителе при 50 °С. Коэффициент экстракции вещества составил 87,00%.

Разработанная методика характеризуется чувствительностью, специфичностью, простотой выполнения, воспроизводимостью и линейностью в интервале плазменных концентраций на фоне перорального введения 3,8 мг вещества (таблетки Афобазол, 10 мг, ОАО «Фармстандарт-Лексредства», Россия) кроликам.

Ключевые слова: афобазол, фабомотизол, ВЭЖХ, фармакокинетика, кролики

Контактная информация: Якушева Елена Николаевна, д.м.н., профессор, заведующая кафедрой фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань, Россия; e-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

Актуальность. Фабомотизол (афобазол) — оригинальный отечественный селективный анксиолитик с нейропротекторной активностью, предотвращающий стресс-индуцированное падение связывания в бензодиазепиновом участке ГАМК_A-рецепторного комплекса, одобренный для клинического применения в РФ в 2005 году. Препарат не обладает характерными для бензодиазепинов гипноседативным, амнестическим и миорелаксантным эффектами, однако по анксиолитическим свойствам им не уступает [1, 3].

Широкий спектр показаний для фабомотизола повышает вероятность его комбинированного приема с другими лекарственными средствами, а значит, и развитие межлекарственных взаимодействий. В последние годы серьезное внимание уделяется взаимодействию лекарственных средств на уровне белка-транспортера гликопротеина-P (Pgp).

Pgp представляет собой эффлюксный АТФ-зависимый белок-транспортер, выбрасывающий из клеток во внеклеточное пространство и просвет органов широкий спектр эндогенных веществ, а также лекарственных препаратов. Активность данного транспортера может сильно варьировать под действием некоторых лекарственных препаратов, что приводит к изменениям фармакокинетики лекарственных веществ, являющихся его субстратами [8]. Благодаря комплексу исследований известно, что к числу субстратов Pgp относятся преимущественно липофильные ароматические соединения с молекулярной массой в диапазоне 300—500 Д, включающие водородные связи в молекуле, а также аминогруппу или атом азота, протонированный при физиологических рН [6, 10, 11]. Подобные свойства характерны для фабомотизола и его основного метаболита, что позволяет предполагать его принадлежность к числу субстратов данного белка-транспортера. Кроме того, на культурах клеток с множественной лекарственной устойчивостью показано, что ряд производных бензимидазола проникают в них в значительно меньшей степени, чем в нормальные клетки, что также подтверждает данное предположение [12].

Возможная принадлежность фабомотизола к числу субстратов Pgp приведет к необходимости коррекции его дозы в ту или иную сторону при его комбинированном применении с модуляторами активности транспортера, несмотря на относительную безопасность препарата. Для подтверждения участия Pgp в фармакокинетики фабомотизола целесообразно оценить динамику его плазменных концентраций на кроликах-самцах, в связи с возможностью многократного забора крови [4]. При этом «золотым стандартом» фармакокинетических исследований является ВЭЖХ.

Таким образом, **целью исследования** было разработать и апробировать ВЭЖХ-методику количественного определения фабомотизола в плазме крови кроликов породы Шиншилла.

Материалы исследования. Для количественного определения фабомотизола в плазме крови с помощью ВЭЖХ использовалась хроматографическая система Stayer (Аквилон, Россия) с УФ-спектрофотометрическим детектором UVV 104, петлевым краном-дозатором РЕЕК с петлей ввода на 100 мкл, аналитическим ручным инжектором для ввода пробы модели 7725i (Rheodyne, США) при длине волны 302 нм. Использовали обращенно-фазную хроматографическую колонку Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250×4,6) с зернением 4 мкм с термостатированием при 35 °С. Ввод проб в петлю хроматографа производили с помощью шприца «Microsyringes» (Германия).

