

О.А. Таширова,
*к.фарм.н., научный сотрудник Института
иммунологии ФМБА РФ*

В.В. Смирнов,
*к.фарм.н., старший преподаватель кафедры
фармацевтической и токсикологической химии
Первого МГМУ им. И.М. Сеченова*

А.М. Власов,
*к.фарм.н., доцент кафедры фармацевтической
и токсикологической химии Первого МГМУ
им. И.М. Сеченова*

М.Р. Хаитов,
*к.фарм.н., научный сотрудник Института
иммунологии ФМБА РФ*

Г.В. Раменская,
*д.фарм.н., профессор, заведующая кафедрой
фармацевтической и токсикологической химии,
директор НИИ фармации Первого МГМУ
им. И.М. Сеченова*

O.A. Tashirova,
*PhD, researcher of the Institute of immunology
of FMBA of RF*

V.V. Smirnov,
*PhD, senior lecturer of the chair of pharmaceutical
and toxicological chemistry of the First MSMU
named after I.M. Sechenov*

A.M. Vlasov,
*PhD, associate prof. of the chair of pharmaceutical
and toxicological chemistry of the First MSMU
named after I.M. Sechenov*

M.R. Haitov,
*PhD, researcher of the Institute of immunology
of FMBA of RF*

G.V. Ramenskaya,
*Doctor of pharmacy, prof., head of the chair of phar-
maceutical and toxicological chemistry, director of the
Research institute of pharmacy of the First MSMU named
after I.M. Sechenov*

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИАМИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ LC-MS С ЦЕЛЬЮ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ

THE DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF THIAMINE IN BLOOD PLASMA BY MEANS OF LC-MS METHOD PROVIDING STUDIES OF BIOEQUIVALENCE

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

Галина Владиславовна Раменская, заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии, директор НИИ фармации

Адрес: 119019, г. Москва, ул. Никитский бульвар, д. 13

Телефон: 8 (495) 691–13–92

E-mail: ramenskaia@mail.ru

Статья принята к печати: 28.11.2012

Аннотация. В статье разрабатывается методика количественного определения тиамина в плазме крови методом LC-MS с целью проведения исследования биоэквивалентности.

Annotation. The methods for quantitative determination of thiamine in blood plasma by means of LC-MS method providing studies of bioequivalence are developed in this paper.

Ключевые слова. Плазма крови, тиамин, исследование биоэквивалентности.

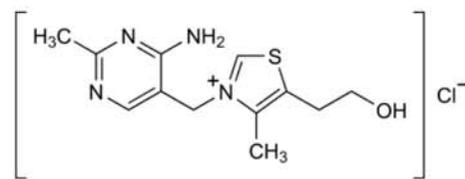
Key words. Blood plasma, Thiamine, investigation of bioequivalence.

ВВЕДЕНИЕ

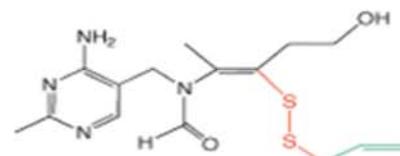
Витамин В1 (тиамин) — это эссенциальный микронутриент, который является кофактором целого ряда ферментов, необходимых для обеспечения нормального метаболизма углеводов (пируватдекарбоксилазный и α -кетоглутаратдекарбоксилазный комплексы, транскетолаза). Фармакологическое действие тиамин заключается в том, что, всасываясь из кишечника, тиамин фосфорилируется и превращается в тиаминпирофосфат (тиаминдифосфат) — активную форму тиамин, являющуюся коферментом пируватдекарбоксилазного и α -кетоглутаратдекарбоксилазного комплексов, а также транскетолазы. Первые два фермента участвуют в метаболизме углеводов, транскетолаза функционирует в пентозофосфатном пути, участвуя в переносе гликоальдегидного радикала между кето- и альдосахарами, а также участвует в окислительном декарбоксилировании α -кетоглутаровой кислоты в цикле Кребса. Тиаминпирофосфат синтезируется ферментом тиаминпирофосфокиназой, преимущественно в печени и в ткани мозга. При дефиците тиаминдифосфата развиваются дегенеративные изменения нервной ткани с сопутствующими нарушениями сердечно-сосудистой регуляции, функций желудочно-кишечного тракта, водно-солевого обмена, а также развитием мышечной атрофии и других нарушений [1]. Помимо развития нейропатий различного генеза, дефицит витамина В1 приводит к развитию других функциональных расстройств организма, начиная от заболеваний пищеварительной (различные диспепсические явления, увеличение печени) и сердечно-сосудистой систем (снижение сократительной способности миокарда, сердечная недостаточность, сердечные аритмии, артериальная гипотония, острая сердечно-сосудистая недостаточность), вплоть до таких серьезных заболеваний, как Бери-Бери и синдром Вернике-Корсакова. При гиповитаминозе тиамин у кормящих женщин в молоке появляется кардиотоксический метаболит гамма-окси-альфа-кетоглутарат, нарушающий у новорожденного деятельность сердца, вплоть до его остановки.

