

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИМОДИПИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС

Попов Н.С., Колгина Н.Ю., Самоукина А.М.

ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава России

В настоящем исследовании разработана методика количественного определения нимодипина в плазме крови с помощью ВЭЖХ-МС/МС. Хроматографию выполняли с использованием аналитической колонки Phenomenex Synergi 4 мкм Fusion-RP 50x2 мм. В качестве подвижной фазы использовали смесь деионизированной воды и ацетонитрила с добавлением 0,1% муравьиной кислоты в градиентном режиме. Детектирование нимодипина и нитрендипина (внутренний стандарт) проводили в режиме мониторинга множественных реакций. Нижний предел количественного определения нимодипина в плазме крови составил 1 нг/мл, аналитический диапазон методики от 1 нг/мл до 200 нг/мл. Методика была валидирована по показателям селективности, точности, прецизионности, линейности, матричному эффекту, стабильности.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF NIMODIPINE IN BLOOD PLASMA BY HPLC-MS/MS

Popov N.S., Kolgina N.YU., Samoukina A.M.

Tver State Medical University

During the experiment was developed a method for the quantitative determination of nimodipine in blood plasma using HPLC-MS/MS. An Phenomenex Synergi 4 μm Fusion-RP 50x2 mm. analytical column was used for chromatography. A mixture of deionized water and acetonitrile with the addition of 0,1 % formic acid in the gradient mode was used as a mobile phase. The detection of nimodipine and nitrendipine (internal standard) conducted by the mode of multi reaction monitoring. The lower limit of quantitative determination of nitrendipine in blood plasma was 1 ng/ml. The analytical range of the method is from 1 ng/ml to 200 ng/ml. The method was validated in terms of selectivity, accuracy, precision, linearity, matrix effect and stability.

Нимодипин, (1-Метилэтиловый эфир 2-метоксиэтил-1,4-дигидро-2,6-диметил-4-(3-нитрофенил)-3,5-пиридиндикарбоновой кислоты), представляет собой дигидропиридиновый блокатор кальциевых каналов с сосудорасширяющими свойствами. Нимодипин проникает через гематоэнцефалический барьер и имеет особое сродство к сосудам головного мозга [2, 9]. В настоящее время используется для профилактики и лечения церебральных ишемических состояний, обусловленных спазмом сосудов [1, 3]. При пероральном приеме биодоступность нимодипина сравнительно невысока (около 10-15%), что связано с метаболизмом препарата при первом прохождении через печень [5, 6]. Кроме того, многочисленные клинические исследования показали вариабельность фармакокинетики нимодипина в зависимости от пола и возраста пациентов, наличия сопутствующих заболеваний, вариабельности метаболизма, обусловленной генетическим полиморфизмом [8].

Для повышения эффективности фармакотерапии важно проводить терапевтический лекарственный мониторинг лекарственных препаратов. Однако, его осуществление требует внедрения простых в исполнении, точных и воспроизводимых методик определения концентрации лекарственных веществ в биологических объектах. Универсальным методом, позволяющим осуществлять качественный и количественный анализ лекарственных веществ в биоматериале, является высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием [4, 7].

Цель исследования: разработка и валидация хромато-масс-спектрометрической методики количественного определения нимодипина в плазме крови.

Материалы и методы: Объектом исследования явился нимодипин (Sigma Aldrich), в качестве внутреннего стандарта использовали нитрендипин (Sigma Aldrich) (рис. 1).