В качестве вспомогательного оборудования при подготовке проб применяли деионизатор «Водолей» (Аквилон, Россия), центрифугу «Elmi CM 6M» (Elmi, Латвия), встряхиватель пробирок «Shaker S 3.01» (Elmi, Латвия), встряхиватель лабораторный медицинский «Vortex» (Elmi, Латвия), роторно-вакуумный испаритель «VV-Micro» (Heidolph, Германия).

В качестве стандарта использовали субстанцию фабомотизола, предоставленную разработчиками препарата. Матричный раствор (1 мг/мл) готовили на метаноле и хранили при температуре 4 °С.

Определение концентрации фабомотизола в плазме крови выполняли методом абсолютной калибровки по площади пиков. Калибровочные растворы готовили путем добавления к интактной плазме крови кроликов рассчитанного объема раствора стандарта фабомотизола с концентрацией 10 мкг/мл.

Калибровочную зависимость площади хроматографического пика от концентрации фабомотизола определяли в диапазоне концентраций 50—1000 нг/мл по 6 точкам, для каждой точки выполняли 5 измерений.

Для экстракции фабомотизола из плазмы крови и приготовления подвижной фазы применяли следующие реактивы: ацетонитрил «для ВЭЖХ» (Merck, Германия), кислота уксусная ледяная ХЧ (Экос-1, Россия), триэтиламин «для ВЭЖХ» (Lab-Skan, Польша).

Для расчета метрологических характеристик и основных валидационных параметров разработанной методики применялись программы «Statistica 7.0» и «Microsoft Excel», а также руководство Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation (2013). Для оценки зависимости плазменной концентрации фабомотизола от площади хроматографического пика определяли коэффициент корреляции Пирсона.

Результаты и их обсуждение. Исследование выполнялось в изократическом режиме. В качестве подвижной фазы применялась смесь ацетонитрил—вода—метанол—кислота уксусная ледяная—триэтиламин в соотношении 100 : 240 : 100 : 0,3 : 0,25 с рН 6,10. Время удерживания фабомотизола составило $10,00 \pm 0,11$ мин. Предел определения и предел детектирования составили соответственно 3,4 и 7,8 нг/мл.

Экстракция фабомотизола из плазмы крови осуществлялась эфиром диэтиловым (1,5 мл плазмы и 6 мл ацетонитрила) путем встряхивания на приборе Shaker при 400 об./мин в течение 10 мин, центрифугирования при 3500 об./мин 10 мин и упаривания супернатанта при 40 °С. Коэффициент экстракции составил 87%.

Метрологические характеристики методики представлены в таблице 1.

Таблица 1

Метрологические характеристики разработанной методики количественного определения афобазола в плазме крови кроликов

Концентрация стандартного раствора фабомотизола в плазме крови, нг/мл	Результаты статистической обработки полученных результатов				
	\bar{x}	Δx	$\bar{x} + \Delta x_{\text{ср.}}$	$v, \%$ (прецизионность)	$\varepsilon_{\text{ср.}}, \%$ (точность)
50,00	53,60	0,46	$53,60 \pm 1,25$	0,85	1,80
100,00	101,22	3,07	$101,22 \pm 7,49$	3,04	1,22
200,00	211,32	1,80	$211,32 \pm 4,40$	0,85	5,66
400,00	398,36	11,39	$398,36 \pm 27,76$	2,86	0,41
600,00	576,34	7,19	$576,34 \pm 17,52$	1,25	3,94
1000,00	1 012,04	21,94	$1 012,04 \pm 53,47$	2,17	1,20

Примечание: \bar{x} — среднее арифметическое; Δx — стандартное отклонение; $\Delta x + \Delta x_{\text{ср.}}$ — 95%-й доверительный интервал; $\Delta x_{\text{ср.}}$ — стандартное отклонение; v — коэффициент вариации; $\varepsilon_{\text{ср.}}$ — стандартная ошибка измерения.

В указанном диапазоне концентраций зависимость «концентрация фаботомизола — площадь пика» носила линейный характер (рисунок 1). Коэффициент корреляции Пирсона составил 0,99935. Уравнение регрессии имело вид: $y = 1,9994 \cdot x + 10,536$, где x — площадь пика, а y — концентрацию фаботомизола.

