

ВИЗНАЧЕННЯ НІМЕСУЛІДУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

О.С. Азаров, Я.П. Вербіловський, Н.І. Волощук, О.В. Ільченко
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА

Розроблено простий та швидкий метод визначення німесулід у плазмі крові. 0,2 мл сироватки крові підкислювали 0,02 мл 1 М соляної кислоти. До проби додавали внутрішній стандарт (індометацин) та 0,6 мл ацетонітрилу. Суміш струшували протягом 1 хв. Після завершення однофазної екстракції пробу центрифугували при 3000 об./хв протягом 30 хв. Надосадову рідину після фільтрування на фільтрі з розміром пор 0,45 мкм вводили в хроматографічну колонку (20 мкл). Колонку розміром 125x4 мм було заповнено сорбентом *Hypersil BDS C18* з розміром гранул 5 мкм. Застосовано ізократичне елюювання зі складом мобільної фази – 50 % 0,03 М цитратного буфера (рН=3,1) і 50 % ацетонітрилу, швидкість елюювання – 600 мкл/хв, температура колонки – 20 °С. Детектування німесулід проводили при довжині хвилі 240 нм. За цих умов час виходу німесулід з колонки складав 5,9 хв, а час виходу внутрішнього стандарту (індометацину) – 8,5 хв. У діапазоні концентрацій німесулід в сироватці від 0,2 до 50 мкг/мл зберігалась пропорційна залежність між площею хроматографічного піку та кількістю препарату в пробі.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: німесулід, вискоефективна рідинна хроматографія.

ВСТУП. Німесулід (4-нітро-2-феноксиметансульфонанлід) належить до широко застосовуваних в клініці нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП). Фармакологічний ефект більшості НПЗП тісно пов'язаний з особливістю їх фармакокінетики. У чисельних дослідженнях було виявлено кореляцію між величиною протизапальної дії НПЗП та параметрами їх фармакокінетики: стаціонарною концентрацією препаратів у крові пацієнтів, періодом їх напіввиведення, площею під фармакокінетичною кривою, середнім часом утримання препаратів у плазмі крові [2, 5, 10].

Головним метаболітом німесулід є продукт його гідроксилювання – 4-гідроксинімесулід [4, 9, 11]. Ідентифіковано також продукти відновлення німесулід по нітрогрупі, ацетилювання по аміногрупі та інші кон'юговані похідні. Слід взяти до уваги, що метаболіти німесулід, порівняно з незміненою формою препарату, проявляють незначні протизапальну та знеболювальну дії [3].

Розробка нових лікарських форм цього препарату потребує визначення концентрації німесулід з метою вивчення його розподілу по органах та дослідження параметрів його фармакокінетики, що, у свою чергу, є необхід-

© О.С. Азаров, Я.П. Вербіловський, Н.І. Волощук, О.В. Ільченко, 2008.

ним для відпрацювання частоти призначення препарату і величини його дози.

Звідси стає зрозумілим, що для визначення індивідуальних параметрів фармакокінетики німесулід (а це необхідно, щоб підтримувати концентрацію препарату в терапевтичних межах) існує потреба в швидкому та дешевому методі визначення його концентрації в біологічних рідинах.

Існуючі методи визначення німесулід базуються на екстракції речовини з плазми в гідрофобний розчинник (найчастіше галогеналкани) з подальшою реекстракцією і наступним хроматографічним визначенням [6-8].

Однак, як показали наші дослідження, ступінь екстракції німесулід з біологічних рідин досить низький (не перевищує 70 %) і, до того ж, значно варіює. Для дослідження фармакокінетики даного препарату було розроблено власний метод із застосуванням вискоефективної рідинної хроматографії, який дозволяє відмовитись від попередньої екстракції німесулід в гідрофобний розчинник. Замість двофазної екстракції використовували однофазну, коли один з компонентів рухливої хроматографічної фази (ацетонітрил) додавали безпосередньо до сироватки крові. Як стандартний зразок застосовували німесулід фірми "Sigma" (USA).