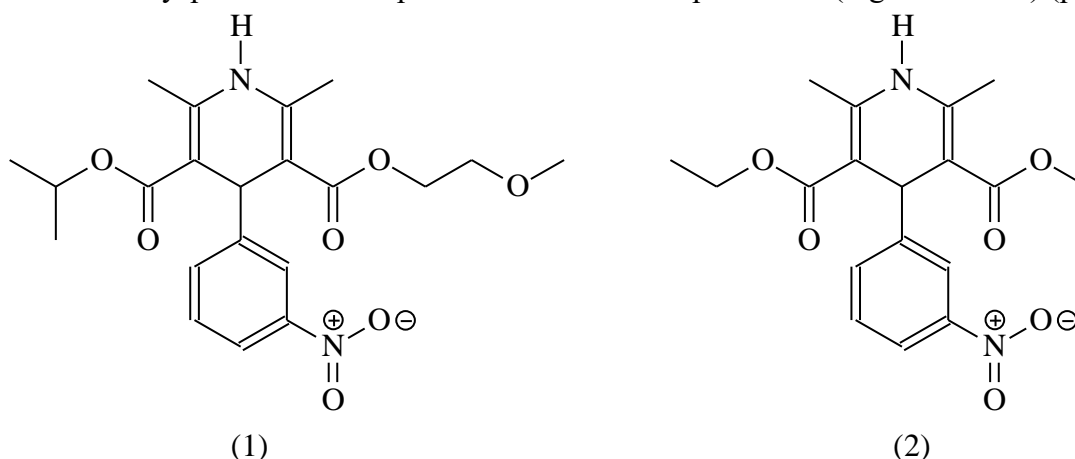


Рис. 1. Химические структуры нимодипина (1) и нитрендипина (внутренний стандарт) (2)

Из субстанций готовили исходные растворы на абсолютном ацетонитриле (Panreac AppliChem for LC-MS) с концентрацией 1 мг/мл, хранили при температуре -20°C и использовали по мере необходимости для приготовления рабочих растворов.

Количественный анализ нимодипина осуществляли с использованием гибридного квадрупольного масс-спектрометра AB Sciex 3200 MD QTRAP в сочетании с высокоэффективным жидкостным хроматографом Agilent Technologies 1260 Infinity II. Масс-спектрометрическое детектирование аналитов проводили в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) при положительной ионизации. Для этого определяли ионы-предшественники и ионы-продукты нимодипина и нитрендипина, для которых подбирали оптимальные параметры детекции, обеспечивающие достижение максимальной чувствительности.

Хроматографическое разделение аналитов осуществляли с применением обращенно-фазовой колонки Phenomenex Synergi 4 мкм Fusion-RP 50x2 мм, в качестве компонентов подвижной фазы использовали ацетонитрил и деионизированную воду (MilliQ Gradient A10, Merck Millipore) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты.

Для предотвращения фоторазрушения нимодипина исходный раствор, рабочие и калибровочные растворы готовили и хранили в пробирках Эпшендорфа объемом 2 мл, обернутых алюминиевой фольгой. Калибровочные стандарты и образцы контроля качества готовили с использованием интактной смешанной плазмы, полученной от здоровых добровольцев. Для этого к 300 мкл плазмы добавляли 50 мкл соответствующего рабочего раствора до получения концентраций 1, 2, 10, 20, 100 и 200 нг/мл в пересчете на плазму крови. Контрольные образцы получали с концентрацией нимодипина 3, 90 и 180 нг/мл. Кроме того, были приготовлены холостые образцы, не содержащие анализируемое вещество, с добавлением и без добавления внутреннего стандарта.

В основе пробоподготовки образцов плазмы использовали осаждение белков абсолютным ацетонитрилом. С этой целью к калибровочным стандартам, контрольным и холостым образцам, а также к анализируемым образцам плазмы пациентов объемом 300 мкл добавляли 1 мл ацетонитрила, содержащего нитрендипин (внутренний стандарт) в концентрации 50 нг/мл. Полученные образцы встряхивали на вортексе в течение 30 минут, затем центрифугировали при 4°C со скоростью вращения ротора 15000 об/мин в течение 10 минут. Супернатант переносили в хроматографические вials, которые помещали в автоматический пробоотборник хроматографа для последующего анализа.

Валидацию методики проводили по следующим показателям: линейность, селективность, чувствительность, прецизионность, точность, степень извлечения аналитов и матричный эффект.

Результаты и обсуждение.

Детектирование аналитов осуществляли в режиме мониторинга множественных реакций на основании регистрации соответствующих MRM-переходов: 419,4 → 343,0 (m/z) для нимодипина и 361,4 → 315,0 (m/z) для нитрендипина (внутренний стандарт). Масс-спектры I и II порядка анализируемых веществ показаны на рисунках 2 и 3, параметры детектирования представлены в таблице 1.

