УДК 615.07:543.544.5.068.7
© Коллектив авторов, 2020
https://doi.org/10.29296/25877313-2020-04-06

ВЫБОР ЭФФЕКТИВНОГО СПОСОБА ПРОБОПОДГОТОВКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ МОНОМЕКАИНА

Ю.Н. Карпенко
к.фарм.н., доцент,
кафедра токсикологической химии, Пермская государственная фармацевтическая академия; ООО «Парма Клиникал»
E-mail: karpenko_pfa@mail.ru
Н.Д. Саидов
ассистент,
кафедра фармации, Таджикский национальный университет (г. Душанбе, Республика Таджикистан)
Е.А. Булгакова
к.фарм.н.,
кафедра токсикологической химии, Пермская государственная фармацевтическая академия
Т.Л. Малкова
д.фарм.н, профессор,
зав. кафедрой токсикологической химии, Пермская государственная фармацевтическая академия

Актуальность. Мономекаин – оригинальное биологически активное соединение с антиаритмическим действием, синтезированное в Пермской государственной фармацевтической академии. На стадии доклинических фармакокинетических исследований среди прочих важно изучить процессы распределения потенциального лекарственного средства в органах и тканях лабораторных животных.
Цель работы - выбор оптимальных условий изолирования мономекаина из биологических объектов с использованием метода жидкость-жидкостной экстракции.
Материал и методы. Исследования проведены на модельных смесях гомогенизированной печени лабораторных животных с добавлением 25, 50, 100 мкг мономекаина. При разработке методики изолирования вещества на стадии настаивания апробированы полярные растворители: вода и ацетонитрил, на стадии экстракции – органические растворители: хлороформ, метилтретбутиловый эфир. Количественное определение мономекаина в извлечениях выполнено методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе «LC-20 Prominence» (Shimadzu) с диодноматричным детектором.
Результаты. Установлено, что мономекаин наиболее эффективно извлекается при настаивании биологического объекта с ацетонитрилом с последующей экстракцией хлороформом. Степень извлечения мономекаина из ткани печени составила более 80%.
Выводы. Разработанная методика обеспечивает высокую степень извлечения исследуемого вещества, отличается воспроизводимостью, простотой исполнения и может быть использована в доклинических фармакокинетических исследованиях.

Ключевые слова: **:** *антиаритмические средства, мономекаин, высокоэффективная жидкостная хроматография, жидкость-жидкостная экстракция, фармакокинетические исследования.*

Для цитирования: Карпенко Ю.Н., Саидов Н.Д., Булгакова Е.А., Малкова Т.Л. Выбор эффективного способа пробоподготовки биологических объектов для исследования фармакокинетики мономекаина. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020;23(4):38–41. **https://doi.org/10.29296/25877313-2020-04-06**

В Пермской государственной фармацевтической академии под руководством профессора В.И. Панцуркина осуществлен синтез 2-метиланилид-N,N-диэтиламиноэтановой кислоты нитрата, получившего название мономекаин. Установлено его антиаритмическое действие, в большей степени выраженное в сравнении с лидокаином. При этом токсичность нового биологически активного соединения оказалась значительно ниже [1].

Доклиническое исследование новых биологически активных соединений предусматривает изучение их фармакокинетических свойств, в том числе процессов распределения в органах и тканях лабораторных животных [2].

Для получения адекватных результатов фармакокинетических исследований важной задачей является разработка высокочувствительных и точных методик определения потенциальных лекарственных средств в биологических объектах. Пробоподготовка биоматериала – наиболее сложный этап биоаналитических методик, правильный выбор условий которого определяет полноту извле-

чения исследуемого соединения. Преимущественно для выделения аналитов из тканей и органов используется доступный вариант жидкость-жидкостной экстракции, обеспечивающий высокую степень очистки получаемых экстрактов.

Так, для экстракции лидокаина (структурного аналога мономекаина) из гомогенатов тканей в химико-токсикологическом анализе и в фармакокинетических исследованиях применяют хлороформ [3], этиловый эфир [4], смесь хлороформ – метанол (8:2) [5].

Ранее проведенные исследования показали, что мономекаин максимально извлекается из водных щелочных растворов метилтретбутиловым эфиром и хлороформом (более 90%) [6]. Поэтому данные экстрагенты могут рассматриваться в качестве перспективных на стадии разработки методики пробоподготовки биоматериала к последующему хроматографическому анализу.