При розробці методу відому кількість препарату додавали до сироватки, яка не містила німесулід. При цьому було встановлено, що сироватка крові не містить речовин, час виходу яких з колонки збігався б з часом виходу німесулід.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. 0,2 мл сироватки крові підкисляли 0,02 мл 1 М соляної кислоти, після перемішування додавали внутрішній стандарт – 0,05 мл індометацину (фірми “Sigma”, USA) з концентрацією 5 мкг/мл, після перемішування – 0,6 мл ацетонітрилу. Пробу енергійно струшували протягом 1 хв. За цей час практично весь доданий німесулід (приблизно 90 %) переходив у розчин. Далі пробу центрифугували при 3000 об./хв протягом 30 хв. Надосадову рідину фільтрували на мембранному фторопластовому фільтрі МФФКГ-3 (НПФ “Біохром”) з розміром пор 0,45 мкм.

Кількісне визначення німесулід проводили на високоефективному рідинному хроматографі HP-1100 на колонці розміром 125×4 мм, заповненій твердою фазою Hypersil BDS C18 з розміром гранул 5 мкм. У колонку вводили 20 мкл відфільтрованої надосадової рідини. Застосовано ізократичне елюювання зі складом мобільної фази – 50 % 0,03 М цитратного буфера (рН=3,1) і 50 % ацетонітрилу, швидкість елюювання – 600 мкл/хв, температура колонки – 20 °С. Детектування німесулід проводили при довжині хвилі 240 нм. За цих умов час виходу німесулід з колонки складав 5,92 хв, а час виходу внутрішнього стандарту (індометацину) – 8,45 хв. В діапазоні концентрацій німесулід від 0,2 до 50 мкг/мл зберігалась пропорційна залежність між площею хроматографічного піку та кількістю препарату в пробі. Встановлено, що відношення площі піків індометацину (внутрішнього стандарту) до площі піків німесулід є величиною сталою і дорівнює 1,77 за умови рівності їх концентрацій, виражених в одиницях маси на одиницю об'єму

(мкг/мл). Концентрацію німесулід в сироватці крові розраховували за такою формулою:

$$C = \frac{S_H \cdot K_1 \cdot K_2 \cdot C_i}{S_i},$$

де S_H – площа піку німесулід;

S_i – площа піку індометацину;

K_1 – калібрувальний коефіцієнт – відношення площі піків індометацину до площі піків німесулід, взятих в однакових концентраціях (за нашими даними, $K_1=1,77$);

K_2 – коефіцієнт розведення – відношення об'єму проби після додавання всіх компонентів до вихідного об'єму проби (в наших умовах $K_2=4,35$);

C_i – концентрація внутрішнього стандарту в кожній пробі ($C_i=5,75$ мкг/мл).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Нами досліджені також метрологічні параметри методу визначення німесулід. Було виявлено, що запропонований метод характеризується точністю, достатньою відтворюваністю та високою чутливістю.

Так, при визначенні німесулід, доданого до сироватки у концентраціях від 0,50 до 4,00 мкг/мл (серіями по 5 паралельних проб), величина відносної похибки середнього результату не перевищувала 3,5 % для довірчого інтервалу $P=0,95$. Нижня межа визначення даного препарату складала 25 нг/мл (відношення “сигнал/шум” > 10).

Метод був використаний для визначення німесулід в деяких роботах (наприклад, [1]) та виявився швидким, зручним у виконанні, потребуючи мінімальної ручної праці.

ВИСНОВОК. Розроблено чутливий, простий у виконанні та відтворюваний метод визначення німесулід в біологічних рідинах, який полягає в екстракції препарату ацетонітрилом і його визначенні методом високоефективної рідинної хроматографії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Волощук Н.І., Ільченко О.В., Пентюк О.О., Гунько І.П. Вплив статевого диморфізму на фармакокінетику та анальгезуючий ефект німесулід // Ліки. – 2003. – № 1-2. – С. 51-59.
2. Станіславчук М.А. Оптимізація фармакотерапії хворих на ревматоїдний артрит нестероїдними протизапальними та анальгетичними препаратами. Фармакокінетичні та фармакодинамічні підходи: Дис. ... д-ра мед. наук. – К., 1997. – 48 с.
3. Bernareggi A. The pharmacokinetic profile of

nimesulide in healthy volunteers // Drugs. – 1993. – **46**, Suppl. 1. – P. 64-72.

4. Carini M., Aldini G., Stefani R. et al. Mass spectrometric characterization and HPLC determination of the main urinary metabolites of nimesulide in man // J. Pharm. Biomed. Anal. – 1998. – **18**, № 1-2. – P. 201-211.

5. Davies N.M., Anderson K.E. Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls // Clin. Pharmacokinetic. – 1997. **33**, № 3. – P. 184-213.