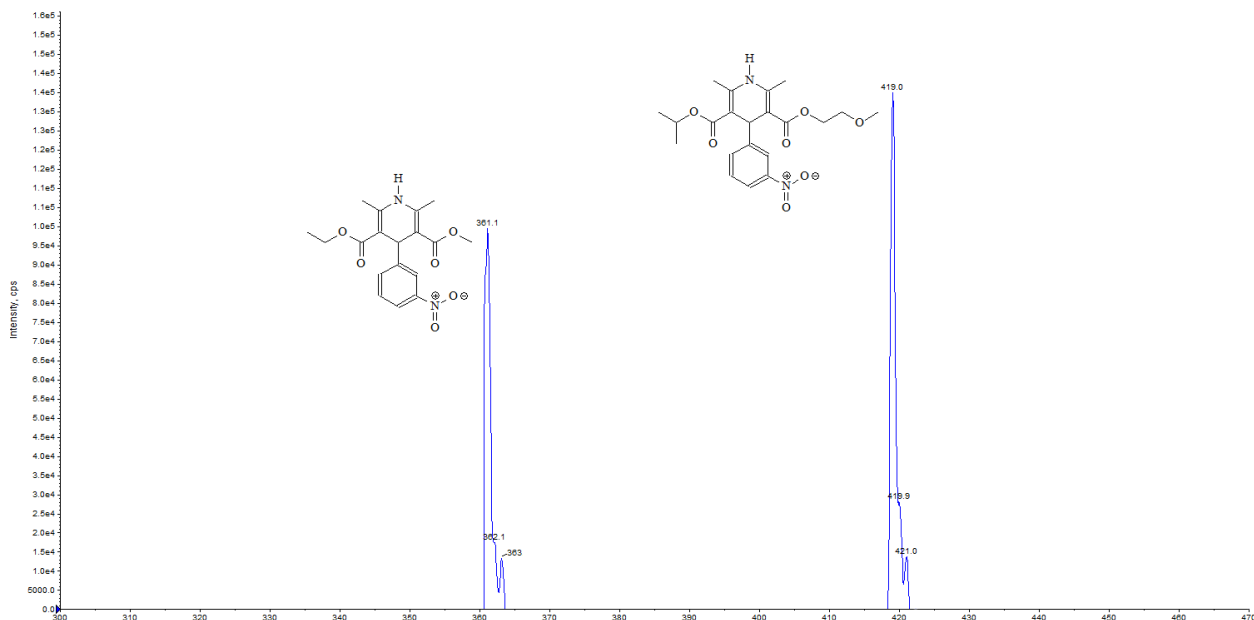


Рис. 2. Масс-спектр ионов-предшественников $[M+H]^+$ нимодипина и нитрендипина при положительной ионизации

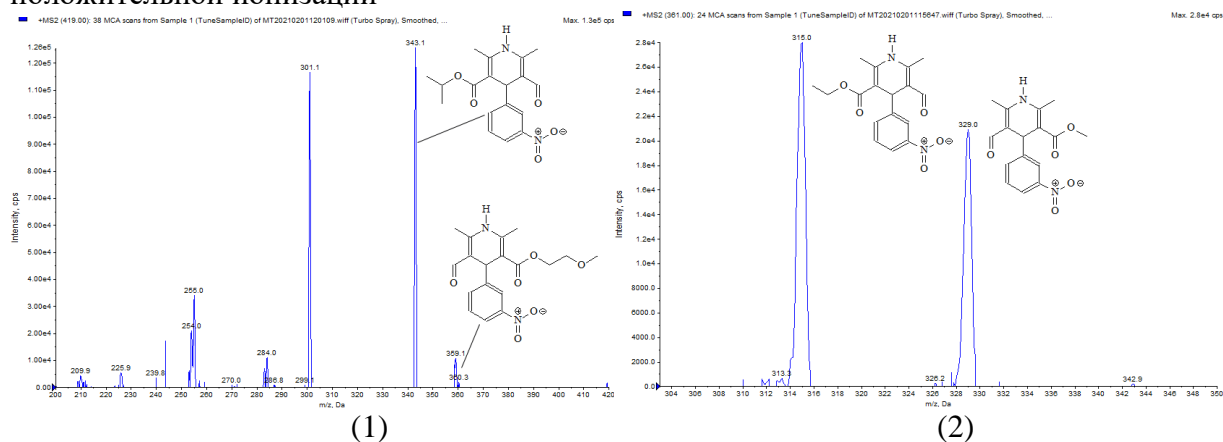


Рис. 3. Масс-спектр ионов-продуктов нимодипина (1) и нитрендипина (2)