Цель исследования – выбор оптимальных условий изолирования мономекаина из биологических объектов с использованием метода жидкость-жидкостной экстракции.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовалась синтезированная в Пермской государственной фармацевтической академии субстанция мономекаина с содержанием действующего вещества 99,89%.

При разработке методики пробоподготовки для приготовления модельных смесей использована печень интактных лабораторных животных (крыс). Эксперименты, проводимые на животных, одобрены Комиссией по биоэтике Пермской государственной фармацевтической академии.

Приготовление модельных смесей. Биологический образец гомогенизировали в дистиллированной воде (1:4) с помощью ультразвукового гомогенизатора. Далее 5 г гомогената ткани помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, добавляли 250, 500, 1000 мкл водного раствора мономекаина с концентрацией 100 мкг/мл (вносимое количество – 25, 50, 100 мкг). Содержимое колбы перемешивали и оставляли на 2 ч при комнатной температуре.

Методика изолирования. Модельную смесь в конической колбе вместимостью 100 мл заливали 10 мл извлекателя. Учитывая хорошую растворимость мономекаина в полярных растворителях, в качестве извлекателей апробировали подкисленные до pH 2 вода и ацетонитрил. Содержимое колбы настаивали при постоянном перемешивании в течение 1 ч. Вытяжку центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант отделяли, подщелачивали 25%-ным раствором аммония гидроксида до pH 10 и проводили двукратную экстракцию органическим растворителем (хлороформ, метилтретбутиловый эфир) порциями по 3 мл. Время каждой экстракции составляло 5 мин. Объединенные хлороформные извлечения упаривали в токе теплого воздуха, сухой остаток растворяли в 1 мл метанола. Полученный раствор пропускали через мембранный фильтр с размером пор 5 мкм.

Количественное определение мономекаина в извлечениях из биологических объектов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на жидкостном хроматографе «LC-20 Prominence» (Shimadzu) с диодноматричным детектором с использованием ранее разработанных условий [7]. Объем вводимой пробы – 25 мкл. Содержание мономекаина в экстрактах рассчитывали по методу внешнего стандарта (метанольного раствора мономекаина с концентрацией 10 мкг/мл).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенном эксперименте оценивалась эффективность извлечения мономекаина из гомогенизированной ткани печени в зависимости от следующих условий: природы изолирующего агента на стадии настаивания, природы экстрагента, количества вносимого в модельную смесь вещества. Данные о степени извлечения (R,%) мономекаина представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1. ***Степень извлечения (R,%) мономекаина из ткани печени при использовании на стадии настаивания подкисленной воды***

Внесено, мкг	$R_{ср.}$ (n = 6)	SD	RSD
Экстрагент: хлороформ			
25	76,61	4,12	5,38
50	83,14	2,48	2,98
100	86,00	3,44	4,00
Экстрагент: метилтретбутиловый эфир			
25	65,88	3,72	5,65
50	72,07	3,53	4,90
100	75,08	3,74	4,98

Таблица 2. ***Степень извлечения (R,%) мономекаина из ткани печени при использовании на стадии настаивания подкисленного ацетонитрила***

Внесено, мкг	$R_{ср.}$ (n = 6)	SD	RSD
Экстрагент: хлороформ			
25	81,78	3,24	3,96
50	85,27	3,08	3,61
100	87,40	3,77	4,31
Экстрагент: метилтретбутиловый эфир			
25	68,85	3,37	4,90
50	72,68	2,88	3,96
100	73,80	4,47	6,06

Результаты исследования показали, что подкисленные полярные растворители (вода, ацетонитрил) эффективны в качестве изолирующих агентов для мономекаина. Максимальное извлечение мономекаина на всех уровнях концентраций достигалось при использовании на стадии экстракции молекулярной формы аналита хлороформа.

Несмотря на то, что получены сопоставимые результаты по степени извлечения вещества, как при использовании воды, так и ацетонитрила, в качестве оптимального изолирующего агента был выбран ацетонитрил. При выборе растворителя руководствовались следующими фактами: ацетонитрильное извлечение визуально более чистое по сравнению с водным, быстро фильтруется, при встряхивании с хлороформом практически не образует эмульсию.