6. Giachetti C., Tenconi A. Determination of nimesulide and hydroxynimesulide in human plasma by high performance liquid chromatography // Biomed. Chromatogr. – 1998. – **12** (2). – P. 50-56.

7. Jaworowicz D.J., Filipowski M.T., Boje K.M. Improved high-performance liquid chromatographic assay for nimesulide // J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. – 1999. – **723** (1-2). – P. 293-299.

8. Khaksa G., Udupa N. Rapid and sensitive method for determination of nimesulide in human plasma by high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. – 1999. – **727**

(1-2). – P. 241-244.

9. Maffei Facino R., Carini M., Aldini G. Differential inhibition of superoxide, hydroxyl and peroxy radicals by nimesulide and its main metabolite 4-hydroxynimesulide // Arzneimittelforschung. – 1995. – **45**, № 10. – P. 1102-1109.

10. Orme M.L. Plasma concentration and therapeutic effect of antiinflammatory and rheumatic drugs // Pharmacol. Ther. – 1982. – **16**. – P. 167-180.

11. Sarkar P., McIntosh J.M., Leavitt R., Gouthro H. A unique metabolite of nimesulide // J. Anal. Toxicol. – 1997. – **21**, № 3. – P.197-202.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИМЕСУЛИДА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

А.С. Азаров, Я.П. Вербиловский, А.В. Ильченко
ВИННИЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Н.И. ПИРОГОВА

Резюме

Разработан простой и быстрый метод определения нимесулида в плазме крови. 0,2 мл сыворотки крови подкисляли 0,02 мл 1 М соляной кислоты. К пробе добавляли внутренний стандарт (индометацин) и 0,6 мл ацетонитрила. Смесь встряхивали на протяжении 1 мин. По завершении однофазной экстракции пробу центрифугировали при 3000 об./мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость после фильтрования на фильтре с размером пор 0,45 мкм вводили в хроматографическую колонку (20 мкл). Колонку размером 125×4 мм было заполнено сорбентом Hypersil BDS C18 с размером гранул 5 мкм. Применено изократическое элюирование с составом мобильной фазы – 50 % 0,03 М цитратного буфера (pH=3,1) и 50 % ацетонитрила, скорость элюирования – 600 мкл/мин, температура колонки – 20 °С. Детекцию нимесулида проводили при длине волны 240 нм. При этих условиях время выхода нимесулида с колонки составляло 5,9 мин, а время выхода внутреннего стандарта (индометацина) – 8,5 мин. В диапазоне концентраций нимесулида в сыворотке от 0,2 до 50 мкг/мл сохранялась пропорциональная зависимость между площадью хроматографического пика и количеством препарата в пробе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нимесулид, высокоэффективная жидкостная хроматография.

DETERMINATION OF NIMESULIDE IN BLOOD SERUM BY METHOD OF HIGHLY-EFFECTIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY

O.S. Azarov, Ya.P. Verbilovsky, N.I. Voloshchuk, O.V. Ilchenko
VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY M.I. PYROHOV

Summary

An easy and rapid method for nimesulide determination in blood plasma was developed. 0,2 ml of blood serum acidified with 0,02 ml 1 M chloric acid. The internal standard (indometacine) and 0,6 ml of acetonitrile were added to the sample. The mixture was shaken for 1 min. After finishing the one-phase extraction the sample was centrifugated at 3 000 rpm during 30 min. The above-sediment liquid was administered into chromatographic column after its filtration through the filter with the pore size 0,45 mcm. The column sized 125×4 mm was filled in with sorbent Hypersil BDS c 18 with the size of granules 5 mcm. The isocratic elutriation with the next composition of mobile phase: 50 % 0,03 M citrate buffer (pH=3,1) and 50 % acetonitrile, the flow-rate – 600 mcl/min, the column temperature – 20 °C. Nimesulide detection was performed at the wavelength 240 nm. Under such conditions the time of nimesulide output from the column was 5,9 min and the time of internal standard (indomethacine) output was 8,5 min. In the range of nimesulide concentration in serum from 0,2 to 50 mkg/ml remained the proportional dependence between the area of chromatographic peak and amount of medication in the sample.

Key words: nimesulide, highly-effective liquid chromatography.

Отримано 19.02.2008 р.

Адреса для листування: О.С. Азаров, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, Вінниця, 21018, Україна.

Медицина хімія – т. 10, № 2, 2008