На сегодняшний день на отечественном фармацевтическом рынке зарегистрировано большое количество лекарственных препаратов для лечения нейропатий, основными из которых являются средства, содержащие витамины группы В и их производные. В свою очередь, наиболее назначаемыми являются препараты витамина В1, по причине их доказанной терапевтической эффективности.

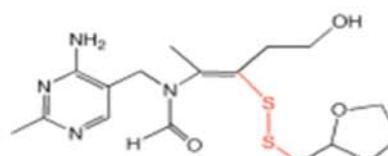
Витамин В1 принадлежит к группе водорастворимых витаминов, однако в фармакотерапии применяют как водорастворимые, так и жирорастворимые формы. К водорастворимым формам относятся



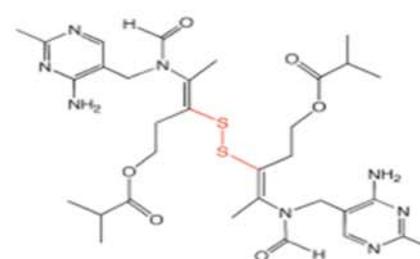
Тиамин



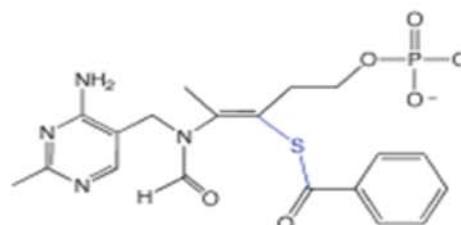
Аллилтиамин (Тиамин аллил дисульфид)



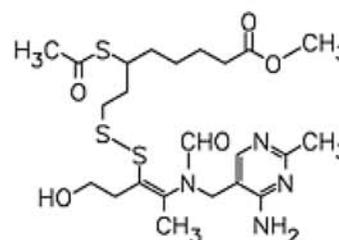
Фурсултиамин (Тиамин тетрагидрофурил дисульфид)



Сулбутиамин (О-изобутирилтиамин дисульфид)



Бенфотиамин (S-бензоилтиамин О-монофосфат)



Октотиамин

Рис. 1. Тиамин и его жирорастворимые формы

соли тиамин — тиамин гидрохлорид, тиамин бромид и тиамин мононитрат [2].

В настоящее время препараты, содержащие водорастворимые соли тиамин, все реже используются в терапии, так как данным препаратам присущи определенные недостатки: низкая биодоступность, не превышающая 10% от принятой дозы; плохая проницаемость через слизистую оболочку кишечника; быстрый метаболизм в желудочно-кишечном тракте; высокая степень метаболизма в печени и тканях [3–5].

Для решения этой проблемы в 60-е годы были синтезированы жирорастворимые формы тиамин: бенфотиамин (S-бензоил-тиамин-O-монофосфат), фурсультиамин (тиамин тетрагидрофурфурил дисульфид), октотиамин (тиамин дисульфид), S-ацилтиамин, O,S-диацетилтиамин, циклотиамин, просультиамин, салбутиамин и другие (рис. 1) [5, 6–9]. При абсорбции из желудочно-кишечного тракта жирорастворимые формы тиамин достаточно быстро и полно проникают в эпителиальные клетки кишечника, где превращаются в обычный тиамин [10].