В ходе данного эксперимента была подтверждена пригодность ранее разработанных условий ВЭЖХ [7] для анализа экстрактов из биологических объектов.

На рисунке представлена хроматограмма извлечения из модельной смеси печени с содержанием мономекаина 25 мкг/г. Время удерживания мономекаина (6,8 мин) соответствует времени удерживания вещества на хроматограмме стандартного раствора.

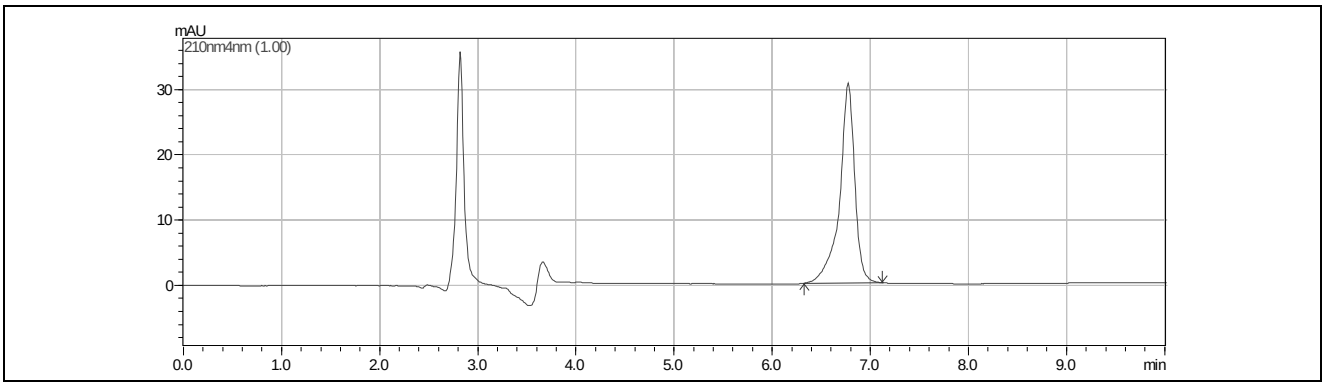

Рис. 1. Хроматограмма извлечения из модельной смеси печени (содержание мономекаина 25 мкг/г)

Для оценки специфичности хроматографических условий были получены и проанализированы извлечения из внутренних органов интактных лабораторных животных (печень, почки, сердце, мышечная ткань). Извлечение из «холостых» объектов производили в соответствии с разработанной методикой изолирования мономекаина. Установлено отсутствие интерферирующих пиков со временами удерживания, близкими к мономекаину, на хроматограммах всех исследованных образцов.

ВЫВОДЫ

Определены оптимальные условия и разработана методика изолирования нового биологически активного соединения мономекаина из тканей и органов лабораторных животных. Предложенная методика обеспечивает высокую степень извлечения исследуемого вещества, позволяет получать воспроизводимые результаты, проста в исполнении, не требует дорогостоящих реагентов и расходных материалов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гашкова О.В., Панцуркин В.И., Рудакова И.П. и др.* Синтез и антиаритмическая активность четвертичных производных и минеральных солей орто-толуидина диэтиламиноуксусной кислоты. Химико-фармацевтический журнал. 2008; 42(12):8–10.
2. *Миронов А.Н. и др.* Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.

3. *Смирнова А.В., Фомин А.Н., Семёнов М.Б., Каджоян Л.В.* Количественное определение лидокаина и бупивакаина в ткани печени методом капиллярного электрофореза. Успехи современного естествознания. 2017; 12:16–20.
4. *Zhang N. et al.* Comparison of the concentrations of lidocaine in different body fluids/tissues after subarachnoid space and intravenous administration of a lethal dose of lidocaine. Journal of forensic science and medicine. 2015; 1(1):48–53.
5. *Tanaka E. et al.* Lidocaine concentration in oral tissue by the addition of epinephrine. Anesth Prog. 2016; 63:17–24.
6. *Саидов Н.Д., Булгакова Е.А., Малкова Т.Л.* Изучение экстракции мономекаина из водных растворов. Инновационная наука: международный научный журнал. 2019; 7–8:124–125.
7. *Саидов Н.Д.* Выбор условий определения мономекаина в биоматрице для целей фармакокинетических исследований. Вестник Пермской государственной фармацевтической академии: научно-практический журнал. 2018; 21:152–154.

