

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АМІЗОНУ В ПЛАЗМІ КРОВІ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

О.В. Ільченко, О.О. Пентюк, Н.В. Заїчко, О.С. Азаров
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА

Розроблено унікальний метод кількісного визначення амізону в плазмі крові. До 0,5 мл плазми крові додавали 1,5 мл ацетонітрилу. Суміш центрифугували, надосадову рідину зливали і додавали до неї 3,5 мл хлороформу. Суміш рідин струшували протягом 30 с, потім центрифугували. Верхній рідкий шар після фільтрування хроматографували на колонці Zorbax Eclipse XDB-C8 (150x2,1 мм, 5 мкм). Застосовано ізократичне елюювання. Склад мобільної фази (за об'ємом): 40 % метанол на 0,04 М фосфатному буфері (рН=3,0) з додаванням гептансульфонату натрію (0,1 мг/мл). Детектування проводили при довжині хвилі 268 нм. У діапазоні концентрацій амізону від 0,1 до 50 мкг/мл зберігається пропорційна залежність між площею хроматографічного піку та кількістю препарату в пробі. Виявлено, що через 1-6 год після прийняття 500 мг препарату його концентрація в крові є незвичайно малою та не перевищує 50-80 нг/мл.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **амізон, вискоєфективна рідинна хроматографія.**

ВСТУП. Амізон – ненаркотичний анальгетик, розроблений та синтезований в Україні. Він являє собою сполуку з ряду похідних ізонікотинової кислоти, а саме: N-метил-4-бензилкарбамідопіридинію йодид. Має виражену протизапальну, жарознижувальну, інтерферогенну й імунomodуючу дії [1, 6, 9].

Розробка нових лікарських форм цього препарату, численні дослідження використання амізону в інших галузях медицини (наприклад як противірусний засіб) потребують визначення концентрації амізону з метою вивчення його розподілу по органах та дослідження параметрів його фармакокінетики, що, у свою чергу, є необхідним для відпрацювання частоти призначення препарату і величини його дози.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. До 0,5 мл плазми крові додавали 1,5 мл ацетонітрилу. Пробу енергійно струшували протягом 1 хв, після чого центрифугували 10 хв при 1000 об./хв. Надосадову рідину відокремлювали, додавали до неї 3,5-4,0 мл хлороформу. Суміш рідин енергійно струшували протягом 30 с, після чого рідини розділяли шляхом центрифугування впродовж 10-20 хв при 3000 об./хв. При цьому рідина розшаровувалась: верхній шар – водний розчин, нижній – хлороформ-ацетонітрильна суміш.

Верхній рідкий шар відбирали та пропускали крізь мембранний фторопластовий фільтр © О.В. Ільченко, О.О. Пентюк, Н.В. Заїчко, О.С. Азаров, 2007.

МФФКГ-3 (НПФ "Біохром") з розміром пор 0,45 мкм.

Кількісне визначення амізону проводили на вискоєфективному рідинному хроматографі HP-1100 "Leonardo" з колонкою розміром 150x2,1 мм, заповненою твердою фазою Zorbax Eclipse XDB-C8 з розміром гранул 5 мкм. У колонку вводили 20 мкл відфільтрованої рідини. Застосовували ізократичне елюювання зі складом мобільної фази (за об'ємом):

А (60 %) – 0,04 М фосфатний буфер (рН=3,0), який містив гептансульфонат натрію (1-heptanesulfonic acid sodium salt, SIGMA) у кількості 0,1 мг/мл;

В (40 %) – метанол (HPLC grade, ALDRICH). Швидкість елюювання – 100 мкл/хв, температура колонки – 20 °С. Детектування амізону проводили при довжині хвилі 268 нм. За цих умов час виходу амізону з колонки складав приблизно 14 хв.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. На момент виконання роботи методів визначення концентрації амізону в біологічних рідинах, у тому числі й методом вискоєфективної рідинної хроматографії, не існувало.

Амізон за хімічною структурою є четвертинною амонієвою сполукою. Цілком природно, що найпростіший метод кількісного визначення препарату – метод вискоєфективної рідинної хроматографії – повинен передбачати застосування іонообмінної колонки. Але через високу вартість, порівняно з традиційними зворотно-

фазними С8-С18, використання іонообмінних колонок не було досліджено. З тієї ж причини не досліджували спеціально дезактивовані фази С8-С18.