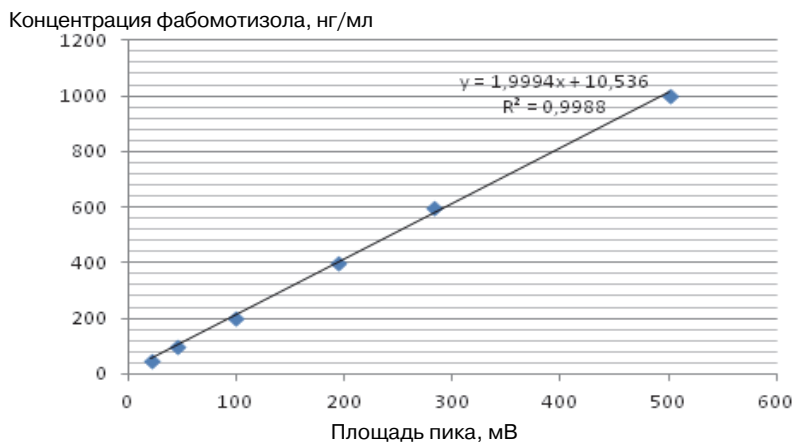


Рис. 1. График зависимости «концентрация фаботомизола — площадь пика»

Образцы полученных хроматограмм представлены на рисунках 2—3. Пики фаботомизола отделены от пиков эндогенных соединений, что позволяет достоверно определить исследуемое вещество.

Коэффициент разделения (разрешения) пика фаботомизола и ближайшего пика созкстрактивных веществ (рис. 3) вычислялся как разность времен удерживания указанных пиков, разделенных на сумму их широт на половине высот. Данный параметр составил более 2.

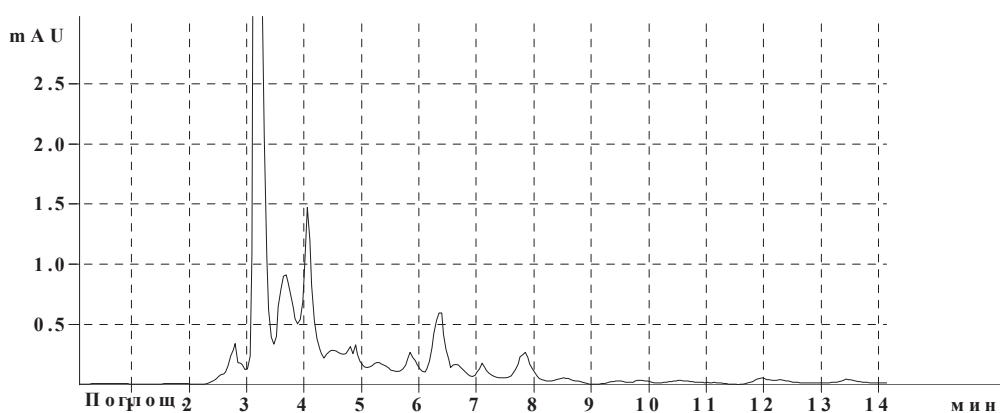


Рис. 2. Хроматограмма пробы интактной плазмы крови коликов

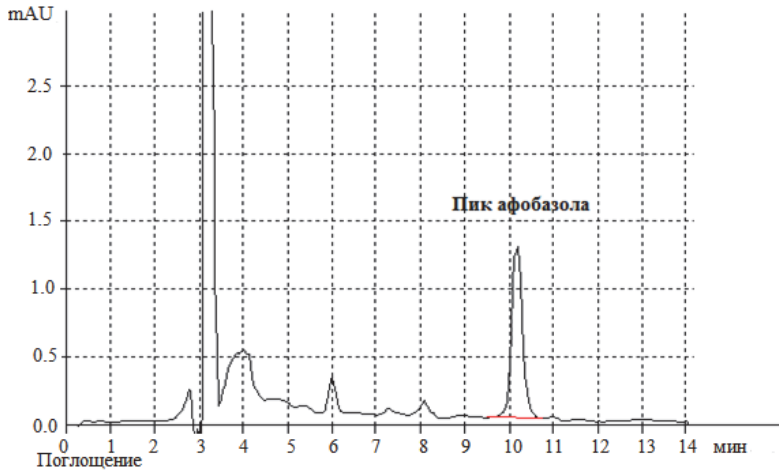


Рис. 3. Хроматограмма пробы плазмы крови кроликов с добавлением стандарта фаботимизоладо концентрации 50 нг/мл