Таблица 1 Параметры масс-спектрометрического детектирования нимодипина и нитрендипина

Тип источника ионов		Turbo Ion Spray	
Режим ионизации		Положительный	
Напряжение источника ионов (IS), В		5500,0	
Потенциал ввода (EP), В		4,5	
Потенциал декластеризации (DP), В		68,0	
Аналит	MRM, m/z	Энергия соударения (CE), эВ	Потенциал выхода (CXP), В
Нимодипин	419,4/343,0	18,1	4,3
Нитрендипин (внутренний стандарт)	361,4/315,0	16,4	4,2

Хроматографическое разделение анализов производили в градиентном режиме, используя в качестве компонентов подвижной фазы воду деионизированную (элюент А) и абсолютный ацетонитрил (элюент В) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты. Параметры хроматографирования представлены в таблице 2. Время удерживания нимодипина и нитрендипина составило соответственно 3,7 и 3,5 минут (рис. 4).

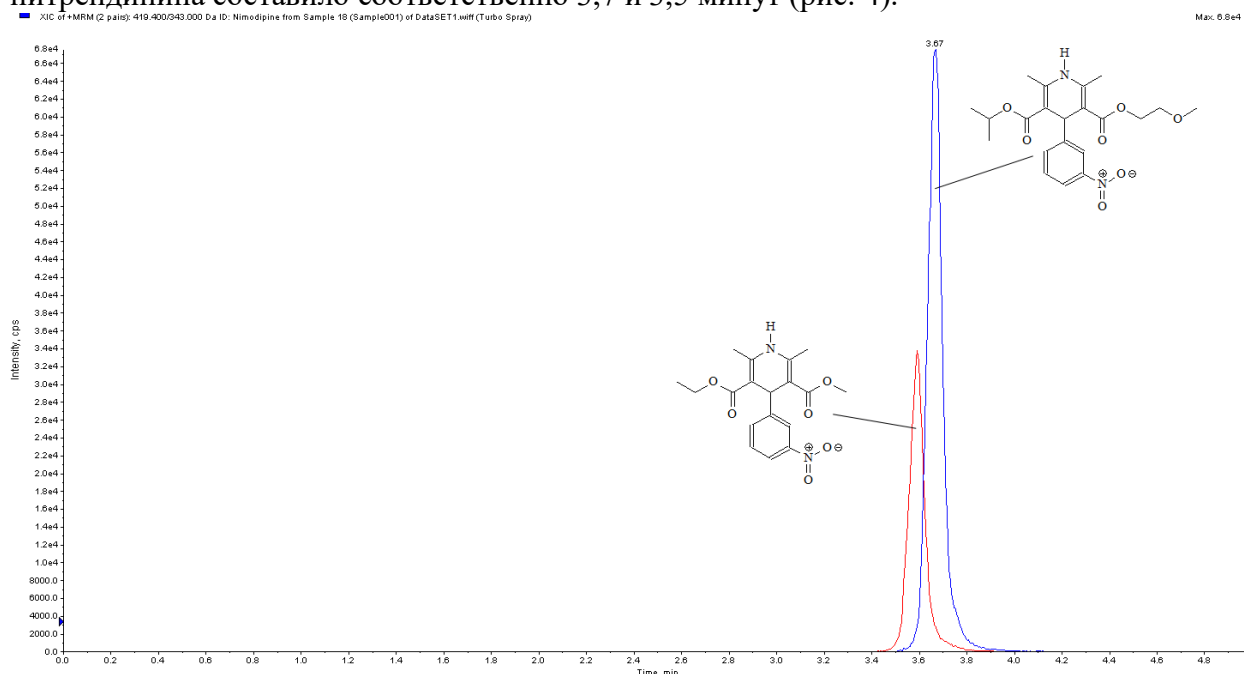


Рис. 4. Хроматограмма образца плазмы крови с содержанием нимодипина 100 нг/мл.