Метод значно спрощується завдяки заміні міжфазної екстракції з плазми крові (рідина-рідина або у твердофазному патроні) на однофазну екстракцію в ацетонітрил, що є набагато дешевшою процедурою порівняно з екстракцією у твердофазних патронах.

Концентрацію препарату визначали методом зовнішнього стандарту. Як стандарт використовували зразки плазми крові, до яких додавали певну кількість розчину субстанції амізону фармакопейної якості (ВАТ "Фармак", Україна).

Стандартні зразки піддавали такій самій обробці, як і зразки, що підлягали визначенню вмісту амізону.

При визначенні величини втрат амізону в процесі пробопідготовки однакову кількість розчину препарату додавали до певних об'ємів плазми та води. Концентрація амізону в розчинах складала 1, 3, 10 мкг/мл. Розчини препарату в плазмі та частину водних розчинів піддавали повному циклу пробопідготовки, інша частина водних розчинів являла собою контроль, її вводили в колонку безпосередньо після фільтрування. Встановлено, що відносні втрати амізону в процесі пробопідготовки не залежать від концентрації та складають 3-5 %.

У діапазоні концентрацій амізону від 0,1 до 50 мкг/мл зберігалася пропорційна залежність між площею хроматографічного піку та кількістю препарату в пробі.

При визначенні препарату, доданого до плазми у концентраціях від 0,50 до 4,00 мкг/мл (серіями по 5 паралельних проб), величина відносної похибки середнього результату не перевищувала 4,5 % для довірчого інтервалу $P=0,95$. Нижня межа визначення амізону складала 100 нг/мл (відношення "сигнал/шум" > 10).

Описаним методом проведено визначення концентрації амізону в плазмі крові людей при прийманні його у вигляді таблеток. Концентрацію визначали у трьох здорових добровольців – чоловіків віком від 35 до 45 років, середня

маса тіла – $(75 \pm 3,3)$ кг. Вони натще приймали амізону (500 мг), запиваючи його 100 мл води. Кров для аналізу брали з ліктьової вени до приймання препарату і через 1, 2, 4, 6 год після його прийняття. Кров відбирали в пробірки, які містили ЕДТА у кількості, еквівалентній 1 мг/мл крові. З одержаної крові виділяли плазму, яку піддавали подальшій обробці.

Встановлено, що концентрація амізону в плазмі крові після його прийняття у дозі 500 мг є неочікувано малою, перебуває фактично на межі визначення методу і складає від 80 (на 1 годину після прийняття) до 50 нг/мл (на 6 годину після прийняття).

Було висунуто припущення, що амізону розкладається в крові або плазмі. З метою перевірки цього припущення у добровольця Ю. було взято 10 мл крові до пробірки, що містила 10 мг ЕДТА та 0,1 мл розчину амізону з концентрацією 100 мкг/мл. Після ретельного перемішування з ЕДТА кров залишалася протягом 2 год при кімнатній температурі. Потім відокремлювали плазму і заморожували її при -12°C на 12 год. Після розморожування в плазмі визначали кількість препарату. При цьому будь-якого розкладення амізону в крові або плазмі за описаних умов пробопідготовки не спостерігалось.

ВИСНОВКИ. 1. Розроблено методику кількісного визначення амізону в плазмі крові на високоефективному рідинному хроматографі НР-1100.

2. Встановлено, що концентрація амізону в сироватці людини після перорального приймання препарату в терапевтичних дозах є надзвичайно низькою порівняно з концентрацією інших лікарських препаратів, які приймають у такій же кількості [2-5, 7, 8]. Причиною цього може бути або погане всмоктування амізону з ШКТ, або велика швидкість метаболізму амізону. В будь-якому випадку є сенс дослідити можливість створення нової лікарської форми амізону, застосування якої дозволило б при зменшенні дози препарату збільшити його концентрацію в крові.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бухтиарова Т.А. Амизон – новый неопиоидный анальгетик с противовоспалительным, жаропонижающим и интерферонотропными свойствами // Ліки. – 1997. – № 3. – С. 69-70.

2. Волощук Н.І., Пендюк О.О., Гулько І.П., Ільченко О.В. Вплив статевого диморфізму на фарма-

кокінетику та анальгезуючий ефект німесулід // Ліки. – 2003. – № 1-2. – С. 51-59.