На рисунке 4 представлен участок хроматограммы, демонстрирующий пределы обнаружения и количественного определения фаботимизола, которые вычислялись как концентрации аналита, дающие соответственно пики с высотами, 3-кратно и 10-кратно превышающими высоту пиков шума на расстоянии, 20-кратно превышающем ширину пика на половине его высоты. Ширина пика пробы с концентрацией 1000 нг/мл на половине его высоты составляла 0,25 мин, что соответствует 10-минутному участку хроматограммы [7]. Самый высокий пик на указанном участке составлял 0,02 мВ.

Ведущим методом исследования фармакокинетики лекарственных средств как на доклиническом, так и на клиническом этапах является ВЭЖХ. Причем универсальным и экономически доступным для большинства лабораторий является УФ-детектирование.

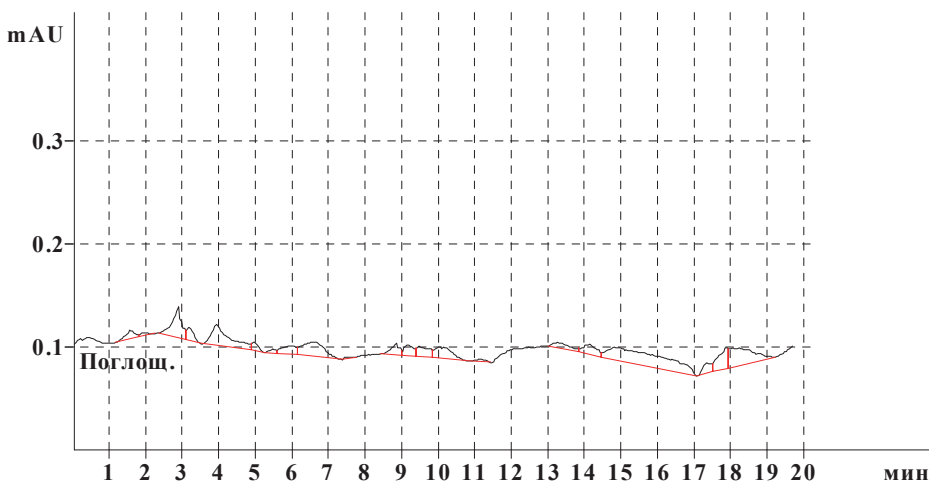


Рис. 4. Участок хроматограммы после инъекции чистой подвижной фазы

В научной литературе представлен ряд ВЭЖХ-методик анализа фабомотизола в плазме крови [2, 5], однако большинство из них мало пригодно для анализа фармакокинетики фабомотизола у кроликов в условиях отечественной лаборатории.

Ряд из них предназначен для исследования растворов лекарственных форм фабомотизола, т.е. не учитывает необходимость его отделения от балластных веществ матрицы (плазмы крови). Многие авторы рекомендуют применение дорогостоящего хроматографического оборудования зарубежного производства, а также масс-спектрофотометрического детектора, что требует серьезных материальных затрат.

Разработанная нами методика лишена указанных выше недостатков и характеризуется чувствительностью, специфичностью, простотой выполнения, высокой разрешающей способностью, воспроизводимостью и линейностью в диапазоне рабочих концентраций. Ее применение рекомендуется для анализа фармакокинетики фабомотизола для исследования его фармакокинетики и принадлежности к субстратам ABCB1-белка. Американская ассоциация FDA требует все потенциально выходящие на рынок лекарственные средства подвергать анализу на их возможную принадлежность к модуляторам функциональной активности ABCB1-белка. Причем анализ *in vivo* рекомендовано осуществлять по фармакокинетики маркерных субстратов транспортера.