Таблица 2 Хроматографические параметры определения нимодипина и нитрендипина (внутренний стандарт)

Хроматографическая колонка	Phenomenex Synergi 4 мкм Fusion-RP 50x2 мм			
Подвижная фаза А	Деионизированная вода + 0,1% НСООН			
Подвижная фаза В	Ацетонитрил + 0,1% НСООН			
Программа градиента	Время, мин	Скорость потока, мл/мин	% А	% В
	0,0	0,3	80	20
	0,5	0,3	80	20
	3,0	0,3	5	95
	4,0	0,3	5	95
	4,01	0,3	80	20
5,0	0,3	80	20	
Температура колонки, °С	40			
Объем ввода, мкл	10			
Общее время анализа, мин	5			

Для разработанной методики количественного определения нимодипина в плазме крови были установлены метрологические характеристики. Нижний предел количественного определения составил 1 нг/мл, при этом соотношение «сигнал-шум» на хроматограмме - 15:1, а отклонение от номинальной концентрации не превышало 10%. Установлен аналитический диапазон методики, показано, что пропорциональное возрастание площади хроматографического пика нимодипина в зависимости от концентрации наблюдалось от 1 нг/мл до 200 нг/мл. Коэффициент корреляции для линейной зависимости составил 0,9999 (рис. 5).

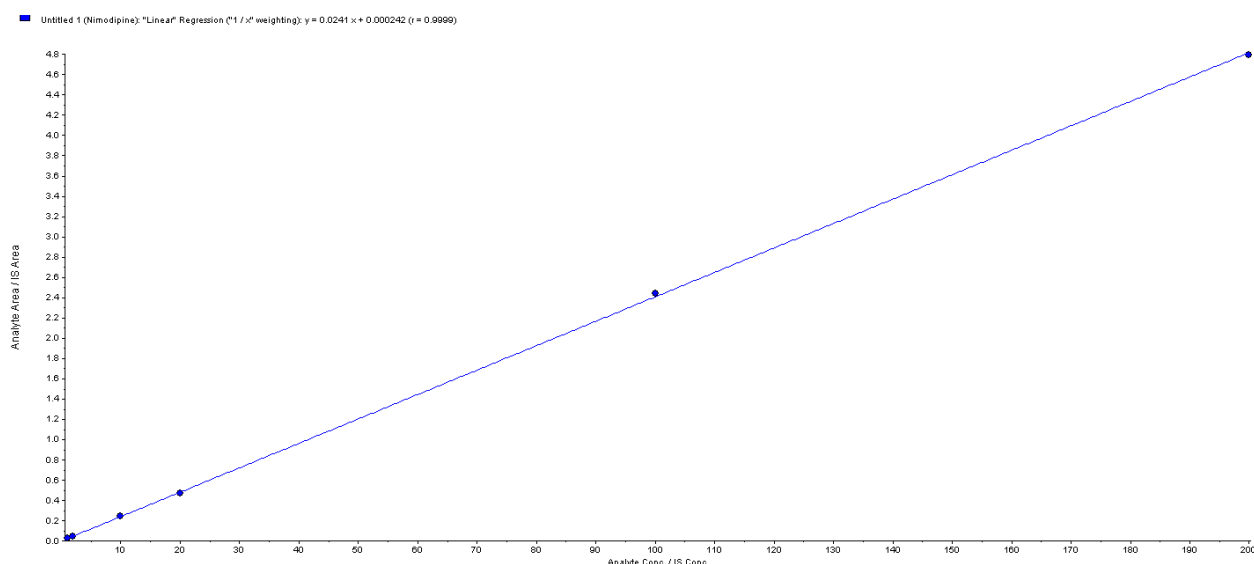


Рис. 5. Калибровочный график для количественного определения нимодипина в плазме крови

Примечание. По горизонтальной оси представлена концентрация нимодипина в плазме крови (нг/мл), по вертикальной оси – отношения площадей хроматографических пиков нимодипина и нитрендипина (внутренний стандарт).