3. Ильченко А.В., Азаров А.С. Флуорометрическое определение концентрации берберина в крови // Клини. лаб. диагностика. – 1994. – № 4. – С. 49-50.

4. Ильченко О.В., Луцюк М.Б. Флуорометричне визначення концентрації фенікаберану в крові // Фармац. журн. – 1993. – № 4. – С. 18.

5. Ильченко О.В., Станіславчук М.А., Пентюк О.О. Флуориметричний спосіб визначення ацетилсаліцилової та саліцилової кислот в біологічному матеріалі за умов їх одночасної присутності // Фармац. журн. – 1995. – № 6. – С. 56-58.

6. Карпова О.И. Амизон – новый отечественный ненаркотический анальгетик // Проблемы медицины. – 1998. – № 3. – С. 38-39.

7. Косован А.І., Яковлева О.О., Ильченко О.В. та ін. Кількісне визначення теофіліну в сироватці крові

методом високоефективної рідинної хроматографії // Мед. хімія. – 2001. – 3, № 2. – С. 81-84.

8. Пентюк А.А., Ильченко А.В., Серкова В.К. и др. Сравнительная фармакокинетика хинидина сульфата и лечебные формы хинидина, полученные в результате конъюгации на поверхности высокодисперсных кремнеземов // Українська наукова конференція за участю країн СНД "Актуальні проблеми клінічної фармакології": Тези доповідей. – Вінниця, 1993. – С. 209.

9. Фролов А.Ф., Фролов В.М., Лоскутова И.В. Опыт клинического применения нового украинского препарата АМИЗОНА // Еженедельник Аптека. – 2000. – № 4 (225). – С. 32-33.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИЗОНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

А.В. Ильченко, А.А. Пентюк, Н.В. Заичко, А.С. Азаров
ВИННИЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Н.И. ПИРОГОВА

Резюме

Разработан уникальный метод количественного определения амизона в плазме крови. К 0,5 мл плазмы крови добавляли 1,5 мл ацетонитрила. Смесь центрифугировали, надосадочную жидкость сливали и добавляли к ней 3,5 мл хлороформа. Смесь жидкостей встряхивали в течение 30 с, затем центрифугировали. Верхний редкий слой после фильтрования хроматографировали на колонке Zorbax Eclipse XDB-C8 (150x2,1 мм, 5 мкм). Применено изократическое элюирование. Состав мобильной фазы (по объему): 40 % метанол на 0,04 М фосфатном буфере (рН=3,0) с добавкой гептансульфоната натрия (0,1 мг/мл). Детектирование проводили при длине волны 268 нм. В диапазоне концентраций амизона от 0,1 до 50 мкг/мл сохраняется пропорциональная зависимость между площадью хроматографического пика и количеством препарата в пробе. Оказалось, что через 1-6 часов после приема 500 мг препарата его концентрация в крови необычайно низка и не превышает 50-80 нг/мл.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: амизон, высокоэффективная жидкостная хроматография.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF AMIZONE IN BLOOD PLASMA BY HIGHLY-EFFECTIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD

O.V. Ilchenko, O.O. Pentyuk, N.V. Zaichko, O.S. Azarov
VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY M.I. PYROHOV

Summary

A unique highly-effective liquid chromatographic procedure was developed for amizone quantification in blood plasma. The method involves precipitation of proteins with acetonitrile (1,5 ml AcN to 0,5 ml of plasma) followed by treatment of supernatant by 3,5 ml of Chloroformium. The mixture of fluids was shaken up within 30 seconds, then it was centrifuged. The separation of amizone was achieved on a column Zorbax Eclipse XDB-C8 (150x2,1 mm, 5 microns). The mobile phase consisted of 40 % (vol/vol) methanol in 0,04 M phosphate buffer (pH 3,0) containing 1-heptanesulfonic acid sodium salt (0,1 mg/ml) as an ion pairing agent. Quantitation of indomethacin was performed by UV detection at 268 nm. The linearity between chromatographic peak area and concentration was obtained in the concentration range 0,1-50 micrograms/ml. It was revealed, that therapeutic concentration of amizon is unusually low and does not exceed 50-80 ng/ml.

KEY WORDS: amizone, highly-effective liquid chromatography.

Отримано 17.04.2006 р.

Адреса для листування: О.В. Ильченко, а/с 3032, Вінниця, 21027, Україна.