Использование для анализа кроликов продиктовано рядом причин: высокой степенью гомологии аминокислотной последовательности кроличьего и человеческого ABCB1-белка [9], схожим спектром индукторов и ингибиторов транспортера кроликов и человека, а также возможностью неоднократного забора крови, что позволяет анализировать фармакокинетическую кривую фабомотизола у одного животного (а не строить усредненную фармакокинетическую кривую, что бывает при использовании крыс; одна крыса позволяет получить только одну точку на фармакокинетической кривой). Кроме этого, возможность неоднократного забора крови у кролика позволяет проследить на одном и том же животном фармакокинетику вещества до и после введения индуктора и/или ингибитора транспортера, а также в периоде отмены. То есть позволяет проводить повторные и перекрестные исследования, что приближает данную биологическую модель к исследованиям на людях.

Выводы. Разработана экономически доступная, воспроизводимая и точная методика количественного определения фабомотизола в плазме крови кроликов методом ВЭЖХ.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Аведисова А.С.* Афобазол — безопасный препарат для лечения тревоги в общей практике // *Русский медицинский журнал*. 2006. Т. 14. № 22. С. 1—3.
2. *Бочков П.О. [и др.]* Фармакокинетическая оценка пролонгированной лекарственной формы афобазола в сравнении с таблетками препарата, выпускаемыми промышленностью // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2013. Т. 76. № 11. С. 33—35.
3. *Воронина Т.А., Середенин С.Б.* Ноотропные и нейропротекторные средства // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2007. Т. 70. № 4. С. 44—58.

4. Гацанова М.В., Черных И.В., Шулькин А.В. и др. Можно ли оценивать принадлежность лекарственных веществ к субстратам гликопротеина-Р на самках кроликов породы Шиншилла // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2016. Т. 4. № 4. С. 5—10.
5. Грушевская Л.Н., Милкина С.Е., Степаненко О.Б. и др. Фармацевтический анализ и стандартизация твердой лекарственной формы афобазола // Химико-фармацевтический журнал. Т. 44. № 9. С. 49—52.
6. Токсикологическая химия метаболизм и анализ токсикантов / под ред. Н.И. Калетиной. М.: ГЭОТАР-МЕДИА, 2008. 977 с.
7. Энттейн Н.А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 2004. Т. 38. № 4. С. 40—56.
8. Якушева Е.Н., Черных И.В., Бирюкова А.С. Характеристика гликопротеина-Р как белка-транспортера лекарственных веществ // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. 2011. № 3. С. 142—148.
9. Dey S., Patel J., Anand B.S. et al. Molecular evidence and functional expression of P-glycoprotein (MDR1) in human and rabbit cornea and corneal epithelial cell lines // Invest. Ophthalmol. 2003. Vol. 44. № 7. P. 2909—2918.
10. Ecker G. et al. The importance of a nitrogen atom in modulators of multidrug resistance // Mol. Pharmacol. 1999. Vol. 56. № 4. P. 791—796.
11. El-Ela A.A. [et al.] Identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors among psychoactive compounds—implications for pharmacokinetics of selected substrates // J. Pharm. Pharmacol. 2004. Vol. 56. № 8. P. 967—975.
12. Nare B. et al. Benzimidazoles — potent anti-mitotic drugs: substrates for the P-glycoprotein transporter in multidrug-resistant cells // Biochemical pharmacology. 1994. Vol. 48. № 12. P. 2215—2222.

DOI: 10.22363/2313-0245-2017-21-4-432-439

DESIGN OF HPLC METHODS OF AFOBAZOLE QUANTITATIVE ANALYSIS IN BLOOD PLASMA

Yakusheva E.N., Chernih I.V.,
Shchulkin A.V., Gatsanoga M.V.

Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

Abstract. The article describes a method of quantitative analysis of anxiolytic drug with neuroprotective activity — fabomotizole (afobazole) in rabbit blood plasma by HPLC with UV detection at 302 nm. The analysis was performed in isocratic mode using Stayer chromatography system and a reversed-phase column Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250 × 4.6, 4 μm) and a mobile phase (acetonitrile—water—glacial acetic acid—triethylamine in the ratio 100 : 240 : 100 : 0,3 : 0,25) at pH 6.1. The retention time of test-substance was 10,00 ± 0,11 min.

Fabomotizole extraction from plasma carried using diethyl ether (1.5 ml plasma and 6 ml acetonitrile) by shaking on Shaker apparatus at 400 vol./min for 10 minutes, centrifuging at 3500 rpm. for 10 minutes and evaporation of the supernatant on a vacuum rotary evaporator at 40 °C. The recovery was 87%.

The developed technique is characterized by sensitivity, specificity, ease of implementation, reproducibility and linearity in the plasma concentration range after oral administration of 3.8 mg of the substance (Afobazol tablets, 10 mg, Pharmstandart-Leksredstva, Russia) to rabbits.

Key words: afobazole, HPLC, pharmacokinetics, rabbits

REFERENCES

1. Avedisova A.S. Afobazol is a safe drug for the treatment of anxiety in general practice. *Russian medical journal*. 2006. T. 14. № 22. P. 1—3.
2. Bochkov P.O. et al. The pharmacokinetic evaluation of a prolonged drug dosage form of afobazol in comparison with tablets of the preparation, manufactured by industry. *Experimental and clinical pharmacology*. 2013. P. 76. № 11. P. 33—35.
3. Voronina T.A., Seredenin S.B. Nootropic and neuroprotective agents. *Experiment-clinical pharmacology*. 2007. P. 70. № 4. P. 44—58.
4. Gatsanoga M.V., Chernykh I.V., Shchulkin A.V. et al. Is it possible to assess affiliation medicinal substances to glycoprotein-P substrates on female rabbits of Shinshilla. *Science of the young (Eruditio Juvenium)*. 2016. Vol. 4. № 4. P. 5—10.
5. Grushevskaya L.N., Milkina S.E., Stepanenko O.B. Pharmaceutical analysis and standartization of the solid dosage form of afobazole. *Chemical-Pharmaceutical Journal cash*. T. 44. № 9. P. 49—52.
6. Toxicological chemistry metabolism and analysis of toxicants. Ed. N.I. Kaletina. Moscow: GEOTAR-MEDIA, 2008. 977 p.
7. Epstein N.A. Assessment of fitness (validation) of HPLC techniques in the pharmaceutical analysis (review). *Chemical-pharmaceutical journal*. 2004. P. 38. № 4. P. 40—56.
8. Yakusheva E.N., Chernykh I.V., Biryukova A.S. Characterization of glycoprotein-P as a protein-transporter of medicinal substances. *Ros. medico-biol. known. them. acad. I.P. Pavlova*. 2011. № 3. P. 142—148.
9. Dey S., Patel J., Anand B.S. et al. Molecular evidence and functional expression of P-glycoprotein (MDR1) in human and rabbit cornea and corneal epithelial cell lines. *Invest. Ophthalmol*. 2003. Vol. 44. № 7. P. 2909—2918.
10. Ecker G. et al. The importance of a nitrogen atom in modulators of multidrug resistance. *Mol. Pharmacol*. 1999. Vol. 56. № 4. P. 791—796.
11. El-Ela A.A. et al. Identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors among psychoactive compounds-implications for pharmacokinetics of selected substrates. *J. Pharm. Pharmacol*. 2004. Vol. 56. № 8. P. 967—975.
12. Nare B. et al. Benzimidazoles — potent anti-mitotic drugs: substrates for the P-glycoprotein transporter in multidrug-resistant cells. *Biochemical pharmacology*. 1994. Vol. 48. No. 12. P. 2215—2222