Селективность методики была подтверждена путем расчета процентного отношения площадей хроматографических пиков нимодипина и нитрендипина в холостых пробах и в пробах с содержанием анализируемых веществ на уровне нижнего предела количественного определения. Полученные значения составили 2,1% и 5,6% для нимодипина и нитрендипина соответственно.

Оценку матричного эффекта проводили для концентраций нимодипина в плазме крови 3 нг/мл и 180 нг/мл, значение нормированного матричного фактора для анализируемых концентраций составило 0,95 и 0,97 соответственно, что свидетельствует о снижении влияния компонентов матрицы при использовании в качестве внутреннего стандарта нитрендипина.

Для разработанной методики были установлены значения степени извлечения нимодипина из плазмы крови, они составили 94% для высокой концентрации (180 нг/мл) и 97% - для низкой (3 нг/мл).

Результаты определения межсерийной точности и прецизионности для трех уровней концентраций нимодипина в плазме крови (3 нг/мл, 90 нг/мл и 180 нг/мл) представлены в таблице 3.

Таблица 3 Межсерийная точность и прецизионность методики количественного определения нимодипина в плазме крови

Стандартный образец	3 нг/мл	90 нг/мл	180 нг/мл
Концентрация, нг/мл, mean±SD	3,122±0,072	92,6±3,2	180,8±5,4
Точность, %	104,1	102,8	100,4
CV, %	7,73	3,42	1,50

Кроме того, в процессе разработки методики была определена стабильность нимодипина в чистом растворителе (ацетонитриле) и в плазме крови, в том числе после трех циклов замораживания-размораживания. Анализ результатов показал, что нимодипин сохранял свою стабильность во всех случаях, при этом отклонения от номинальной концентрации не превышали 15%.

Заключение.

Разработана методика количественного определения нимодипина в плазме крови, показатели которой полностью соответствуют требованиям отечественной и зарубежной

нормативной документации, регламентирующей валидацию биоаналитических методик. Аналитический диапазон методики позволяет применять ее как для терапевтического лекарственного мониторинга, так и для исследования клинической фармакокинетики нимодипина. Методика характеризуется малой продолжительностью анализа, упрощенной пробоподготовкой и высокой воспроизводимостью.

1. Akar E. et al. Сравнительный анализ влияния мелатонина и Нимодипина на спазм сосудов //журнал клинических и экспериментальных исследований. – 2018. – Т. 9. – №. 3. – С. 113-118.
2. Birks J., López-Arrieta J. Nimodipine for primary degenerative, mixed and vascular dementia //Cochrane database of systematic reviews. – 2002. – №. 3.
3. Cho S., Lee M. J., Chung C. S. Effect of nimodipine treatment on the clinical course of reversible cerebral vasoconstriction syndrome //Frontiers in neurology. – 2019. – Т. 10. – С. 644.
4. Isse F. A., Le T., Mahmoud S. H. Enantioselective assay of nimodipine in human plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry //Biomedical Chromatography. – 2020. – С. e4971.
5. Kong H. et al. Development and evaluation of high bioavailable sustained-release nimodipine tablets prepared with monolithic osmotic pump technology //Current drug delivery. – 2018. – Т. 15. – №. 1. – С. 44-51.
6. Lin C., Xia Z., Yang F. Various dosage forms of nimodipine: application and research advances //Journal of International Pharmaceutical Research. – 2017. – Т. 44. – №. 6. – С. 518-521.
7. Mohamed S., Riva R., Contin M. Simple and validated UHPLC–MS/MS analysis of nimodipine in plasma and cerebrospinal fluid of patients with subarachnoid haemorrhage //Journal of Chromatography B. – 2016. – Т. 1028. – С. 94-99.
8. Mahmoud S. H., Ji X., Isse F. A. Nimodipine Pharmacokinetic Variability in Various Patient Populations //Drugs in R&D. – 2020. – С. 1-12.
9. Wessell A. et al. High compliance with scheduled nimodipine is associated with better outcome in aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients cotreated with heparin infusion //Frontiers in neurology. – 2017. – Т. 8. – С. 268.