Поскольку все формы тиамин в результате биотрансформации переходят в тиамин различных степеней фосфорелирования, находящихся в крови в химическом равновесии со свободным тиамином, то для изучения сравнительной фармакокинетики водорастворимых и жирорастворимых форм тиамин нами была поставлена задача разработки быстрой и простой методики количественного определения тиамин в плазме крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы

Тиамин гидрохлорид (чистота 99,92%, Supelco, Германия, кат.№ 47858), трифторуксусная кислота, ацетонитрил (MERK KGaA Darmstadt, Германия), вода деионизированная и очищенная с использованием Milli-Q system MP-650, IWAKI Millipore, Япония.

ОБОРУДОВАНИЕ

Определение тиамин в плазме крови проводилось на приборе Agilent 1200 LC/MS, оснащенном дегазатором, градиентным насосом, колоночным термостатом, автосамплером, УФ-детектором и масс-спектрометрическим квадрупольным детектором Agilent 6120 с ионизацией электроспреем при атмосферном давлении. В качестве неподвижной фазы использовалась хроматографическая колонка Agilent «ZORBAX SB C18 5мкм, 150*2,1мм» с предколонкой ZORBAX SB C18 5мкм, 35*2,1мм.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ СТАНДАРТНОГО И РАБОЧИХ РАСТВОРОВ

Стандартный раствор был приготовлен растворением точной навески тиамин гидрохлорида в воде до получения концентрации 36 мкг/мл (в пересчете на тиамин). Исходный стандартный раствор хранили при температуре -40°C. Срок годности исходного стандартного раствора 1 месяц. Рабочие стандартные растворы тиамин (7 нг/мл, 92 нг/мл, 368 нг/мл, 736 нг/мл, 3,6 мкг/мл) были приготовлены из исходного стандартного раствора разведением водой. При каждой калибровке готовились свежие рабочие растворы.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ КАЛИБРОВКИ

Для калибровки прибора и валидации метода использовалась плазма здоровых лиц не принимающих лекарственные средства минимум в течение 2-х недель. Образцы для калибровки были приготовлены добавлением к 1 мл плазмы рабочих стандартных растворов до получения финальных концентраций 10, 50, 100, 1000, 10000 нг/мл плазмы. Калибровочные кривые получали ежедневно.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Аналитический метод

Пробоподготовка. 500 мкл плазмы помещали в пробирки эппендорф, добавляли 50 мкл насыщенного раствора сульфата меди, встряхивали на шейкере в течение 5 мин при скорости 2500 об/мин, после чего центрифугировали 30 мин при 16100 об/мин. 200 мкл центрифугата отбирали во флакон на 2,5 мл для хроматографирования и помещали в автосамплер. Аликвоту 20 мкл вводили в хроматограф.

Условия хроматографирования. Анализ проводили на жидкостном хроматографе с масс-спектрометрическим детектором, колонка: Agilent XDB-C18 150×2,1 мм, 5 мкм при температуре 30°C. Объем вводимой пробы составлял 20 мкл. В качестве подвижной фазы была выбрана смесь ацетонитрила и 0,05% раствора трихлоруксусной кислоты в воде деионизированной (pH=2,6) в соотношении 2:98. Скорость потока подвижной фазы — 0,8 мл/мин. Масс-детектор работал в SIM режиме в позитивной полярности при значении m/z=265,1. Тип ионизации: MM-ES. Напряжение на капилляре 4000 В. Температура осушающего газа составляла 230°C. Скорость осушающего газа 13 л/мин.

В качестве метода количественного определения был выбран метод абсолютной калибровки.

Валидация

Разработанная методика была валидирована по показателям линейности, специфичности, точности и воспроизводимости.

Линейность была доказана в диапазоне от 10 нг/мл до 10000 нг/мл. Уравнение прямой имело вид $y=1,6736 \times x - 0,0263$, коэффициент корреляции $R=0,99699$.