Поступила 13 января 2020 г.

CHOICE OF AN EFFECTIVE METHOD OF BIOLOGICAL OBJECTS PREPARATION FOR RESEARCH OF PHARMACOKINETICS OF MONOMECAINE

© Authors, 2020

Yu.N. Karpenko
Ph.D. (Pharm.), Associate Professor,
Department of Toxicological Chemistry, Perm State Pharmaceutical Academy; LLC «Parma Clinical»
E-mail: karpenko_pfa@mail.ru
N.D. Saidov
Post-graduate Student,
Department of Pharmacy, Tajik National University (Dushanbe, Republic of Tajikistan)
E.A. Bulgakova
Ph.D. (Pharm.),
Department of Toxicological Chemistry, Perm State Pharmaceutical Academy
T.L. Malkova
Dr.Sc. (Pharm.), Full Professor, Head of the Department of Toxicological Chemistry,
Perm State Pharmaceutical Academy

Monomecaine is an original biologically active compound with antiarrhythmic action, synthesized in Perm State Pharmaceutical Academy. At the stage of preclinical pharmacokinetic research, among other things, the processes of distribution of a potential drug in the organs and tissues of laboratory animals are studied. **The purpose** of the work was to select optimal conditions for isolation of monomecaine from biological objects using the liquid-liquid extraction method. **Material and methods.** The research was carried out on model mixtures of homogenized liver of laboratory animals with the addition of 25, 50, 100 mcg monomecaine. During the development of methods of isolating the substance at the stage of infusion tested polar solvents: water and acetonitrile, at the stage of extraction - organic solvents: chloroform, methyltretbutyl ether. The quantitative determination of monomecaine in the extractions was carried out by high perfomance liquid chromatography on the chromatograph "LC-20 Prominence" (Shimadzu) with a diode matrix detector. **Results.** In the course of the experiment it was found that monomecaine is most effectively extracted by infusion of biological object with acetonitrile with subsequent extraction of chloroform. The degree of extraction of monomecaine from liver tissue was over 80%. **Conclusions.** The developed method provides a high degree of extraction of the investigated substance, is notable for its reproducibility, simplicity of execution and can be used in preclinical pharmacokinetic studies.

Key words: *antiarrhythmic agents, monomecaine, high-performance liquid chromatography, liquid-liquid extraction, pharmacokinetic studies.*

For citation: Karpenko Yu.N., Saidov N.D., Bulgakova E.A., Malkova T.L. Choice of an effective method of biological objects preparation for research of pharmacokinetics of monomecaine. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020;23(4):38–41. https://doi.org/10.29296/25877313-2020-04-06

REFERENCES

1. Gashkova O.V., Pahtsurkin V.I., Rudakova I.P. i dr. Sintez i antiaritmicheskaya aktivnost′ chetvertichnyukh proizvodnyukh I mineral′nyukh solei orto-toluidina dietilaminouksusnoi kislotyu. Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal. 2008; 42(12):8–10.
2. Mironov A.N. i dr. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanii lekarstvennyukh sredstv. Chast′ pervaya. M.: Grif i K, 2012. 944 s.
3. Smirnova A.V. Fomin A.N., Semyonov M.B., Kadzhoyan L.V. Kolichestvennoe opredelenie lidokaina i bupivakaina v tkani pecheni metodom kapilyarnogo elektroforeza. Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya. 2017; 12:16-20.
4. Zhang N. et al. Comparison of the concentrations of lidocaine in different body fluids/tissues after subarachnoid space and intravenous administration of a lethal dose of lidocaine. Journal of forensic science and medicine. 2015; 1(1):48-53.
5. Tanaka E. et al. Lidocaine concentration in oral tissue by the addition of epinephrine. Anesth Prog. 2016; 63:17–24.
6. Saidov N.D., Bulgakova E.A., Malkova T.L. Izuchenie ekstatsii monomekaina iz vodnyukh rastvorov. Innovatsionnaya nauka: mezhdunarodnyui nauchnyui zhurnal. 2019; 7-8:124-125.
7. Saidov N.D. Vyubor uslovii opredeleniyya monomekaina v biomatritse dlya tselei farmakokineticheskikh issledovanii. Vestnik Permskoi gosudarstvennoi farmatsevticheskoi akademii: nauchno-prakticheskii zhurnal. 2018; 21:152-154.