Фактор асимметрии пика тиамин 1,15. Эффективность колонки для исследуемого вещества была около 10800 теоретических тарелок, что говорит о высокой эффективности хроматографической системы.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Хроматограмма образца чистой плазмы показана на рис. 2А в сравнении с хроматограммами плазмы с добавлением тиамин в количестве 1 мкг/мл (см. рис. 2Б) и хроматограммой плазмы через 3 часа после приема 1600 мг бенфотиамин (см. рис. 2В). Из рисунка видно, что методика достаточно селективна, что подтверждается отсутствием пиков интерферирующих эндогенных соединений в месте элюирования тиамин.

Предел количественного определения рассчитывался как наименьшая концентрация анализируемого вещества при которой отношение сигнал:шум составляло 10:1. Чувствительность метода для масс-

спектрометрического детектирования составила 10 нг/мл, этого было достаточно для определения содержания тиамин в плазме добровольцев в течение 24 часов после однократного применения.

СТЕПЕНЬ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТРИКСА

Степень извлечения тиамин из плазмы рассчитывалась сравнением площадей пиков чистого стандарта приготовленного из рабочего раствора, введенного в хроматографическую колонку, и площади пика экстракта, полученного из плазмы крови с добавлением аналогичного количества тиамин (n=5 для каждой концентрации). Степень извлечения составила 74,4%, 81,6%, 87,0% для концентраций тиамин 1 нг/мл, 50 нг/мл и 100 нг/мл соответственно.

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Для оценки воспроизводимости проводили количественное определение с применением масс-спектрометрического детектора модельных смесей тиамин гидрохлорида и плазмы для различных концентраций. Для образцов измеренных в течение дня относительное стандартное отклонение составило 8,4%, 7,2%, 9,5% для модельных смесей содержащих 10 нг/мл, 50 нг/мл и 100 нг/мл, тиамин соответственно. Для измерений в течение недели относительное стандартное отклонение составило 13,5%, 11,4% и

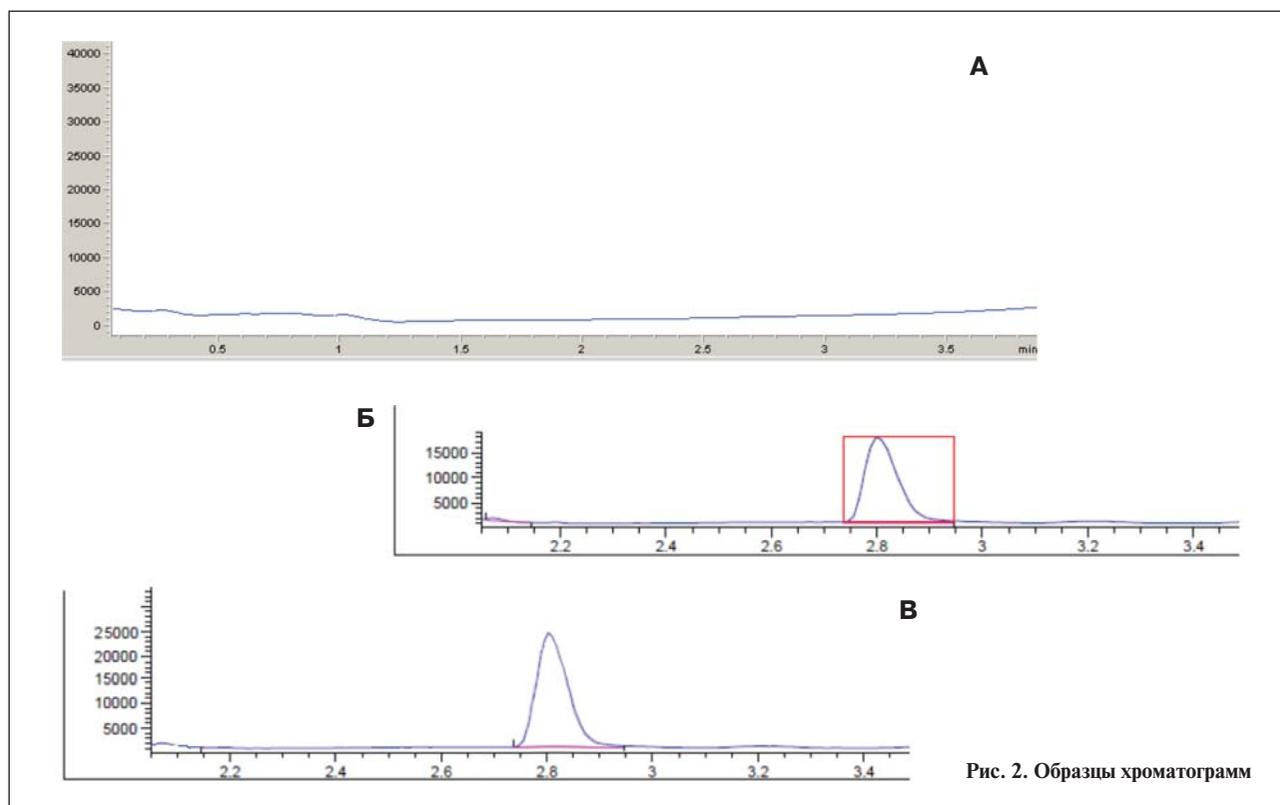


Рис. 2. Образцы хроматограмм

14,2% для модельных смесей содержащих 10 нг/мл, 50 нг/мл и 100 нг/мл, тиамин соответственно.

С помощью разработанной методики было проведено исследование сравнительной фармакокинетики препаратов, содержащих липофильный тиамин (тестовый препарат) и гидрофильный тиамин (референтный препарат). Было показано различие полноты всасывания тиамин. Относительная биодоступность тиамин у здоровых лиц из препарата, содержащего жирорастворимую форму тиамин, составила 239% по сравнению с водорастворимой.

ВЫВОДЫ

По результатам проделанной работы были сделаны следующие выводы:

— Разработан чувствительный метод определения тиамин в плазме крови с помощью жидкостной хроматографии с масс-детектором.

— Проведена валидация данного метода. Метод обладает высокой чувствительностью и селективностью, благодаря сочетанию жидкостной хроматографии с масс-детектором и может быть использован для определения концентрации тиамин в крови в фармакокинетических исследованиях.

Список литературы

1. *Singleton C.K., Martin P.R.* Molecular mechanisms of thiamine utilization // *Curr. Mol. Med.* — 2001. — Vol. 1. — № 2. — P. 197–207.
2. *Спиричев В.Б.* Витамины, витаминоподобные и минеральные вещества. Справочник для провизоров и фармацевтов. — М., 2005. — 239 с.
3. *Конь И.Я., Тоболева М.А., Димитриева С.А.* Дефицит витаминов у детей: основные причины, формы и пути профилактики у детей раннего и дошкольного возраста // *Вопр. современной педиатрии.* — 2002. — Т. 1. — № 2. — С. 62–66.
4. *Ярош А.К.* Сравнительная фармакокинетика препаратов витамина В₁ (тиамин) и их фармакодинамическая (лечебная) эффективность // *Ліки України: Науковий журнал.* — 2009. — № 7(133). — С. 71–76.
5. *Volvert M.L., Seyen S., Piette M.* et al. Benfotiamine, a synthetic S-acyl thiamine derivative, has different mechanisms of action and a different pharmacological profile than lipid-soluble thiamine disulfide derivatives // *Posted.* — 2008. — Vol. 11. — P. 19.
6. *Wada T., Takagi H., Minakami H.* et al. A new thiamine derivative, S-benzoylthiamine O-monophosphate // *Scien.* — 1961. — Vol. 134. — P. 195–196.
7. *Fujiwara M., Watanabe H., Matsui K.* Allithiamine a newly found derivative of vitamin B1. I. Discovery of Allithiamine // *J. Biochem.* — 1954. — Vol. 41. — P. 29–39.
8. *Baker H., Frank O.* Absorption, utilization and clinical effectiveness of allithiamines compared to water-soluble thiamines // *J. Nutr. Sc. Vitaminol.* — 1976. — Vol. 22. — P. 63–68.
9. *Geissler C., Powers H.* Human Nutrition. — Edinburgh, 2006. — 763 p.
10. *Davis R.E.* Clinical chemistry of thiamine // *Adv. Clin. Chem.* — 1983. — Vol. 23. — P. 93–140.